

# Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées

Ana Cecilia de Andrade Pinho Medeiros

► **To cite this version:**

Ana Cecilia de Andrade Pinho Medeiros. Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées. Mécanique des fluides [physics.class-ph]. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. <NNT : 2016GREAI011>. <tel-01482919>

**HAL Id: tel-01482919**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01482919>**

Submitted on 4 Mar 2017

**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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Mécanique des fluides, Energétique, Procédés**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Ana Cecilia de Andrade Pinho MEDEIROS**

Thèse dirigée par **Frédéric PIGNON**  
et codirigée par **Philippe SECHET** et **Zhujun HUANG**

préparée au sein du **Laboratoire des Ecoulements Géophysiques et Industriels (UMR 5519)** et du **Laboratoire Rhéologie et Procédés (UMR 5520)**

et de l'école doctorale **Ingénierie - Matériaux, Mécanique, Energétique, Environnement, Procédés, Production**

## **Etude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées**

Thèse soutenue publiquement le **02/03/2016**,  
devant le jury composé de :

**M. HERAN Marc**

Professeur, IEM, Montpellier, Président

**M. GOLFIER Fabrice**

MCF, GeoRessources, Vandoeuvre-lès-Nancy, Rapporteur

**M. TEIXEIRA José**

Professeur, UMinho, Braga-Portugal, Examineur

**M. PIGNON Frédéric**

DR-CNRS, LRP, Grenoble, Directeur de thèse

**M. SECHET Philippe**

MCF, LEGI, Grenoble, Co-Directeur de thèse

**Mme. HUANG Zhujun**

MCF, LEGI, Grenoble, Co-Directeur de thèse

**Mme. LECUYER Sigolène**

CR-CNRS, Liphy, Grenoble, Invitée





# Table des matières

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>Introduction générale</b>   | <b>5</b>  |
| <b>2</b> | <b>Etat de l'art</b>   | <b>9</b>  |
| 2.1      | Qu'est ce qu'un biofilm . . . . .  | 10        |
| 2.1.1    | Les bactéries . . . . .  | 10        |
| 2.1.2    | Substances polymériques extracellulaires (EPS) . . . . .                     | 12        |
| 2.1.3    | Formation des biofilms . . . . .   | 13        |
| 2.1.4    | Modélisation de la cinétique de croissance bactérienne . . . . .             | 14        |
| 2.1.5    | Couplages entre les hydrodynamiques et le développement du biofilm . . . . . | 16        |
| 2.2      | Technique d'observation . . . . .  | 23        |
| 2.3      | Microfluidique . . . . .   | 25        |
| 2.3.1    | Les avantages et inconvénients de la microfluidique . . . . .                | 26        |
| 2.3.2    | Polydiméthylsiloxane - PDMS . . . . .  | 27        |
| 2.4      | Conclusion . . . . .   | 27        |
| <b>3</b> | <b>Matériels et Méthodes</b>   | <b>29</b> |
| 3.1      | Système biologique . . . . .   | 29        |
| 3.1.1    | Souche bactérienne . . . . .   | 29        |
| 3.1.2    | Milieus de culture . . . . .   | 30        |
| 3.2      | Dispositifs expérimentaux . . . . .  | 35        |
| 3.2.1    | Chambre d'écoulement . . . . .   | 37        |
| 3.2.2    | Caractérisation de l'hydrodynamique des chambres d'écoulement . . . . .      | 42        |
| 3.3      | Technique d'observation du biofilm . . . . .                                 | 51        |
| 3.3.1    | Microscope . . . . .   | 51        |
| 3.3.2    | Marqueurs des bactéries . . . . .  | 53        |
| 3.3.3    | Marqueur des EPS . . . . .   | 54        |
| 3.3.4    | Compatibilité des fluorochromes . . . . .                                    | 55        |
| 3.3.5    | Conclusion sur les fluorochromes . . . . .                                   | 59        |
| 3.4      | Conclusion . . . . .   | 60        |
| <b>4</b> | <b>Traitement d'images</b>   | <b>63</b> |
| 4.1      | Formation et numérisation d'image . . . . .                                  | 64        |
| 4.2      | Pré-traitement . . . . .   | 65        |
| 4.3      | Segmentation . . . . .   | 66        |
| 4.4      | Post-Traitement . . . . .  | 69        |
| 4.5      | Analyse d'image . . . . .  | 70        |
| 4.6      | Conclusion . . . . .   | 73        |



|          |   |            |
|----------|---|------------|
| <b>5</b> | <b>L'état initial de la colonisation</b>  | <b>75</b>  |
| 5.1      | Déroulement de l'expérience . . . . .   | 75         |
| 5.2      | Reproductibilité de l'état initial . . . . .  | 76         |
| 5.3      | Distribution spatiale . . . . .   | 80         |
| 5.4      | Conclusion . . . . .  | 83         |
| <b>6</b> | <b>Développement du Biofilm</b>   | <b>85</b>  |
| 6.1      | Déroulement de l'expérience . . . . .   | 85         |
| 6.2      | Image Représentative . . . . .  | 89         |
| 6.2.1    | Détermination de l'image représentative . . . . .                                   | 91         |
| 6.3      | Hauteur du biofilm considérée dans les chambres en PDMS . . . . .                   | 95         |
| 6.4      | Profils moyennés des fractions volumique en z . . . . .                             | 99         |
| 6.4.1    | Expériences à plus fort cisaillement : $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$ Pa . . . . .   | 99         |
| 6.4.2    | Expériences à plus faible cisaillement : $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$ Pa . . . . . | 105        |
| 6.5      | Distribution Spatiale . . . . .   | 109        |
| 6.5.1    | Zone interne . . . . .  | 117        |
| 6.5.2    | Zone externe . . . . .  | 123        |
| 6.6      | Cinétique de croissance du biofilm . . . . .  | 124        |
| 6.7      | Conclusion . . . . .  | 129        |
| <b>7</b> | <b>Conclusion</b>   | <b>133</b> |
| <b>8</b> | <b>Perspectives</b>   | <b>139</b> |
|          | <b>Bibliographie</b>  | <b>141</b> |
|          | <b>Annexes</b>  | <b>149</b> |
| <b>A</b> | <b>Protocole : Chambre d'écoulement en PDMS</b>                                     | <b>151</b> |
| <b>B</b> | <b>Résultat de l'essai de la reproductibilité de l'état Initial</b>                 | <b>155</b> |
| <b>C</b> | <b>Résumé de la prise d'images à chaque expérience</b>                              | <b>171</b> |
| <b>D</b> | <b>Caractéristiques analysées pour évaluation de la valeur de SER</b>               | <b>173</b> |
| <b>E</b> | <b>Mécanismes de l'adhésion bactérienne</b>   | <b>177</b> |
| <b>F</b> | <b>Distribution Spatiale dans le Biofilm</b>  | <b>179</b> |

## Résumé

En milieu aquatique, 90% des microorganismes se présentent sous forme de biofilm plutôt que dans un état planctonique. Les biofilms peuvent se former sur la plupart des surfaces humides, en particulier, les milieux poreux en raison de leur grande surface spécifique. La formation du biofilm dans les milieux poreux représente un domaine précieux pour la recherche scientifique en raison de sa pertinence pour de nombreux processus industriels, tels que le traitement des eaux, la bio-médiation des sols, la récupération du pétrole et le stockage du  $CO_2$ . Cependant, le développement du biofilm n'est pas simplement une agrégation passive de cellules, il implique des interactions biologiques, physiques et chimiques avec le micro-environnement. Les études macroscopiques ont démontré que les conditions hydrodynamiques dans les milieux poreux jouent un rôle décisif sur la dynamique d'accumulation des biofilms, ce qui influence à son tour les propriétés hydrodynamiques comme la porosité, la perméabilité et la chute de pression. Dans cette thèse nous avons mis au point une méthodologie et un dispositif expérimental permettant la caractérisation de la structure d'un biofilm. A partir de cette procédure, une étude expérimentale sur l'influence de l'écoulement sur la formation et la structure des biofilms a été effectuée sur une souche bactérienne *Pseudomonas Putida*. Les biofilms sont développés dans des micros cellules d'écoulement de type Hèle-Shaw (en PDMS ou PMMA) et alimentés en continu avec un milieu nutritif. La caractérisation de la colonisation avant croissance du biofilm a été également réalisée afin de pouvoir caractériser la variabilité statistique et la reproductibilité des expériences. La formation du biofilm sur un support solide dans un écoulement cisailé a été évaluée après 24 h, 48 h et 72 h de développement pour deux conditions hydrodynamiques,  $Re=0.04$ ,  $\tau_w = 0.0021$  Pa et  $Re=2$ ,  $\tau_w = 0.094$  Pa. Les observations ont été effectuées sous microscope confocal à l'aide de marqueurs fluorescents. Des images 2D sont prises en différentes positions puis sont utilisées pour effectuer une reconstruction 3D du biofilm avec l'évaluation de la distribution spatiale sur une zone de  $12 \times 12 mm^2$ . Nous avons ensuite mis en évidence que les biofilms formés sont peu sensibles aux conditions de colonisation initiales. Nous avons également observé une stratification du biofilm selon la hauteur. La couche interne présente une faible épaisseur ( $5 \sim 10 \mu m$ ) mais avec une structure dense, tandis que la couche externe présente plutôt une structure filamenteuse. Le rapport des fractions volumiques entre ces deux couches peut varier de 3 jusqu'à 12, selon le temps de formation. Cet écart est d'autant plus important pour le cas de faible cisaillement que celui de fort cisaillement. Ceci montre que la partie supérieure du biofilm semble être contrôlée par les conditions hydrodynamiques. En analysant la distribution spatiale du biofilm, nous avons constaté une forte hétérogénéité après 48 h de développement présente dans la structure, ainsi qu'une diminution de la fraction volumique de la biomasse après 72 h, pour les deux conditions hydrodynamiques imposées. Ceci évoque de probables processus de détachement ou une érosion du biofilm. Les taux de croissance mesurés sont largement inférieurs aux taux de croissance observés en culture libre. Ce résultat indique également un possible effet de l'hydrodynamique sur la croissance du biofilm. Au final, cette étude nous a permis d'obtenir des informations sur la structure et le taux de croissance apparent du biofilm, ainsi que l'effet de l'hydrodynamique sur ses propriétés à l'échelle de quelques pores. Ce changement d'échelle, permettra à terme de développer des outils pour simuler et/ou modéliser l'évolution de la morphologie et la distribution spatiale d'un biofilm dans un milieu poreux.

## Abstract

In the aquatic environment, 90% of microorganisms are present as a biofilm rather than free-swimming cells. Biofilms may develop on most of humid surfaces, in particular, in porous media for their high specific surface area. Biofilm formation in porous media is very interesting subject for many scientific researchers, because of its relevance to many industrial processes such as water treatment, soil bio- mediation, oil recovery and  $CO_2$  storage. However, the development of the biofilm is not just a passive aggregation of bacteria cells. It involves biological, physical and chemical interactions with the bacteria's micro-environment. Several studies in macroscopic scale have shown that hydrodynamic conditions in porous media play an essential role on the dynamics of biofilm growth, which in turn affects hydrodynamic properties of porous media such as porosity, permeability and pressure drop. In this thesis we have developed an experimental device and an appropriate methodology for the characterization of biofilm's structure. An experimental study on the influence of fluid flow on the formation and structure of biofilms was performed using a bacterial strain *Pseudomonas Putida*. Biofilms were grown in micro Hele-Shaw flow cell (in PDMS or PMMA) under laminar flows ( $Re = 0.04 \sim 2$ ) and fed continuously with a nutrient medium. Characterization of initial colonization was also carried out in order to examine the statistical variability and reproducibility of experiments. Biofilm formation on a solid support under a sheared flow ( $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa and  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa) was evaluated after 24, 48 and 72 h of development. Observations were made under a confocal laser scanning microscopes using fluorescent tag. 2D images were taken at different positions in the flow cell and used to perform a 3D reconstruction of biofilm's structure and an evaluation of its spatial distribution for an observation area of  $12 \times 12 mm^2$ . The results show that biofilms formation is not sensitive to initial colonization. A stratification of biofilm was also observed. The inner layer has a thin thickness ( $5 \sim 10 \mu m$ ), but with a dense structure, while the outer layer show rather a filamentous structure. The ratio of volume fractions between these two layers varies from 3 to 12, depending on the formation time. This difference is more important in the case of low shear stress than that of high shear stress, which means that the upper part of the biofilm seems to be controlled by the hydrodynamic conditions. By analyzing the spatial distribution of the biomass, we found that after 48 h, the biofilm present a significant heterogeneity and the volume fraction of biomass decreases after 72 h for both two hydrodynamic conditions, which suggests probable detachments or erosions of biofilm. Concerning the growth kinetics, different apparent growth rates were observed for each observation time. These values are significantly below the growth rates observed in free culture medium. This result also indicates a possible effect of hydrodynamics on the growth of biofilm. This experimental study of biofilm formation in micro-scale allowed us to obtain the information on the biofilm structural and its apparent growth rate, as well as the hydrodynamic effect on its properties across several pores of the porous media. This scaling up makes it's possible to develop eventually mathematical models to simulate the evolution biofilm's morphology and its spatial distribution in the porous medium.

# Nomenclature

## Lettres Latines

|            |                    |                                    |
|------------|--------------------|------------------------------------|
| $b$        | $h^{-1}$           | taux de mortalité                  |
| $C$        | $Kg.m^{-3}$        | concentration                      |
| $CV$       | —                  | coefficient de variation           |
| $d$        | $m$                | diamètre                           |
| $D$        | $m^3.cell.m^{-2}$  | densité surfacique de la biomasse  |
| $D_{diff}$ | $m^2.s^{-1}$       | coefficient de diffusion           |
| $DO$       | —                  | densité optique                    |
| $H$        | $\mu m$            | épaisseur du biofilm               |
| $h$        | $m$                | hauteur                            |
| $K_d$      | $h^{-1}$           | taux de détachement                |
| $K_s$      | $kg.m^{-3}$        | constante de demi saturation       |
| $l$        | $m$                | longueur                           |
| $N$        | <i>cellules</i>    | nombre de bactéries                |
| $N_0$      | <i>cellules</i>    | nombre de bactéries initiales      |
| $p$        | $Pa$               | pression                           |
| $Q$        | $m^3.s^{-1}$       | débit du fluide                    |
| $r_x$      | $kg.m^{-3}.h^{-1}$ | vitesse de croissance              |
| $Re$       | —                  | nombre de Reynolds                 |
| $S$        | $kg.m^{-3}$        | concentration du substrat          |
| $s$        | $m^2$              | surface occupée par les bactéries  |
| $t$        | $s$                | temps                              |
| $T$        | $^{\circ}C$        | température du milieu              |
| $u$        | $m.s^{-1}$         | vitesse du fluide                  |
| $V$        | $m^3$              | volume                             |
| $Var$      | —                  | variance                           |
| $w$        | $m$                | largeur                            |
| $X$        | $kg.m^{-3}$        | concentration en biomasse          |
| $X_0$      | $kg.m^{-3}$        | concentration initiale en biomasse |

## Lettres Grecques

|            |             |                                       |
|------------|-------------|---------------------------------------|
| $\phi$     | —           | fraction volumique de la biomasse     |
| $\alpha$   | —           | facteur de variation                  |
| $\epsilon$ | —           | porosité                              |
| $\theta$   | °           | angle de contact                      |
| $\lambda$  | $nm$        | longueur d'onde                       |
| $\mu$      | $h^{-1}$    | vitesse spécifique de croissance      |
| $\rho$     | $kg.m^{-3}$ | masse volumique du fluide             |
| $\sigma$   | —           | l'écart type                          |
| $\tau_w$   | $Pa$        | contrainte de cisaillement à la paroi |

## Indices et Exposants

|        |  |
|--------|--|
| $bv$   | bactérie vivante   |
| $cv$   | volume de contrôle   |
| $em$   | émission   |
| $ex$   | excitation   |
| $ext$  | couche externe du biofilm  |
| $int$  | couche interne du biofilm  |
| $i$    | position horizontale d'échantillonnage dans la chambre d'écoulement                |
| $j$    | position verticale d'échantillonnage dans la chambre d'écoulement (direction $z$ ) |
| $surf$ | surface de la paroi inférieure   |

# Chapitre 1

## Introduction générale

*“Certainly we felt that pure, planktonic cultures were the only way to work; Yet, in nature, bacteria don’t like that, in fact most of them occur in mixed, surface-dwelling, communities.”*

*Pr. Roberto Kolter, Harvard Medical School*

En milieu naturel, 90% des espèces bactériennes ne vivent pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces, autrement dit le mode de vie dominant des bactéries est probablement en **biofilm**. Le biofilm est une communauté de microorganismes fixée à des surfaces exposées à des environnements humides, en particulier, les milieux poreux en raison de leur grande surface spécifique. Les premiers biofilms sont découverts en 1683 dans un échantillon de grattage d’une surface dentaire. [Zobell \(1943\)](#) a observé que les bactéries colonisent préférentiellement les parois des flacons. [Jones et al. \(1973\)](#) a détecté l’existence d’une matrice polyosidique autour des agrégats microbiens dans les filtres des stations d’épuration. [Characklis \(1973\)](#) a démontré la tenacité et résistance des dépôt microbiens dans les conduites d’eau industrielles. Juste à la fin du XX<sup>ème</sup> [Costerton et al. \(1978\)](#) a proposé la première théorie des biofilms sur la base de l’observation de communautés microbiennes sessiles dans les torrents de montagne. De plus, de nombreuses études ont été effectuées pour comprendre ces systèmes vivants. Cependant, il y a encore un manque de connaissances général sur la façon dont les biofilms se développent, changent et se détachent ([Wagner et al., 2010](#)).

Les biofilms sont ubiquitaires, ils concernent le monde animal, végétal, minéral, aquatique ainsi que l’industrie. Les biofilms ont de nombreux rôles, positifs ou négatifs, à jouer. Ils sont ainsi fréquemment identifiés comme étant la source de lourds problèmes industriels. De fait, l’élimination des biofilms constitue un enjeu majeur dans de nombreux secteurs industriels, de l’agro-alimentaire à l’industrie lourde en passant par le milieu hospitalier. Néanmoins, les biofilms peuvent aussi être utilisés pour la production ou l’élimination de molécules (par fixation ou biodégradation) où leurs propriétés sont mises à profit. C’est aussi pour cette raison que la formation du biofilm dans les milieux poreux représente un domaine précieux pour la recherche scientifique en raison de sa pertinence pour de nombreux processus industriels, tels que le traitement des eaux, la bio-médiation des sols, la récupération du pétrole et le stockage du

dioxyde de carbone.

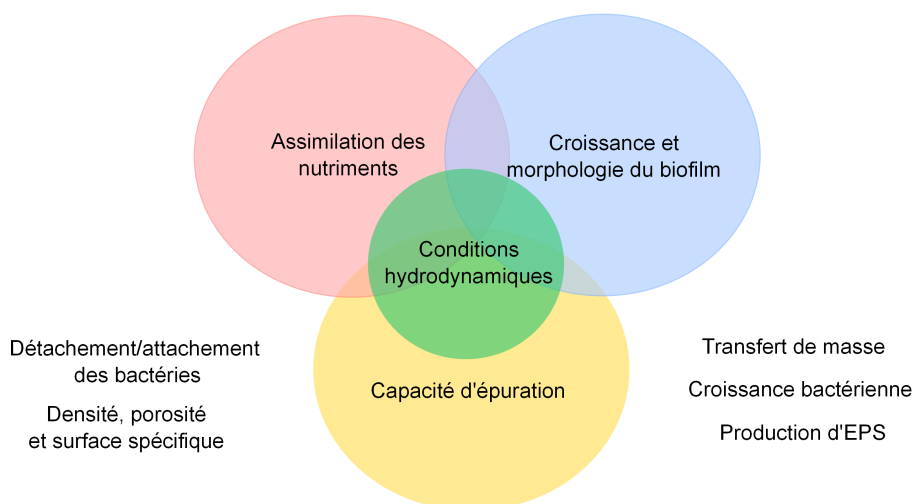
L'épuration biologique par biofiltration est un procédé à culture fixée permettant l'épuration biologique d'effluents liquides ou gazeux pollués. Un biofiltre est composé d'un bassin garni avec un matériau filtrant. Son mode opératoire consiste à faire passer l'effluent à traiter au travers de ce matériaux filtrant, présent sous forme granulaire de quelques millimètres de diamètre. Les granules servent de support à la biomasse épuratrice qui se développe sous forme de biofilms suite aux échanges de matières (polluant, oxygène, . . .) entre le liquide et le biofilm, le milieu poreux étant saturé. Ces granules présentent une grande surface d'échange (surface spécifique) ce qui contribue à intensifier ces échanges avec les micro-organismes. La biofiltration est couramment utilisée dans les applications industrielles. Ceci s'explique par les nombreux avantages qu'elle confère par rapport aux traitements par cultures libres. Néanmoins, les procédés à cultures fixées possèdent quelques inconvénients.

Afin d'améliorer la performance du procédé, il est nécessaire de mieux appréhender et décrire la croissance bactérienne dans un tel système, notamment les aspects concernant les couplages entre l'hydrodynamique et la dynamique de développement d'un biofilm. Cependant, ce problème est complexe en raison de son caractère multi-échelle et multi-physique. En particulier, la description des multiples couplages entre l'hydrodynamique et la croissance du biofilm constitue un des verrous scientifiques à lever. Pour illustrer la question, la figure 1.1 indique plusieurs interactions qui se produisent dans le biofiltre. Nous pouvons mettre en évidence des corrélations entre (i) les conditions hydrodynamiques ; (ii) le transport des nutriments/ l'activité biologique dans le biofilm ; (iii) le volume et la morphologie du biofilm (densité, porosité, surface spécifique) ; (iv) la composition du biofilm (l'EPS, la biomasse active et non active . . .) et (v) le détachement et le ré-attachement des bactéries du biofilm. On identifie un fort couplage entre des mécanismes physiques, biologiques et chimiques qui se traduisent à différentes échelles : (i) transfert de masse, dynamique de développement du biofilm et rétroaction sur l'écoulement local (ii) propagation, distribution spatiale du biofilm et modification de l'hydrodynamique à l'échelle de quelques pores (iii) traduction de ces effets à l'échelle globale en termes de perméabilité, existence de chemin préférentiel et redistribution des écoulements, efficacité de traitement.

A l'heure actuelle, une grande partie de ces couplages et des processus qui les décrivent sont mal connus. La difficulté est d'abord de type méthodologique lorsqu'on essaie d'aborder la question du point de vue expérimental. La majorité des études expérimentales effectuées implique l'utilisation de réacteurs macroscopiques, où les conditions hydrodynamiques sont difficiles à contrôler et où les mesures se font souvent en utilisant des bilans de masse globaux (Stoodley *et al.* (2002); Karrabi (2009)). Le développement récent de nouvelles techniques d'imageries (microtomographie aux rayons X) permet en outre des investigations plus fines et nouvelles en termes de paramètres accessibles car elles donnent accès à la description en trois dimensions du biofilm dans les milieux poreux. Citons par exemple les travaux de (Ivankovic *et al.*, 2015; Rolland du Roscoat *et al.*, 2014; Davit *et al.*, 2011).

Malgré d'indéniables progrès du point de vue expérimental, le manque de données exhaustives sur des processus clés fait qu'il n'existe pas actuellement de modèles simples et satisfaisants permettant de décrire à priori et donc d'optimiser/ou de contrôler le pilotage d'un procédé par

## Interrrelation physiques, biologiques et chimiques (effluent, matrice poreuse et biofilm)



**Figure 1.1** – Schéma illustratif de l'interrelation entre les conditions hydrodynamiques et le biofilm.

cultures fixées. La manière la plus rigoureuse de développer ce type de modèle consisterait à écrire ces processus à l'échelle locale, puis par des techniques de changement d'échelle de passer à l'échelle macroscopique (Orgogozo *et al.*, 2010; Golfier *et al.*, 2009; Anthony *et al.*, 2005).

Les processus à modéliser étant mal connus, beaucoup de modèles sont écrits directement à une échelle correspondant à quelques pores en utilisant une formulation de type milieu continu (Kildsgaard & Engesgaard, 2001; Brovelli *et al.*, 2009). Les équations gèrent en général des champs de concentration (biomasse, EPS ...) pour représenter le biofilm, des formulations empiriques permettant de remonter à une fraction volumique. Ces modèles nécessitent des lois de fermeture pour certains processus macroscopiques représentatifs des couplages entre la croissance de la biomasse et le fonctionnement du système. Parmi ces lois de fermeture, citons la perméabilité effective (Karrabi, 2009; Taylor *et al.*, 1990), la dispersivité effective (Taylor & Jaffé, 1990), les termes d'érosion et détachement du biofilm (Rittman, 1982; Picioreanu *et al.*, 2001), les termes de transferts de masse (Lopez *et al.*, 2003). Pour ne citer qu'une des difficultés auxquelles sont confrontés les modélisateurs, la description des lois de croissances est un point majeur. La plupart du temps, ces lois sont basées sur des cinétiques empruntées aux cultures libres : il s'agit de la classique loi de Monod. L'utilisation d'une telle loi de croissance, adaptée aux biofilms (en utilisant différentes formulations, selon le type d'approche pour modéliser le biofilm) soulève certaines questions :

- Comme on le verra dans le chapitre 2, une bactérie attachée à une surface subit des changements physiologiques et phénotypiques qui mettent en doute la valeur des constantes cinétiques utilisées, issues de mesures en expérience batch, pour des cultures libres.
- Considérer ces paramètres comme intrinsèques (constant) commence à être remis en cause dans la mesure où cette adaptation physiologique est un processus dynamique, les bactéries s'adaptant aux conditions de stress environnemental extérieur.
- Selon les différentes stratégies de modélisation possibles, si ces approches peuvent rendre compte de certains phénomènes, d'autres processus cruciaux sont représentés de manière imparfaite.



Sur ce simple exemple, on voit bien que des progrès dans la connaissance de la dynamique des biofilms à l'échelle locale est un point nécessaire, en complément d'investigations réalisées aux autres échelles. Ceci constitue la motivation de ce travail, et de la contribution apportée à ces questions scientifiques.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit sont consacrés à l'étude des biofilms à l'échelle locale, depuis la taille des bactéries (environ  $1 \mu m$ ) jusqu'à formation d'une structure continue de biofilms de l'ordre de quelques centaines de micromètres. Bien que les dimensions des installations de biofiltration utilisées pour le traitement de l'eau soient à des échelles bien supérieures, le choix de cette échelle d'observation locale de quelques centaines de micromètres est dicté par une volonté de comprendre l'effet de l'hydrodynamique sur les propriétés de croissance de biofilms (distribution spatiale, morphologie, cinétique de croissance) aux échelles pertinentes des objets de traitement : les bactéries.

La démarche scientifique est présentée en six chapitres dans ce manuscrit. Nous verrons dans un premier temps une synthèse bibliographique à propos des biofilms (composition et formation), ainsi que les couplages entre les conditions hydrodynamiques et le développement de biofilms. Dans ce chapitre, nous avons également présenté les techniques d'observation de biofilms les plus utilisées.

Afin de montrer les méthodes, protocoles et dispositifs expérimentaux utilisés dans ce travail, le troisième chapitre est dédié à la présentation détaillée des expériences réalisées au cours de ce travail pour amener à un protocole fiable et reproductible.

Le quatrième chapitre est consacré à la mise en place des outils de traitement et d'analyse d'image que nous avons utilisés.

Sachant que la biomasse du biofilm est supposée proportionnelle au nombre de bactéries initiales, le cinquième chapitre est dédié à la phase de colonisation initiale des supports d'adhésion du biofilm, avec une analyse de la reproductibilité entre les positions analysées et la distribution spatiale.

Dans le sixième et dernier chapitre, nous présentons les méthodes d'analyse des données et les résultats obtenus pour le biofilm formé : la taille de l'image représentative, les fractions volumiques dans la hauteur du biofilm, la distribution spatiale, ainsi que la cinétique de croissance du biofilm. La conclusion générale propose une mise en lumière des résultats essentiels et trace les perspectives qui ont été ouvertes par ce travail de thèse.

## Chapitre 2

# Etat de l'art

Les micro-organismes comme les bactéries, les virus, les champignons, les micro-algues et les protozoaires sont les formes les plus simples de la vie et ils constituent la majorité de la biomasse vivante. Le biofilm est la principale forme de vie microbienne, en conséquence il est de plus en plus étudié en tant que système d'organisation communautaire pour ces micro-organismes (Mann & Wozniak, 2012; Wagner *et al.*, 2010; Briandet *et al.*, 2012).

Comme pour toutes les formes de vie communautaires, les biofilms bactériens confèrent des avantages biologiques importants pour les organismes qui les constituent, comme par exemple le réagencement stratégique des bactéries lorsqu'ils sont exposés à des situations de stress environnementaux (Mann & Wozniak, 2012; Costerton *et al.*, 1995).

Selon Stoodley *et al.* (2002), ces adaptations structurelles et les inter-relations entre les bactéries du biofilm sont rendues possibles par l'expression d'ensemble de gènes qui donnent lieu à des phénotypes qui diffèrent profondément des bactéries de la même espèce sous leur forme planctonique. Ainsi, il existerait un système de communication intra et inter-espèces, utilisé par les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, leur permettant de réguler une variété de fonctions physiologiques. Liu & Tay (2002) rapportent que cette communication entre cellules se fait par le biais de molécules produites par les bactéries. Ce phénomène, appelé *Quorum sensing* ou "cell-to-cell signaling molecules", fournit un mécanisme de contrôle de l'expression génétique en réponse à la densité cellulaire dans le biofilm. Il permet la mise en œuvre d'une autorégulation du biofilm en regard d'un stress environnemental externe. Des études récentes montrent aussi que le *quorum sensing* joue un rôle majeur en permettant aux bactéries de s'organiser en communauté et de construire des structures architecturales complexes (Miller & Bassler, 2001; Bassler, 1999; Liu & Tay, 2002). Ainsi, en termes de propagation d'organismes vivants et de leur aptitude à coloniser des environnements variés, les bactéries sont les formes de vie les plus réussies, les biofilms étant l'un de leurs mécanismes de survie (Costerton *et al.*, 1995).

Les biofilms peuvent entraîner de nombreux problèmes dans divers domaines, comme les complications occasionnées par les contaminations bactériennes, notamment dans le secteur agroalimentaire et dans le domaine médical. Malgré ces inconvénients, on constate que dans plusieurs cas les biofilms ont des effets positifs, ou même vitaux. Par exemple, la colonisation du tractus intestinal est vital pour la digestion. La colonisation de la surface de racines est un élément important pour la dégradation de polluant dans les sols et leur assimilation par certaines plantes.

## 2.1 Qu'est ce qu'un biofilm

Il n'est pas facile de donner une définition que l'on peut considérer comme juste et complète de ce que sont les biofilms. En effet, ils sont le résultat d'un processus cyclique systématique complexe qui comprend le transport et l'adsorption de particules organiques et inorganiques ainsi que de microorganismes sur une surface humide, et, ensuite la production d'EPS (Exopolysaccharides), biopolymères qui sont impliqués dans le processus de fixation du biofilm (Das *et al.*, 2013). Ces assemblages vivants varient considérablement dans leur structure et dans leur composition. Cette variation provient justement de ce processus complexe, qui est influencé par les caractéristiques du lieu de formation du biofilm, les conditions environnementales (nutriment, oxygène, surface d'adhésion, stress environnemental, température et pH) et les molécules présentes initialement sur la surface.

D'une façon plus générale, un biofilm est une communauté de micro-organismes assez complexe, adhérente à une surface et encapsulée dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) produite par les membres de cette communauté. Selon Costerton *et al.* (1995), cette définition inclut les agrégats (par exemple les floes microbiens dans les stations d'épurations) et aussi les populations bactériennes adhérant à des surfaces (par exemple les biofilms dans les pores de milieux poreux). Les biofilms peuvent être constitués d'une ou plusieurs espèces de bactéries et se développer sur des interfaces solides ou liquides variées, que l'on rencontre par exemple dans l'environnement : fond de rivières, cailloux, racines... et dans les organismes vivants : tube digestifs, plaque dentaire, plaies... (Costerton *et al.*, 1987).

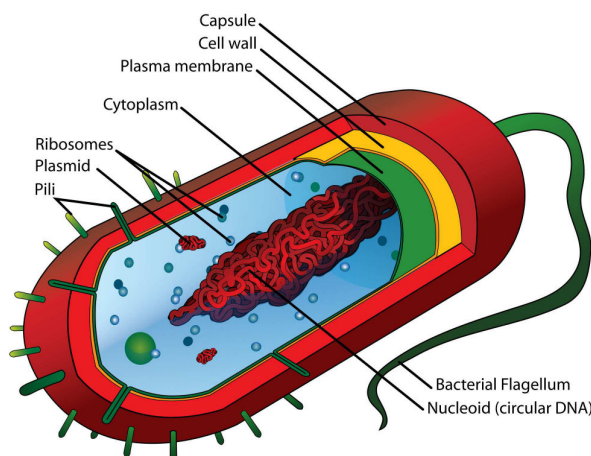
Dans les prochains paragraphes nous allons décrire les principaux composants du biofilm : bactéries et substances polymériques extracellulaires. Nous allons présenter également les étapes de la formation des biofilms et les effets connus ou supposés des conditions hydrodynamiques sur le développement des biofilms.

### 2.1.1 Les bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires procaryotes que l'on peut rencontrer sous différentes morphologies : forme allongée ou en bâtonnets, forme sphérique, forme plus ou moins spiralée. Les biofilms composés de bactéries, qui prédominent dans une gamme variée d'écosystèmes, sont souvent des communautés multi-espèces hautement structurées (Stoodley *et al.*, 2002).

Selon Meyer *et al.* (2004), les bactéries sont les plus petits organismes connus, dotés d'un métabolisme leur permettant de croître et de se diviser par l'assimilation de substances nutritives. Leur diamètre est habituellement d'environ  $1 \mu\text{m}$ . Comme on peut le voir sur la figure 2.1 la cellule apparaît entourée d'une enveloppe rigide, qui lui donne sa forme, sa résistance. Elle entoure une seconde enveloppe beaucoup plus mince et plus délicate, la membrane cytoplasmique. Entre la paroi et la membrane cytoplasmique se trouve un espace appelé espace périplasmique. Le cytoplasme est défini comme étant le matériel biologique inclus dans l'espace entouré par la membrane cytoplasmique : il comprend la phase liquide (cystosol) et les organites. En tant que cellules procaryotes les bactéries sont des organismes particulièrement simples, caractérisées par une absence d'organites plus complexes (comme par exemple : le réticulum endoplasmique,

l'appareil de Golgi, les mitochondries et les chloroplastes). Ainsi, le cytoplasme d'une bactérie contient uniquement des ribosomes, des substances de réserve, des pigments, des vacuoles à gaz et l'appareil génétique (filament d'ADN). En ce qui concerne la locomotion, certaines bactéries possèdent un flagelle, des cils ou une capsule externe, qui sont des composants facultatifs de la cellule procaryote.

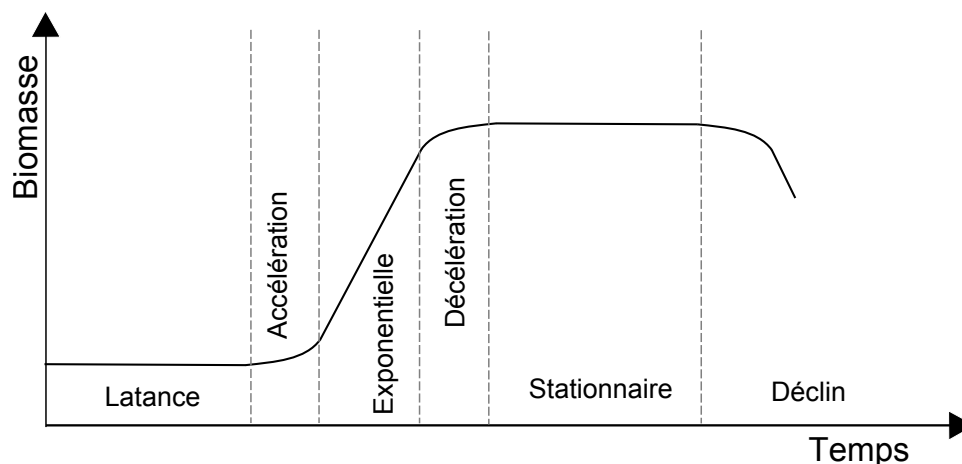


**Figure 2.1** – La structure typique d'une cellule bactérienne qui est un organisme procaryote. (Image réalisé par : Mariana Ruiz Villarreal, LadyofHats (domaine public), via Wikimedia Commons).

Les bactéries sont des organismes asexués et leur reproduction se fait par division cellulaire. On appelle cela un mode de reproduction binaire ou scissiparité. Dans le cas des bactéries, organismes vivants procaryotes, la scissiparité consiste en une simple division d'une bactérie en deux, l'organisme qui en résulte étant génétiquement et morphologiquement identique à l'organisme mère. Ainsi, la croissance bactérienne implique l'augmentation d'une population qui peut se produire en milieu liquide, (bactéries en suspension sous forme dite libre ou planctonique), ou en milieu solide (bactéries adhérentes sur une surface sous forme de biofilm - bactéries dites sessiles).

La croissance bactérienne peut être classiquement représentée selon la figure 2.2. Cette croissance est réalisée en milieu de culture liquide (culture libre) et en conditions de nutriments non renouvelées (en batch). On peut ainsi caractériser différentes phases pour la vitesse de multiplication de la culture bactérienne, phases reconnaissables sur la courbe :

- Phase 'Latence' : il s'agit d'une phase d'adaptation des bactéries au nouveau substrat du milieu (adaptation enzymatique). Au cours de cette période il n'y a pas de division cellulaire, le taux de croissance est nul ( $\mu = 0$ ).
- Phase 'Accélération' : Cette phase correspond au commencement de la division cellulaire.
- Phase 'Exponentielle' : Dans cette phase on observe une croissance rapide où le taux de croissance atteint un maximum ( $\mu = \mu_{max}$ ) et reste constant, avec taux de mortalité presque nul. La durée de la phase exponentielle est très variable en fonction des caractéristiques génétiques des bactéries et des conditions environnementales.
- Phase 'Décélération' : Après une période de croissance exponentielle, les conditions envi-



**Figure 2.2** – Allure typique de la croissance bactérienne en culture libre

ronnementales deviennent défavorables du fait de l'épuisement des nutriments essentiels, de l'accumulation de métabolites toxiques et de la limitation de l'espace disponible.

- Phase 'Stationnaire' : Dans cette phase le taux de croissance devient nul ( $\mu = 0$ ). Les cellules continuent à se diviser et métaboliser, mais une partie des cellules devient non viables. Le taux de division cellulaire est très proche du taux de mort cellulaire, ce qui maintient constant le nombre de cellules viables dans la population. La courbe de croissance atteint un plateau. La durée de la phase stationnaire dépend de l'équilibre entre le taux de division cellulaire et le nombre de cellules qui deviendront non viables (mort cellulaire ou impossibilité de diviser) en raison de conditions environnementales de plus en plus défavorables.
- Phase 'Déclin' : Dans cette phase le taux de croissance est négatif ( $\mu < 0$ ). Au cours de cette phase les cellules perdent leur capacité à se diviser, le taux de mort cellulaire devient supérieur au taux de division et le nombre de cellules viables décroît de façon exponentielle jusqu'à l'extinction complète de la population.

### 2.1.2 Substances polymériques extracellulaires (EPS)

Les substances polymériques extracellulaires (en anglais : extracellular polymeric substances ou EPS) sont des biopolymères produits par divers microorganismes : archées, bactéries et eucaryotes. Dans le cas des systèmes qui nous intéressent, les EPS sont des biopolymères d'origine microbienne dans lesquels les micro-organismes du biofilm sont incorporés. Ces EPS sont soupçonnés de jouer un rôle important dans le développement du biofilm.

Les EPS sont caractérisés par leur apparence gélatineuse. Ils sont responsables de la morphologie, la structure, la cohésion et l'intégrité fonctionnelle des biofilms. Leur composition détermine la plupart de leur propriétés physico-chimiques et biologiques (Wingender *et al.*, 1999).

Selon Flemming *et al.* (2007) ; Das *et al.* (2013), si les biofilms peuvent être vus métaphoriquement comme une "ville de microbes", les EPSs représentent alors les "maisons des cellules du biofilm" car ils les abritent des aléas physiques, biologiques et chimiques rencontrés dans l'environne-

ment où se développe le biofilm. Les EPS ont ainsi plusieurs fonctions dans le biofilm, comme la promulgation de l'adhérence des bactéries sur la surface et entre elles, la formation et la maintenance de la structure du biofilm, l'augmentation de la résistance du biofilm contre le stress environnemental et la protection du biofilm contre les prédateurs (Costerton *et al.*, 1995). Les EPS déterminent ainsi un micro-environnement dans lesquelles vivent les cellules du biofilm, micro-environnement caractérisé par sa structure (porosité, densité, quantité d'eau) et ses propriétés (charge du biofilm, hydrophobie, stabilité mécanique) :

- En terme de stabilité mécanique, les EPS ont ainsi un rôle protecteur contre la dessiccation des biofilms dans les milieux naturels car ils possèdent une grande quantité d'eau avec un très grand nombre de liaisons hydrogènes dans leur structure.
- En terme de réaction à un stress environnemental, ils peuvent entre autre, protéger les micro-organismes d'éléments toxiques. Par exemple, selon des études expérimentales *in vitro*, les cellules bactériennes dans les biofilms sont plus résistantes aux antibiotiques que les cellules de la même espèce à l'état planctonique (Ceri *et al.*, 2001). Teitzel & Parsek (2003) ont ainsi observé que les biofilms étaient entre 2 à 600 fois plus résistants au stress engendré par les métaux lourds que les cellules en culture libre.

Les EPSs comptent entre 50% et 90% de la matière organique totale des biofilms (Evans, 2003). En terme de composition, selon Flemming *et al.* (2007), contrairement à la connaissance commune, les EPSs sont certainement plus que des polysaccharides. Ils comportent, en autre, une grande variété de protéines, des glycoprotéines, des glycolipides et, dans certains cas, des quantités surprenantes de l'ADN extracellulaire. Ainsi en ce qui concerne les biofilms environnementaux, les polysaccharides représentent souvent uniquement un composant mineur du biopolymère. Cependant, les diverses fonctions de l'ADN des biofilms commencent seulement à émerger (Das *et al.*, 2013).

Enfin, selon Leriche *et al.* (2000) le taux de production des EPSs ne dépend pas seulement du type d'organisme mais est également fonction des conditions en termes de nutriments, âge du biofilm, et environnement. Comme on le verra dans un paragraphe ultérieur, les conditions environnementales du point de vue hydrodynamique semblent en particulier avoir une importance cruciale.

### 2.1.3 Formation des biofilms

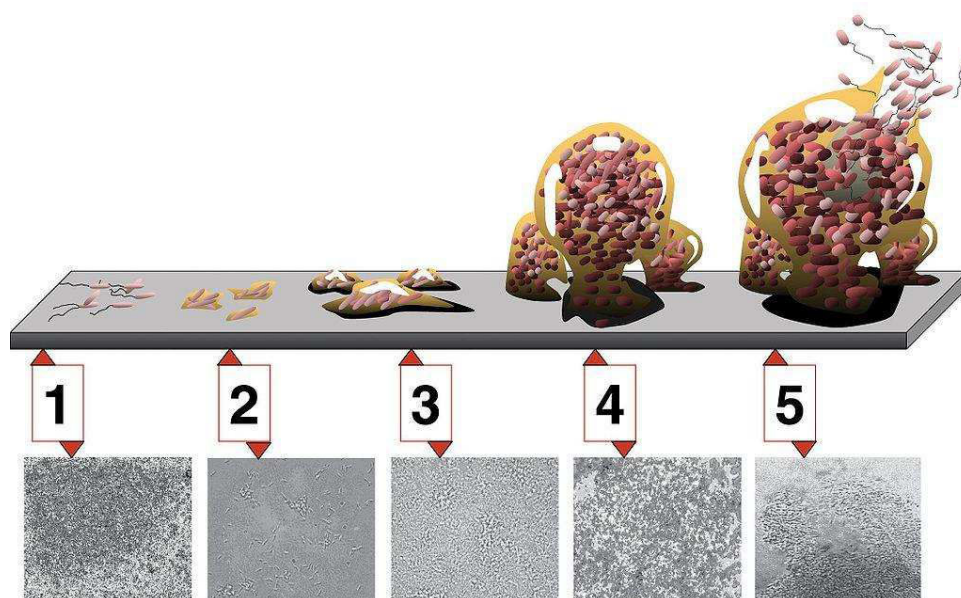
Selon Stoodley *et al.* (2002), on distingue cinq étapes dans le mécanisme de formation des biofilms, comme illustré sur la figure 2.3 :

1. la phase de transport et d'attachement des cellules vers un substrat, ainsi que la création de ce qu'on appelle un film de conditionnement ;
2. l'adhésion des cellules de façon réversible avec la production d'EPS ;
3. le début de la croissance microbienne et de l'évolution de l'architecture du biofilm avec le développement des micro-colonies primaires ;
4. la maturation du biofilm avec le développement des colonies ;



5. le détachement microbien ou le détachement de colonies de biofilm en réponse aux conditions hydrodynamiques.

Suite au détachement, les microorganismes (ou colonies) sont dispersés à nouveau dans le milieu environnant, où ils peuvent coloniser d'autres portions de la surface.



**Figure 2.3** – Les différentes étapes de la formation d'un biofilm . A chaque étape correspond une image de développement d'un biofilm de *P. aeruginosa* (Monroe, 2007).

#### 2.1.4 Modélisation de la cinétique de croissance bactérienne

La plupart du temps, la description des lois de croissance est basée sur des cinétiques empruntées aux cultures libres. L'équation 2.1 présent le modèle le plus utilisé pour décrire la dynamique de la croissance bactérienne :

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - b)X \quad (2.1)$$

où  $X$  est la concentration en biomasse supposée proportionnelle au nombre de cellules,  $\mu$  le taux de croissance bactérienne,  $b$  le coefficient de mortalité et  $t$  est le temps.

Pour l'application de cette équation, il faut trouver des lois de fermeture pour le taux de croissance ( $\mu$ ) et le taux de mortalité ( $b$ ). Supposant une cadence de division cellulaire constante, nous obtenons l'équation de type exponentiel suivante :

$$\frac{X}{X_0} = \exp[(\mu - b)t] \quad (2.2)$$

Le taux de mortalité ( $b$ ) est généralement considéré comme étant constant, cependant le taux de croissance ( $\mu$ ) n'est pas constant et dépend des conditions physico-chimiques. Les substrats, comme le milieu nutritif ou l'oxygène, peuvent éventuellement devenir le facteur limitant de la vitesse spécifique de croissance. Le modèle le plus classique pour cet effet particulier de limitation est le modèle de Monod (éq. 2.3). Le modèle de Monod (1941) est utilisé pour rendre

compte des phases exponentielle, de décélération et stationnaire de la croissance. Les phases de latence, d'accélération et de déclin ne sont pas considérées. Ce modèle vise à déterminer la valeur du taux de croissance  $\mu$ , en faisant une analogie avec les systèmes enzymatiques.

$$\mu = \mu_{max} \prod_{i=1}^n \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i} \quad (2.3)$$

La paramètre  $\mu_{max}$ , le taux de croissance maximum (en général  $h^{-1}$  ou  $j^{-1}$ ), donne le taux de croissance de la population lorsque celle ci n'est pas limitée par la concentration en substrat : la biomasse croit alors de façon exponentielle, et ce d'autant plus vite que  $\mu_{max}$  est grand.  $S_i$  est la concentration du substrat  $i$  dans le milieu de culture.  $K_{S_i}$  est la constante de demi saturation pour le substrat  $i$  et égale en fait à la concentration telle que le taux de croissance soit inférieur de moitié à sa valeur maximale.

Dans l'équation 2.3 on constate bien que les substrats sont des facteurs limitants du taux de croissance bactérienne. La croissance est ralentie si pour un substrat  $i$ ,  $S_i$  est inférieure ou du même ordre de grandeur que  $K_{S_i}$ . Dans le cas contraire, si on suppose que pour tous les substrats la concentration  $S_i$  est considérablement supérieure à  $K_{S_i}$ , on observe une tendance du taux de croissance  $\mu \approx \mu_{max}$ . Enfin, le taux de croissance  $\mu$  dépend de la concentration des substrats utilisés pour la croissance. Si l'un des composés nécessaires à la nutrition des bactéries se trouve en apport limitant, sa concentration règle la vitesse des synthèses cellulaires et le rythme des divisions.

Il existe d'autres modèles que ceux de la loi de Monod. En grande majorité ces modèles sont en fait de simples adaptations de la loi de Monod. Nous devons cependant souligner que tous ces modèles proposés dans la littérature conservent une valeur plus ou moins empirique et sont valables pour une culture pure, un substrat pur et un réacteur fermé. Ainsi nous ne nous étendrons pas plus sur les formulations des cinétiques de croissance. Retenons juste les points suivants :

- s'il existe des effets de l'hydrodynamique sur ces cinétiques, elles n'apparaissent pas explicitement dans ces lois ;
- les paramètres intervenant dans les lois cinétiques ne font apparaître que les conditions physico-chimiques ;
- ces lois relient la concentration de biomasse avec la quantité de bactérie. Cependant, la biomasse dans un biofilm est représentée par la quantité de bactéries conjointement à la quantité d'EPS ;
- les paramètres de la loi de Monod sont calés sur des valeurs expérimentales issues de cultures en batch où les bactéries sont en suspension. Rien ne prouve que les paramètres mesurés soient encore valables dans les biofilms sous écoulement.

Enfin, la loi de Monod a été établie pour des bactéries en suspensions libres, dans des conditions très favorables de croissance. Ainsi il est difficile d'utiliser les lois similaires à la loi de Monod, pour caractériser les cinétiques de croissance à l'échelle du biofilm.



### 2.1.5 Couplages entre les hydrodynamiques et le développement du biofilm

Les conditions hydrodynamiques, particulièrement la vitesse d'écoulement et les forces résultantes comme par exemple le taux de cisaillement, influencent fortement la structure et la morphologie du biofilm, aussi bien que la répartition des microorganismes et leur activité. Les différentes études menées sur le développement des biofilms en présence de conditions hydrodynamiques variées, montrent que les caractéristiques du biofilm comme la quantité de biomasse fixée, la production d'EPS, la densité et l'épaisseur, varient considérablement suivant le taux de cisaillement imposé. Les travaux cités ici sont référencés dans les tableaux 2.1 et 2.2.

L'effet du cisaillement sur la structure et le comportement du biofilm est observé dès le commencement de la formation de biofilm. Ainsi, [Lecuyer \*et al.\* \(2011\)](#) et [Mbaye \(2011\)](#) ont observé l'effet de la contrainte de cisaillement sur des caractéristiques de l'adhésion des cellules bactérienne sur supports solides. [Mbaye \(2011\)](#) a mis en évidence que l'augmentation du temps de contact initial et de la force ionique favorise l'adhésion cellulaire. Il a également observé le caractère discret du détachement : le détachement a lieu lorsqu'un seuil de contrainte est atteint. Ce seuil est caractérisé par une augmentation brusque de la quantité de cellules détachées (Fig. 2.4). En ce qui concerne le taux d'adhésion, [Lecuyer \*et al.\* \(2011\)](#) ont observé que l'augmentation de la contrainte de cisaillement entraîne une augmentation de l'efficacité du transport des bactéries vers la surface accompagné d'une diminution de la probabilité d'adhésion sur la surface ("sticking efficiency" en anglais) : le nombre de bactéries adhérentes décroît exponentiellement avec le taux de cisaillement. Ils ont également observés que le temps de séjour caractéristique de bactéries sur la surface avant d'être détachées, augmente approximativement linéairement avec le cisaillement tant que l'on est en deçà d'une valeur critique d'environ 3 Pa (Fig. 2.5). Au delà de cette valeur, la probabilité de détachement augmente (diminution du temps caractéristique). Cela est à relier à l'effet de seuil constaté par [Mbaye \(2011\)](#).

En terme d'activité métabolique des cellules bactériennes, les conditions hydrodynamiques semblent aussi avoir une importance cruciale. [Qi \*et al.\* \(2008\)](#) ont constaté que plus la contrainte de cisaillement imposée est élevée, plus le temps nécessaire pour que les micro-organismes s'acclimatent aux conditions environnementales est long.

[Mbaye \(2011\)](#) quant-à-lui a mesuré des valeurs expérimentales du taux de croissance des bactéries *P. Putida* adhérentes sur une surface lors de la phase initiale de développement du biofilm, pour différents taux de cisaillement imposés, en écoulement laminaire. Ces mesures ont été comparées au taux de croissance de ces mêmes bactéries en culture libre. Les résultats présentés sur la figure 2.6 montrent le changement du taux de croissance le taux de cisaillement, ainsi que les écarts entre les taux de croissance obtenus pour les bactéries fixées et les cultures libres. Il est à noter que les taux de croissances mesurés, quelles que soient les conditions d'écoulement, correspondent à la phase exponentielle, comme illustré dans les courbes cinétiques de croissance de la figure 2.6.

[Simões \*et al.\* \(2007\)](#) ont montré quant à eux que les cellules d'un biofilm généré par un écoulement turbulent ont une taille réduite, avec une diminution de leur activité métabolique. Cette différence de l'activité métabolique est évaluée au travers de l'activité respiratoire (lami-

| Auteur  | numérique ou expérimentale | Micro-organisme                            | Echelle        | Dimension  | Caractéristiques hydrauliques  |
|---|----------------------------|--|----------------|--|--|
| <a href="#">Davit et al. (2011)</a>   | expérimentale              | L'eau brute de la rivière Garonne (France) | milieux poreux | $l = 40 \text{ mm}$ , $d_{int} = 3.5 \text{ mm}$ , Matériau granulaire : $d = 500 \text{ à } 3000 \text{ }\mu\text{m}$ | $Q = 6 \text{ mL/min}$ , $3.5 \text{ mL/min}$ , $0.007 \text{ mL/s}$ et $0.5 \text{ mL/s}$   |
| <a href="#">Duddu et al. (2009)</a>   | numérique                  |  | biofilm        | chambre semi-circulaire $2 \times 0.5 \text{ mm}$ et rayon= $25 \text{ }\mu\text{m}$                                   | $u = 0.83 \text{ mm/s}$ ( $Re = 0.83$ ) et $u = 6.7 \text{ mm/s}$ ( $Re = 6.7$ )   |
| <a href="#">Picioreanu et al. (2000a)</a> , testée par <a href="#">Duddu et al. (2009)</a>          | numérique                  |  | biofilm        | chambre semi-circulaire $2 \times 0.5 \text{ mm}$ et rayon= $25 \text{ }\mu\text{m}$                                   | $u = 0.83 \text{ mm/s}$ ( $Re = 0.83$ ) et $u = 6.7 \text{ mm/s}$ ( $Re = 6.7$ )   |
| <a href="#">Chopp et al. (2002, 2003)</a> (méthode testée par <a href="#">Duddu et al. (2009)</a> ) | numérique                  |  | biofilm        | chambre semi-circulaire $2 \times 0.5 \text{ mm}$ , rayon= $25 \text{ }\mu\text{m}$                                    | $u = 0.83 \text{ mm/s}$ ( $Re = 0.83$ ) et sans écoulement   |
| <a href="#">Lecuyer et al. (2011)</a>   | experimental et numerique  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>              | biofilm        | $3 \text{ cm} \times 200 \text{ }\mu\text{m}$ ou $400 \text{ }\mu\text{m} \times 65 \text{ }\mu\text{m}$               | $Q = 0.1 \text{ }\mu\text{L/min}$ ( $\tau_w = 10^{-2} \text{ Pa}$ ) à $Q = 80 \text{ }\mu\text{L/min}$ ( $\tau_w = 10 \text{ Pa}$ )  |
| <a href="#">Lemos et al. (2015)</a>   | expérimentale              | <i>Bacillus cereus</i>                     | biofilm        | Le biofilm se développe autour des cylindres : $l = 5 \text{ cm}$ , $d_{int} = 2.2 \text{ cm}$                         | $Re = 1000$ ( $\tau_w : 0.02 \text{ Pa}$ ). $Re = 3200$ ( $\tau_w = 0.12 \text{ Pa}$ ) et $Re = 4000$ ( $\tau_w = 0.17 \text{ Pa}$ )   |
| <a href="#">Liu &amp; Tay (2002)</a>  | review                     |  |                |  |  |
| <a href="#">Mbaye (2011)</a>  | expérimentale              | <i>Pseudomonas putida</i>                  | biofilm        | $28 \text{ mm} \times 17 \text{ mm} \times 250 \text{ }\mu\text{m}$  | Expérience détachement : $Q_{min} = 2.13 \text{ ml/min}$ ( $u_{mean} = 0.008 \text{ m/s}$ , $Re = 2$ , $\tau_w = 0.2 \text{ Pa}$ )<br>$Q_{max} = 750 \text{ ml/min}$ ( $u_{mean} = 2.94 \text{ m/s}$ , $Re = 735$ , $\tau_w = 70.6 \text{ Pa}$ )<br>Expérience croissance initiale : $Q_{min} = 0.1 \text{ ml/min}$ ( $Re = 0.09$ , $\tau_w = 9 \text{ Pa}$ )<br>$Q_{max} = 10.63 \text{ ml/min}$ ( $Re = 10$ , $\tau_w = 1000 \text{ Pa}$ ) |

Table 2.1 – Travaux concernant les couplages entre les conditions hydrodynamiques et le développement de biofilm

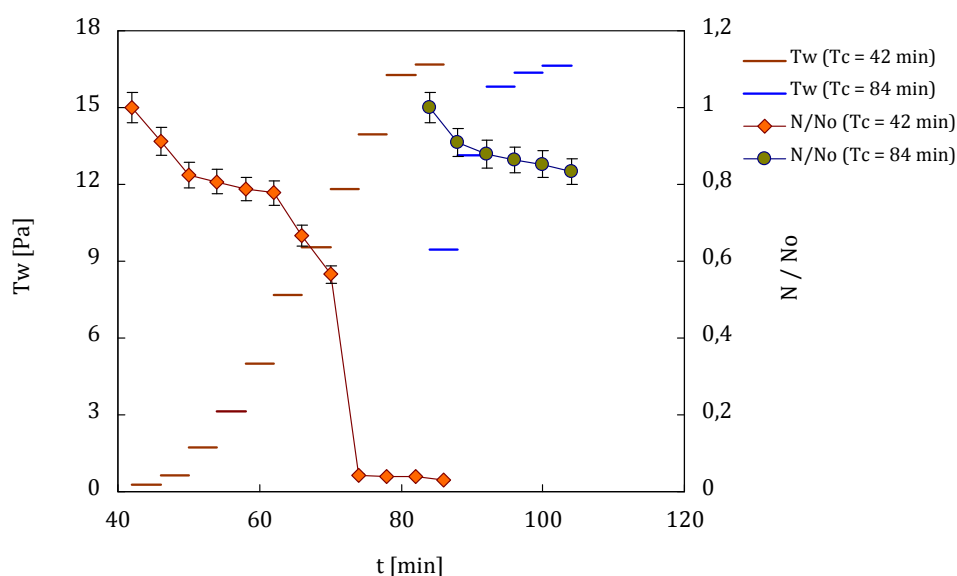
| Auteur                             | numérique ou expérimentale | Micro-organisme   | Echelle | Dimension   | Caractéristiques hydrauliques  |
|------------------------------------|----------------------------|---|---------|---|--|
| Qi <i>et al.</i> (2008)            | expérimentale              | biofilm bactérien (bactérie non précisé)  | biofilm | Le biofilm se développe autour des cylindres : $l = 53 \text{ mm}$ , $d_{int} = 53 \text{ mm}$  | $u = 0.032, 0.056 \text{ et } 0.089 \text{ m/s}$   |
| Pereira <i>et al.</i> (2002)       | expérimentale              | <i>Pseudomonas fluorescens</i>  | biofilm | tube semi-circulaire $l = 50 \text{ cm}$ , $d_{int} = 1.5 \text{ cm}$ . Pièce amovible pour évaluer le biofilm : $2.34 \text{ cm}^2$                  | Laminaire : $Re = 2000$ , $u = 0.21 \text{ m/s}$ ;<br>Turbulent : $Re = 5500$ , $u = 0.51 \text{ m/s}$   |
| Rusconi <i>et al.</i> (2011)       | experimental et numerique  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>   | biofilm | $6 \text{ mm} \times 200 \mu\text{m} \times 85 \mu\text{m}$ angles dans le canal : $210^\circ$ à $330^\circ$  | $Q = 0.5, 1.0 \text{ et } 1.5 \mu\text{L/min}$   |
| Simões <i>et al.</i> (2007)        | expérimentale              | <i>Pseudomonas fluorescens</i>  | biofilm | tube semi-circulaire : $l = 45 \text{ cm}$ , $d_{int} = 1.6 \text{ cm}$ . Pièce amovible pour évaluer le biofilm : $1.75 \times 1.25 \text{ cm}$      | Laminaire : $Re = 2000$ , $u = 0.20 \text{ m/s}$ ;<br>Turbulent : $Re = 5200$ , $u = 0.532 \text{ m/s}$  |
| Stoodley <i>et al.</i> (1999)      | expérimentale              | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .<br><i>Pseudomonas fluorescens</i> .<br><i>Klebsiella pneumoniae</i> et<br><i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | biofilm | $200 \text{ mm} \times 3 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$  | $Re = 0$ à $5275$ ( $\tau_w = 10.11 \text{ Pa}$ )  |
| Tsai (2005)                        | expérimentale              | biofilm bactérienne (bactérie non précisé)  | biofilm | Le biofilm se développe autour des cylindres : $l = 18.1 \text{ cm}$ , $d_{int} = 15.6 \text{ cm}$  | $u = 20 \text{ cm/s}$ ( $\tau_w = 0.07 \text{ Pa}$ ), $u = 40 \text{ cm/s}$ ( $\tau_w = 0.17 \text{ Pa}$ ) et $u = 60 \text{ cm/s}$ ( $\tau_w = 0.29 \text{ Pa}$ ) |
| Vieira <i>et al.</i> (1993)        | expérimentale              | <i>Pseudomonas fluorescens</i>  | biofilm | tube semi-circulaire : $l = 50 \text{ cm}$ , $d_{int} = 2.06 \text{ cm}$ . Pièce amovible pour évaluer le biofilm : $0.99 \times 10^{-2} \text{ m}^2$ | Expérience transfert de masse : $Re = 8250$ à $14700$ ( $u = 0.34$ à $0.61 \text{ m/s}$ )  |
| Vrouwenvelder <i>et al.</i> (2010) | expérimentale              | biofilm bactérien (bactérie non précisé)  | biofilm | $0.07 \text{ m} \times 0.30 \text{ m} \times 0.04 \text{ m}$  | Effet d'écoulement sur la cohésion du biofilm : $Q = 6 \text{ L/h}$ ( $u = 0.06 \text{ m/s}$ ) et $Q = 30 \text{ L/h}$ ( $u = 0.31 \text{ m/s}$ )                  |

**Table 2.2** – Travaux concernant les couplages entre les conditions hydrodynamiques et le développement de biofilm

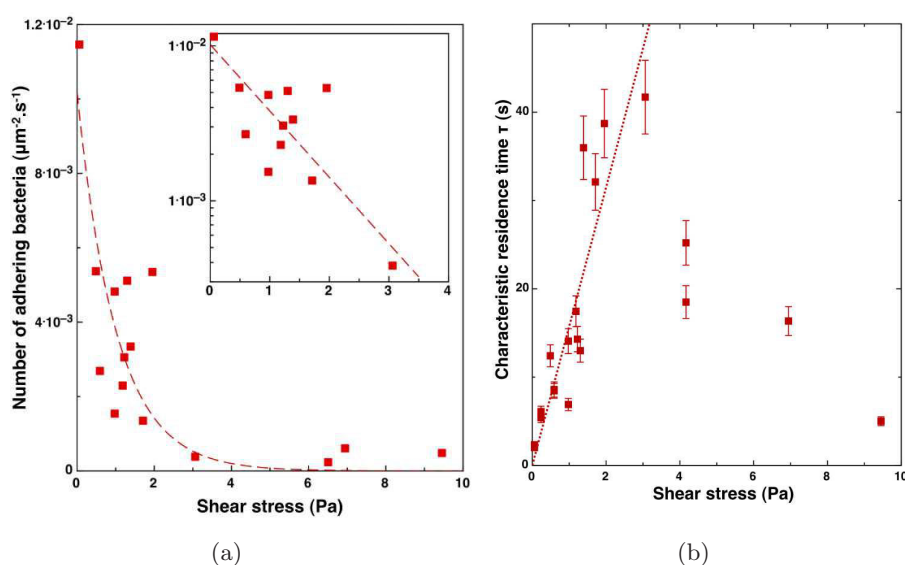
naire :  $4.94 \times 10^{-17} \text{ mgO}_2\text{cell}^{-1}\text{min}^{-1}$  ; turbulent :  $6.40 \times 10^{-19} \text{ mgO}_2\text{cell}^{-1}\text{min}^{-1}$ ).

Il faut d'ailleurs à ce stade distinguer l'activité métabolique des cellules individuelles dans le biofilm de l'activité totale du biofilm. En particulier, l'activité globale du biofilm va dépendre de processus hydrodynamiques liés au transfert de masse, mais aussi à la structure du biofilm (morphologie, densité cellulaire, résistance au transfert...).

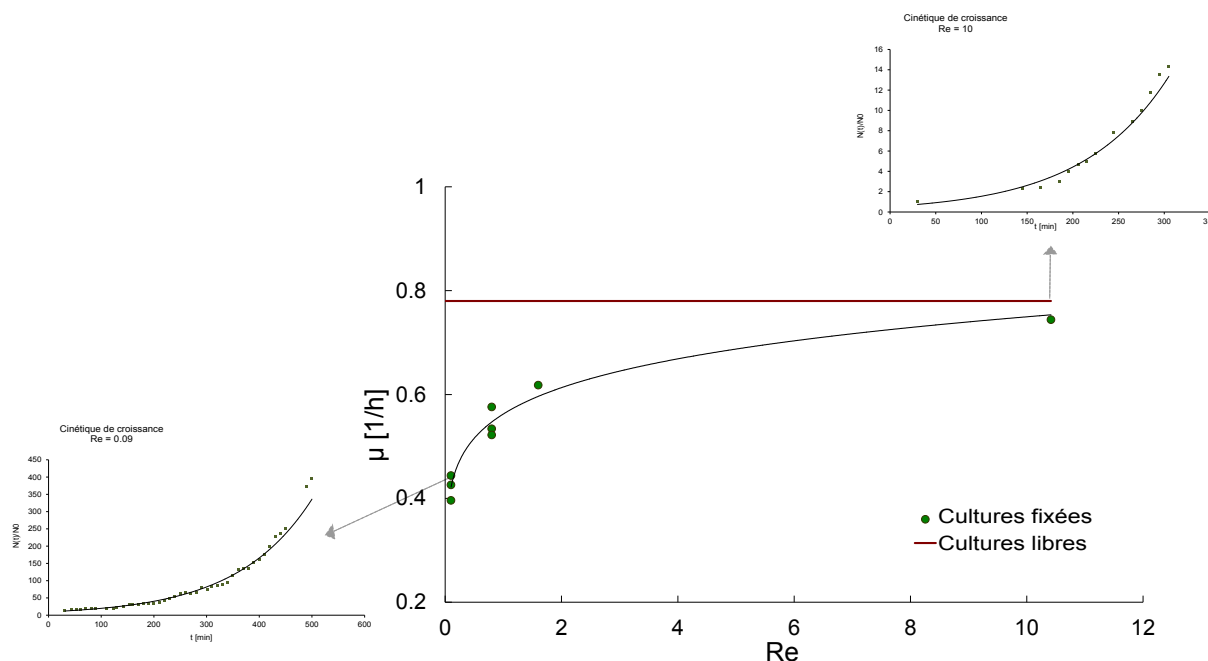
Ainsi, des auteurs tels que [Lemos \*et al.\* \(2015\)](#); [Vrouwenvelder \*et al.\* \(2010\)](#); [Qi \*et al.\* \(2008\)](#);



**Figure 2.4** – [Mbaye \(2011\)](#) : Influence du temps de contact initial et de l'effet d'histoire du cisaillement sur le taux de détachement cellulaire - Evolution de  $N/No$  et de  $T_w$  en fonction du temps à différents temps de contact ; Expérience 1 :  $T_c = 42 \text{ min}$ ,  $No = 306$ , avec augmentation graduelle à partir de  $0.25 \text{ Pa}$  ; Expérience 2 :  $T_c = 84 \text{ min}$ ,  $No = 264$ , avec application brusque d'un cisaillement de  $9.50 \text{ Pa}$  suivi d'une augmentation graduelle de  $T_w$ .  $\text{CaCl}_2$  à  $50 \text{ mM}$  ; Température =  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ .



**Figure 2.5** – [Lecuyer \*et al.\* \(2011\)](#) : (a) influence de la contrainte de cisaillement sur le taux d'adhésion ; (b) influence de la contrainte de cisaillement sur le temps de séjour caractéristique.

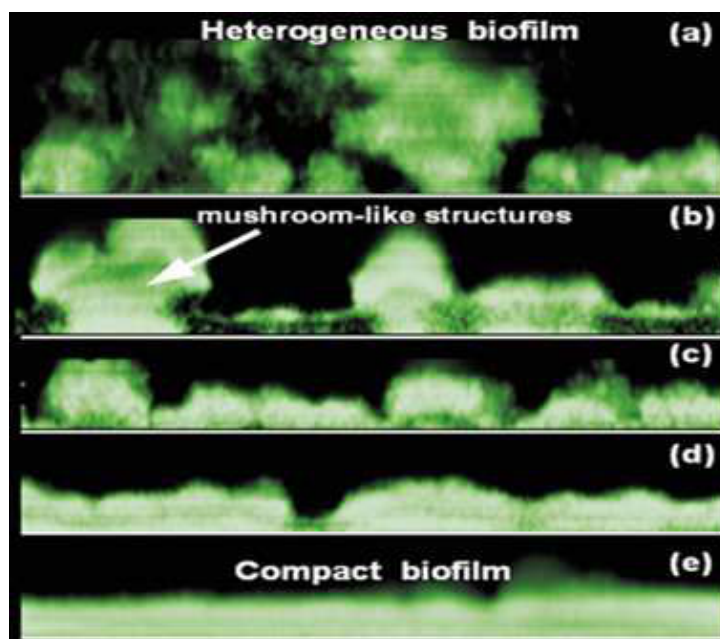


**Figure 2.6** – Mbaye (2011) : Evolution du taux de croissance en fonction du Reynolds. Les taux de croissances mesurés correspondent à la phase exponentielle, comme illustré dans les courbes “Cinétique de croissance” à Reynolds égal à 0.09 et 10.

Liu & Tay (2002); Pereira *et al.* (2002); Stoodley *et al.* (1999); Vieira *et al.* (1993) ont constaté que le taux de cisaillement (en condition laminaire ou turbulente) détermine la morphologie du biofilm. Plus le taux de cisaillement est élevé, plus les biofilms développés sont compacts et denses avec une morphologie moins hétérogène qu’en laminaire (Fig.2.7). Ils présentent aussi une cohésion entre les microorganismes plus importante par rapport aux biofilms développés à un plus bas taux de cisaillement.

Une partie de l’explication de cette morphologie différente est liée au fait que le taux de cisaillement provoque un détachement du biofilm plus ou moins important (érosion continue ou détachement de patch). Ce phénomène s’accompagne de l’attachement ou ré-attachement plus ou moins important des bactéries dans une autre zone, entraînant une redistribution spatiale des bactéries. Le rôle important que peut prendre la géométrie du système d’écoulement sur cette morphologie est reporté par Rusconi *et al.* (2011). Ils ont mis en évidence que la variations du champ hydrodynamique dû au changement de la tortuosité de microcanaux (leur système d’étude) influence également la structure du biofilm. Ils observent notamment la formation de “streamers” (la formation d’élongations dans la structure du biofilm), attribués à d’écoulement secondaire.

En ce qui concerne les phénomènes de transfert, Vieira *et al.* (1993) et Lopez *et al.* (2003) constatent que la diffusion interne dans le biofilm est fortement dépendante des conditions hydrodynamiques imposées par le fluide circulant au-dessus de la couche microbienne (en conditions turbulentes). Les changements de structure observés (biofilm plus mince et dense, avec une plus forte cohésion entre les composants du biofilm quand le cisaillement augmente) s’accompagnent d’une diffusivité interne moins importante. Le coefficient de transfert de masse interne dans le



**Figure 2.7** – Différentes structurations du biofilm : la contrainte de cisaillement pariétal augmente entre les clichés (a) et (e)

biofilm ne semble pas changer de manière significative dans la gamme de cisaillement ou Reynolds étudié.

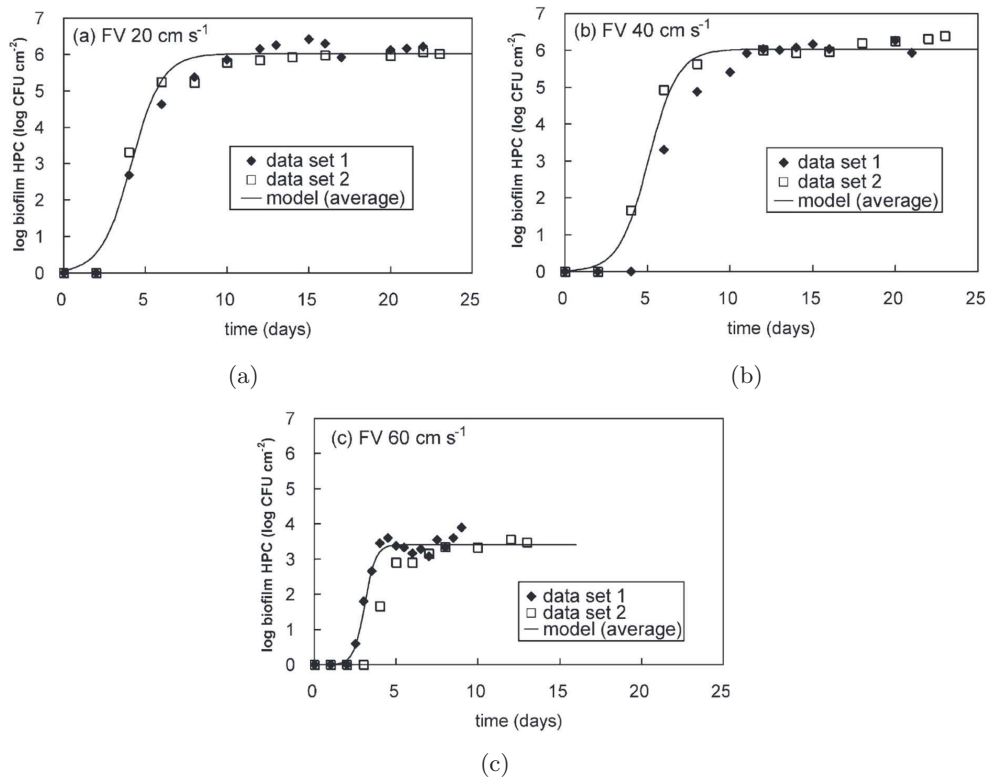
En ce qui concerne la production d'EPS, [Qi \*et al.\* \(2008\)](#) ont démontré que la sécrétion des exopolymères est une sorte de réponse physiologique défensive du micro-organisme à l'augmentation des contraintes de cisaillement. L'augmentation brusque des contraintes de cisaillement sur le biofilm augmente significativement la sécrétion d'exopolymères après une période d'acclimatation. Ils interprètent cette réponse biologique des bactéries à travers un renforcement de la matrice d'EPS comme une protection contre les forces exercées par le fluide. Néanmoins, une fois que le biofilm a rétabli un état d'équilibre, la sécrétion des EPS chute à volume relativement constant.

[Lemos \*et al.\* \(2015\)](#) ont observé que les biofilms formés sous plus fort taux de cisaillement étaient plus résistants à des traitements mécaniques, ou une combinaison entre un traitement chimique et mécanique, par rapport à ceux formés sous taux de cisaillement plus faibles. Cependant, ils n'ont pas trouvé une relation directe entre l'augmentation de la contrainte de cisaillement et la production d'EPS.

[Simões \*et al.\* \(2007\)](#) quant à eux ont observé que le biofilm généré par un écoulement turbulent produisait moins de matrice de polymère extracellulaire que les biofilms générés par un écoulement laminaire. Ce fait est associé à la diminution de l'activité métabolique cellulaire déjà évoquée dans un paragraphe précédent. Cependant l'activité globale du biofilm en condition turbulente est plus grande (malgré cette diminution de l'activité métabolique) car ils observent à la fois une plus grande densité cellulaire (nombre de cellules/cm<sup>2</sup>) et une plus grande masse de biofilm par unité de surface.

[Tsai \(2005\)](#) ont rapporté un effet de la vitesse d'écoulement sur le comportement dynamique

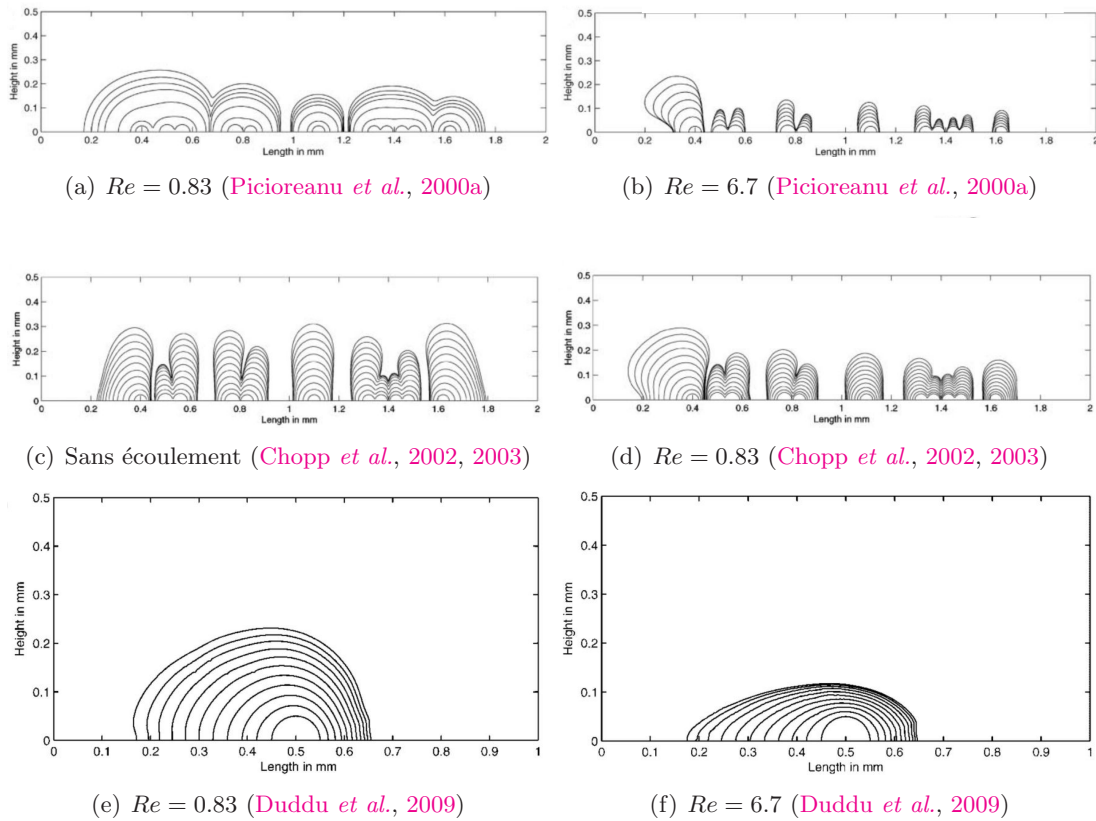
des bactéries du biofilm. Les résultats expérimentaux ont montré que la quantité de cellule (en  $\text{CFU}/\text{cm}^2$ ) du biofilm était indépendante de l'écoulement pour des contraintes de cisaillement égale à 0.07 et 0.17  $\text{Pa}$  mais était significativement affectée lorsque la contrainte de cisaillement a été augmentée jusqu'à 0.29  $\text{Pa}$  (réduction de quantité des bactéries en terme de  $\text{CFU}/\text{cm}^2$ ) (Fig.2.8). Leur conclusion est que l'augmentation de la contrainte de cisaillement pouvait favoriser à la fois la diffusion des nutriments et de l'oxygène dans le biofilm ainsi que le transport de bactérie vers la surface. Cependant, si le cisaillement est excessif, la formation du biofilm n'en est pas facilité dans la mesure où ces contraintes de cisaillement excessives entraînent le détachement du biofilm et son endommagement. Selon [Duddu et al. \(2009\)](#) il est clair que les critères de détachement basés uniquement sur la forme de la structure du biofilm, sans prendre en compte les effets d'écoulement local, ne sont pas appropriées. La figure 2.9 montre les simulations numériques présentées dans leur travail. Ces observations sont à relier aux effets de seuils déjà observés par [Lecuyer et al. \(2011\)](#) et [Mbaye \(2011\)](#).



**Figure 2.8** – [Tsai \(2005\)](#) : Cinétique de croissance bactérienne à différents taux de cisaillement.

En conclusion, on constate ainsi que la résistance au transfert dépend des conditions hydrodynamiques imposées mais également de la structure du biofilm. On observe qu'une contrainte de cisaillement élevée peut conduire à une augmentation de la turbulence, ce qui facilite le transport de masse dans le biofilm. Par voie de conséquence, le biofilm se structure de manière plus compacte, à cause d'une contrainte de cisaillement élevée, qui à son tour peut réduire la diffusivité du substrat dans les biofilms. Pour résumer, les conditions hydrodynamiques peuvent avoir un double effet sur la structure du biofilm ([Qi et al., 2008](#); [Liu & Tay, 2002](#)).





**Figure 2.9** – Duddu *et al.* (2009) : (a) et (b) Croissance du biofilm simulé en utilisant le modèle cinétique de Picioreanu *et al.* (2000a) (a)  $Re = 0.83$ ;  $t = 0, 1, 2, 3, 3.5, 4, 4.5$  jours (b)  $Re = 6.7$ ;  $t = 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120$  jours ; (c) et (d) Croissance du biofilm simulé en utilisant le modèle cinétique de Chopp *et al.* (2002, 2003) (c) Sans écoulement,  $t = 0, 1.2, 3, 5, 7, 9, 11.2, 13.4, 15.6, 17.8, 20$  jours et (d)  $Re = 0.83$ ;  $t = 0, 0.06, 1.4, 2.5, 3.7, 4.9, 6, 7.3, 8.5, 9.6, 10.7$  jours ; (e) et (f) Croissance du biofilm simulé en utilisant le modèle cinétique de Duddu *et al.* (2009), les résultats sont pour le taux de détachement élevé ; (e)  $Re = 0.83$ ;  $t = 0, 1.1, 2.4, 3.8, 5.2, 6.7, 8.2, 9.6, 11.1, 12.4, 13.8$  jours. (f)  $Re = 6.7$ ;  $t = 0, 0.07, 1.5, 2.1, 3, 3.6, 4.4, 5.1, 5.8, 6.4, 6.9$  jours.

## 2.2 Technique d'observation

La mesure de la croissance bactérienne en biofilms peut être réalisée par différentes techniques, comme les mesures directes (par exemple la détermination du poids sec ou humide), ou les mesures indirectes (comme la turbidité, densité optique  $DO$ ). Ces techniques, classiquement utilisées en microbiologie, permettent uniquement d'observer dans un environnement donné le comportement global d'une population microbienne : les résultats obtenus représentent la moyenne du comportement de chaque individu constituant la population observée.

Ces résultats obtenus avec ces techniques classiques peuvent être intéressantes car on obtient un résultat statistique général. Cependant, comme nous l'avons expliqué auparavant, dans le biofilm, pour lequel le mécanisme organisationnel n'est que partiellement connu, ces structures complexes permettent l'adaptation de la population globale aux stimuli exogènes. Ils assurent ainsi des fonctions spécifiques des populations structurées (Paolozzi, 2015). Ainsi, on constate



que pour mieux comprendre le processus de structuration du biofilm, il est nécessaire d'avoir une observation à l'échelle bactérienne.

La microscopie électronique à transmission (MET) et la microscopie électronique à balayage (MEB) sont utilisées pour évaluer la structure de biofilms. Ces techniques fournissent des images à haute résolution, cependant elles ont des limites liées à la pénétration de l'échantillon et nécessitent la déshydratation de l'échantillon, ce qui peut perturber l'observation de la structure du biofilm. L'observation au microscope confocal à balayage laser (CLSM), conjointement avec le marquage fluorescent du biofilm est la technique la plus souvent utilisée pour acquérir des données à propos du biofilm. Cette méthode permet l'observation non destructive dans l'étude *in situ* des biofilms. Il permet aussi l'étude de la structure physique des biofilms (reconstruction 3D), le suivi du développement d'un biofilm, et l'évaluation de la réponse d'un biofilm à l'environnement (Carvalho & Fonseca, 2007). Cette technique d'observation du biofilm est accompagnée de l'acquisition, du traitement et de l'analyse d'images.

Kuehn *et al.* (1998) ont proposé une méthode automatisée pour l'acquisition et l'analyse d'image. Pour l'analyse d'images, ils ont utilisé un outil d'analyse d'image (QUANTIMET 570). Pour tester cette méthode, des biofilms monocultures développés sur chambre d'écoulement ont été observés sous microscope confocal. Selon les auteurs, les résultats obtenus sont compatibles avec d'autres travaux expérimentaux. Givskov *et al.* (2000) et Xavier *et al.* (2003) ont également développé des programmes pour l'analyse 3D du biofilm. Le programme développé par Givskov *et al.* (2000) (Comstat) utilise un seuillage manuel des images acquises, tandis que Xavier *et al.* (2003) propose un seuillage automatique. Pour tester ces programmes d'analyse d'images, Givskov *et al.* (2000) ont également développé des biofilms monocultures formés sur chambre d'écoulement et observés sous microscope confocal. Xavier *et al.* (2003) ont testé leur programme avec des images de biofilms provenant de différentes configurations expérimentales. Beyenal *et al.* (2004b) ont développé davantage les programmes réalisés par Givskov *et al.* (2000), Xavier *et al.* (2003) et leur programme (ISA). Cela a permis d'obtenir un unique programme qui traite un plus grand nombre de paramètres d'une façon automatique (seuillage automatique), obtenant ainsi une méthode décrivant mieux la structure du biofilm. Pour la binarisation des images, ils ont utilisé la méthode de seuillage "sélection itérative", car ils ont supposé qu'une procédure automatique est plus reproductible que dans le cas d'opérateurs humains (Beyenal *et al.* (2004a) et Yang *et al.* (1999)).

Cependant, on constate que la détermination d'un seuil pour la binarisation des images est un travail complexe et à part entière. Pour extraire les paramètres morphologiques statistiquement significatifs à partir d'une série d'images du biofilm, une méthode fiable et précise de seuillage d'image est nécessaire. Selon Yang *et al.* (2001), les seuillages des images du biofilm présentent une difficulté supplémentaire par rapport à d'autres études citées dans la littérature : la détection des bords dans le biofilm. Des études utilisant des matériaux fluorescents ou des cellules microbiennes isolées possédant généralement une taille standard, constituent une référence pratique pour estimer la précision des procédures d'analyse d'image appliquée. Dans le cas du biofilm, il n'y a pas une taille standard car il présente plusieurs tailles d'agrégats différents.

Le choix du seuil est subjectif et, dans une méthode manuelle, dépend de la compréhension de l'opérateur à propos du contenu analysé. Ainsi, idéalement, une méthode automatisée est préférable pour éviter le jugement personnel de l'opérateur. [Yang et al. \(2001\)](#) ont vérifié la performance de cinq types de seuillages automatiques d'image. Ils ont utilisé le seuillage manuel comme référence pour évaluer la précision des procédures de seuillage. En comparant les résultats des seuillages automatiques réalisés avec le seuillage manuel, la méthode de sélection itérative (utilisé par [Beyenal et al. \(2004b\)](#)) présente un meilleur résultat par rapport aux autres méthodes automatiques testées.

Pourtant, il est difficile d'affirmer qu'une méthode automatique de seuillage des images sera appliquée avec succès sur tous les biofilms et sur la totalité du biofilm. Généralement, selon la densité du biofilm et la profondeur de la couche observée, le passage de la lumière est plus ou moins perturbé, entraînant des images plus bruitées, ce qui complique davantage l'automatisation du seuillage.

Comme indiqué précédemment, pour obtenir des résultats acceptables, il est indispensable d'avoir une méthode fiable de seuillage d'image. On estime qu'un seuillage automatique est important, d'autant plus dans la mesure où une quantité d'images considérable est nécessaire pour avoir des données représentatives. En revanche, afin d'avoir des données fiables, un contrôle visuel systématique s'impose. Ce contrôle nécessaire peut être réalisé en comparant les images traitées aux images originales.

## 2.3 Microfluidique

Pour mieux comprendre les effets de l'hydrodynamique sur le biofilm à micro échelle, des systèmes microfluidiques ont été utilisés, permettant l'observation des cellules individuelles sous conditions environnementales contrôlées.

La microfluidique apparaît dans les années 1990 comme une branche des systèmes microélectromécaniques, plus connus en Anglais sous l'acronyme de MEMS (pour Micro Electro Mechanical Systems). Selon [Tabeling \(2003\)](#), la microfluidique est la discipline qui étudie la manipulation et le contrôle de fluides simples ou complexes, mono ou multiphasiques dans des microsystèmes artificiels. La dimension des canaux microfluidiques (hauteur ou largeur) doit être comprise entre  $1 \mu m$  et  $1 mm$ .

Les dispositifs microfluidiques trouvent leur application dans divers domaines comme les systèmes analytiques, les dispositifs biomédicaux, les outils de la chimie et de la biochimie, et les systèmes pour la recherche fondamentale ([McDonald et al., 2000](#)). Nous pouvons observer dans le tableau [2.3](#) que les dimensions caractéristiques des éléments d'intérêt de la microbiologie s'appliquent bien à la microfluidique. Ainsi, à micro-échelle, les systèmes microfluidiques sont de plus en plus utilisés pour observer le développement du biofilm ([Tabeling, 2003](#)).

Comme vu dans la section [2.1.3](#), après l'attachement des bactéries à la surface, les bactéries forment des microcolonies dont l'évolution se traduit par la formation d'un biofilm dont la dimension caractéristique en terme de hauteur varie dans une gamme allant d'une dizaine à quelques milliers de microns. La technologie microfluidique est donc déjà bien adaptée car les échelles de tailles visées (de la bactérie au biofilm lui même) sont compatibles avec la plupart

des technologies développées dans le domaine de la microfluidique.

Ces systèmes permettent de contrôler précisément les conditions hydrodynamiques et des paramètres environnementaux tels que la température et la pression. Ce contrôle, dans des dispositifs miniaturisés, offre de nombreuses perspectives en recherche dans le domaine de l'analyse des biofilms (Whitesides, 2006). En particulier, la maîtrise des conditions environnementales à petite échelle offre la possibilité d'étudier plus finement l'étude de l'évolution de leur structure sous différentes contraintes dont les contraintes induites par les conditions hydrodynamiques. Cette observation à l'échelle locale a permis un progrès considérable de la recherche dans les domaines de la biologie cellulaire.

| Element                             | Taille          |
|-------------------------------------|-----------------|
| Epaisseur de la membrane cellulaire | 10 nm           |
| Lysosome                            | 200 nm          |
| Prokaryote                          | 1-10 $\mu m$    |
| Bactérie <i>E.Coli</i>              | 2 $\mu m$       |
| Mitochondrie                        | 3 $\mu m$       |
| Eucaryote                           | 10 - 30 $\mu m$ |

**Table 2.3** – Tailles de cellules et constituants cellulaires Tabeing (2003).

### 2.3.1 Les avantages et inconvénients de la microfluidique

En tant que technologie, la microfluidique offre de nombreux avantages et peu d'inconvénients (Whitesides, 2006). La microfluidique permet d'analyser et de manipuler des cellules individuelles avec des conditions environnementales bien précises. Les informations chimiques et biochimiques ne sont plus réduites à une moyenne sur une population macroscopique mais deviennent disponibles pour chaque cellule.

Par rapport à des expériences réalisées à macro-échelle, la microfluidique présente plusieurs avantages comme : (i) le coût plus faible pour la fabrication et l'utilisation du système d'écoulement; (ii) la diminution du temps d'analyse; (iii) la réduction de la consommation de réactifs; (iv) la réduction de la production de sous-produits potentiellement nocifs (McDonald *et al.*, 2000); (v) la manipulation et la stérilisation de petites quantités, ce qui réduit considérablement le risque de contamination par d'autres microorganismes et (vi) une plus grande facilité à mettre en œuvre des expériences en parallèles (ou en séries), ce qui accélère l'acquisition de données.

Cependant, les systèmes microfluidiques présentent quelques inconvénients. Par exemple, la quantité considérable des étapes à suivre lors de la fabrication des moules et des systèmes microfluidiques. Un autre inconvénient est lié au fait que les petits canaux peuvent s'obstruer facilement : par conséquent les systèmes microfluidiques sont difficilement réutilisables car ils sont difficiles à nettoyer. En toute rigueur, chaque expérience nécessite une nouvelle fabrication (Becker & Gartner, 2000). Dans le prochain paragraphe nous citerons quelques avantages et inconvénients spécifiques des micro-chambres d'écoulement conçue avec l'élastomère Polydiméthylsiloxane (PDMS).

### 2.3.2 Polydiméthylsiloxane - PDMS

L'élastomère PDMS est le matériau le plus couramment utilisé en microfluidique principalement pour les applications en microbiologie en raison de ses nombreux avantages en regard des quelques inconvénients qu'il génère. C'est une technologie dite "douce" et ces méthodes ont pour principe la réalisation d'une puce à partir d'un moule.

Selon [McDonald \*et al.\* \(2000\)](#), le PDMS est un excellent matériau pour la fabrication de systèmes de micro-canaux pour une utilisation avec des échantillons biologiques dans des solutions aqueuses. Plusieurs raisons sont avancées : (i) il est optiquement transparent de sorte qu'il peut être utilisé pour un certain nombre de schémas de détection ; (ii) il durcit à des températures basses ; (iii) il est non toxique ; les bactéries peuvent être cultivées directement sur les systèmes microfluidiques ; (iv) il peut être déformé de manière réversible ; (v) il peut être scellé à lui-même ou dans autre matériau de manière réversible ou irréversible après le traitement de la surface au plasma (à l'échelle atomique avec la formation de liaisons covalentes) ; (vi) sa chimie de surface peut être contrôlée par des techniques relativement bien développées et (vii) en tant qu'élastomère, il peut se mouler parfaitement sur les surfaces bien lisses ou rugueuses, ainsi que former des détails à l'échelle du micron avec une grande fidélité et une grande facilité de reproduction (réplique par moulage). Un autre avantage est que le PDMS est un matériau peu coûteux, simple et rapide à mettre en oeuvre.

Cependant, le PDMS a quelques inconvénients. Les plus contraignants pour les cultures d'organismes sur puce sont : (i) le PDMS est un élastomère hydrophobe et il est difficile de le mouiller avec des solutions aqueuses. Ainsi, il peut y avoir la formation de bulles à l'intérieur du système de micro-canaux difficiles à enlever (nucléation des bulles) ; (ii) Il est sujet à l'adsorption des espèces hydrophobes ; (iii) on constate une certaine évaporation des phases aqueuses à travers le PDMS ; (iv) il est souvent incompatible avec l'utilisation de solvants inorganiques, ou avec des solutés organiques de faible poids moléculaire et (v) il est également sensible aux températures élevées. Malgré ces limitations d'utilisation, le PDMS est le dispositif microfluidique le plus utilisé en microbiologie comparé aux autres élastomères ou plastiques.

## 2.4 Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre, nous permettent de rendre compte du degré important du couplage entre l'hydrodynamique et la dynamique bactérienne, avec l'influence évidente du régime d'écoulement sur l'activité et la composition du biofilm.

On observe l'influence de l'hydrodynamique sur le transfert de nutriments et d'oxygène à l'intérieur du biofilm, mais également sur la structure et la morphologie du biofilm (production d'EPS, taux de croissance, détachement, densité, porosité ...), avec un fort couplage entre les mécanismes physiques, biologiques et chimiques.

De ce fait, l'objectif de cette étude consiste à mettre au point une méthodologie pour étudier l'influence des paramètres hydrodynamiques sur le développement du biofilm mono espèce (bactérie *Pseudomonas Putida*) à l'échelle locale. On cherche à analyser l'influence éventuelle d'un changement du "stress" hydrodynamique sur la distribution spatiale, la morphologie et

la cinétique de croissance bactérienne dans le biofilm. Ce travail de recherche vise également à obtenir des données quantitatives représentatives de la formation du biofilm avec les analyses en trois dimensions à l'échelle locale.

Pour que les données soient plus faciles à interpréter, les expériences doivent se produire dans un environnement contrôlé. Pour cela, en se basant sur les connaissances acquises de la littérature, une micro-cellule d'écoulement a été conçue dans l'optique d'imposer un cisaillement contrôlé dans la zone d'étude. Nous avons utilisé deux modèles des chambres d'écoulement microfluidique : une chambre d'écoulement avec l'élastomère PDMS et une chambre d'écoulement en PMMA (polyméthacrylate).

## Chapitre 3

# Matériels et Méthodes

Ce chapitre est consacré aux méthodes, protocoles et dispositifs expérimentaux utilisés au cours de ce travail afin de procéder à la culture et à l'observation des biofilms.

On présente dans un premier temps le système biologique utilisé (micro-organisme et milieu de culture). En particulier certains tests ont été effectués afin de définir le protocole optimal pour la préparation du milieu de culture et la pré-culture des bactéries.

Dans un deuxième temps, les divers dispositifs expérimentaux développés au cours de la thèse sont présentés. Une attention particulière est portée sur le cœur de ces dispositifs, à savoir les micro-chambres d'écoulements utilisées dans ce travail. En particulier, en plus d'une chambre en PMMA (précédemment utilisée dans la thèse de [Mbaye \(2011\)](#), mais que nous avons modifiée), nous avons développé un nouveau dispositif basé sur une technique de moulage et l'utilisation d'un polymère (PDMS). La qualification de l'hydrodynamique des chambres est présentée dans cette partie à partir de simulations numériques.

Enfin, dans un troisième temps, nous présentons la technique d'observation mise en œuvre dans la thèse. Cette technique est basée sur l'utilisation d'un microscope confocal et nécessite l'utilisation de fluorochromes. De nombreux tests, destinés à valider la possibilité ou non, de visualiser certains composants du biofilm sont présentés dans cette partie ainsi que des tests permettant de jauger la compatibilité des divers fluorochromes entre eux.

### 3.1 Système biologique

#### 3.1.1 Souche bactérienne

Le microorganisme sélectionné pour cette étude est la souche bactérienne *Pseudomonas putida* DSM 6521 (L'Institut Leibniz DSMZ-Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires). Nous la noterons *P. putida* par la suite.

*P. putida* est une bactérie gram-négative qui se trouve couramment dans les sols et les milieux aquatiques ([Pardo & Guadalix, 1996](#)). Elle a déjà été utilisée dans les travaux de thèse de [Mbaye \(2011\)](#). Il s'agit d'une bactérie non pathogène qui peut dégrader un grand nombre de composés différents du carbone, y compris certains d'entre eux qui sont des polluants toxiques. Cette bactérie est couramment utilisée pour la bio-remédiation dans les industries pétrolières et chimiques. Elle se développe par duplication cellulaire selon un métabolisme énergétique pure-

ment respiratoire (organisme aérobic strict). Pour son développement, elle n'a pas de facteurs de croissance particuliers, en dehors de carbone et également d'azote et de phosphore.

*Pseudomonas* est un genre de microorganisme unicellulaire en forme de bâtonnet droit (diamètre : 0.7 à 1.1  $\mu\text{m}$ ; longueur : 2.0 à 4,0  $\mu\text{m}$ ). Elle peut se développer dans une gamme de température comprise entre 4 et 40°C. La croissance à 4°C est relativement faible; au-delà de 40°C, la croissance est impossible. La croissance de *P. putida* est optimale pour un pH proche de la neutralité (pH = 6.8); elle est impossible en dessous de 4.5 (Palleroni, 1984). Selon Rochex *et al.* (2004), la surface cellulaire de *P. putida* est hydrophile en raison d'un fort caractère "donneur d'électrons", comme le révèle la méthode de partition MATS (Microbial Adhesion To Solvents). Power *et al.* (2007) ont également confirmé ce caractère hydrophile par des mesures d'angle de contact ( $\theta$  compris entre 36° et 49°  $\pm$  8° selon le substrat d'adhésion)

### 3.1.2 Milieux de culture

En microbiologie, un milieu de culture est un milieu qui possède des éléments essentiels à la multiplication des bactéries et permet leur développement. Deux milieux de culture sont utilisés pour étudier le comportement des bactéries *P. putida* : le milieu liquide Luria Broth (LB) et le milieu solide Luria Broth Agar (LA).

#### 3.1.2.1 Milieu Luria Broth (LB)

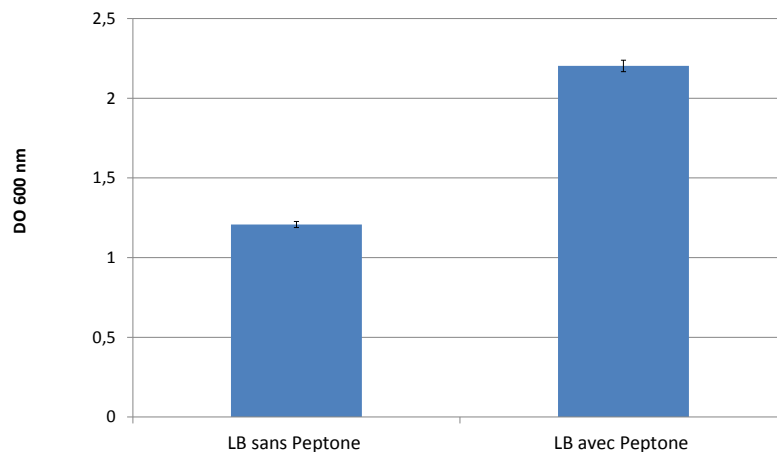
Le milieu de culture LB est une solution standard classiquement utilisée pour effectuer des cultures bactériennes. La solution LB est constituée de trois composants principaux : extraits de levure, peptone caséine et chlorure de sodium. Les extraits de levure fournissent des vitamines, des acides aminés et de l'azote, essentiels à la croissance des bactéries. La peptone constitue une source de peptides et d'acides aminés. Le chlorure de sodium est ajouté pour maintenir la solution à une force ionique donnée et apporter également des minéraux nécessaires à la croissance bactérienne. La solution est ajustée à pH 7 et autoclavée à 121°C pendant 20 minutes.

Le milieu de culture qui circule dans la chambre d'écoulement et celui utilisé pour l'élaboration de la pré-culture sont des variations du milieu LB. Les sections suivantes présentent les essais pour établir la meilleure formule de ce milieu, qui sera utilisée au cours de cette étude. Nous avons ainsi analysé l'effet des différents milieux de culture sur la croissance bactérienne de *P. putida*. Pour simplifier le calcul du taux de croissance, le milieu nutritif doit être composé d'un nombre réduit de composants (substrats), tout en permettant la croissance des bactéries. Deux variations du milieu LB ont été testées, il s'agit du milieu LB sans Peptone et du milieu LB avec Peptone (LB standard).

Nous avons préparé un volume de 100 ml de chaque milieu en 4 exemplaires. Une colonie de bactéries est prélevée sur la boîte de petri avec le milieu LA préparé la veille (voir la section 3.1.2.3). Les bactéries *P. putida* ont été cultivées dans ces milieux de culture pendant 25 heures. La population de bactéries en suspension a ensuite été déterminée par la mesure de la densité optique  $DO_{600}$  (absorbance à 600 nm).

Les résultats de la mesure de la densité optique pour les deux variations du milieu LB sont présentés sur la figure 3.1. Comme nous pouvons le constater, dans le milieu LB avec peptone, la valeur de  $DO_{600}$  de la suspension bactérienne est plus grande que celle dans les milieux LB

sans peptone : environ 1 unité plus élevée. Ceci correspond à environ 40% d'augmentation de la  $DO_{600}$ . La même courbe montre que le milieu LB sans Peptone assure déjà le développement de la suspension bactérienne. Comme expliqué dans le paragraphe précédent, on cherche le milieu constitué d'un nombre réduit de composants pour simplifier le calcul du taux de croissance. C'est pour cette raison que le milieu LB sans peptone a été choisi pour alimenter la chambre d'écoulement. Il contient : 5 g/l de l'extrait de levure et 5 g/l de chlorure de sodium. Par la suite, nous appelons ce milieu "le milieu LB modifié".



**Figure 3.1** – Densité optique moyenne (absorbance 600 nm) pour les deux milieux de culture : milieu LB sans Peptone et milieu LB avec Peptone (LB standard)

### 3.1.2.2 Milieu Luria Broth Agar (LA)

Le milieu Luria Broth Agar est en fait un milieu Luria Broth standard dans lequel on ajoute 9g/l d'agar solidifié. La solution est également ajustée à pH 7. Après stérilisation en autoclave (121°C pendant 20 minutes), le milieu est versé dans des boîtes de Pétri stériles et laissé à refroidir et à solidifier sous hotte à flux laminaire. Les boîtes ainsi préparées sont utilisées pour stocker les cultures bactériennes.

### 3.1.2.3 Pré-culture

La pré-culture est la solution bactérienne de *P. putida* qui sera diluée pour être injectée dans la chambre d'écoulement pour la colonisation initiale de la surface d'observation.

Dans les travaux de Mbaye (2011), la pré-culture était préparée à partir d'échantillons de *P. putida* prélevés à partir d'une boîte de pétri fournie par le LTHE et contenant du milieu de culture solide LA. Pour préparer cette boîte de pétri, selon le mode de préparation du laboratoire LTHE, une culture contenant 20% de glycérol stérile, conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$ , est préalablement décongelée (culture stock). Elle est inoculée dans un milieu LB standard pendant 24 heures sous agitation à 180 rpm et à  $T = 30^{\circ}\text{C}$ . Cette culture bactérienne est ensuite étalée sur une boîte de pétri contenant le milieu LA pendant 48 heures. La boîte de pétri est conservée



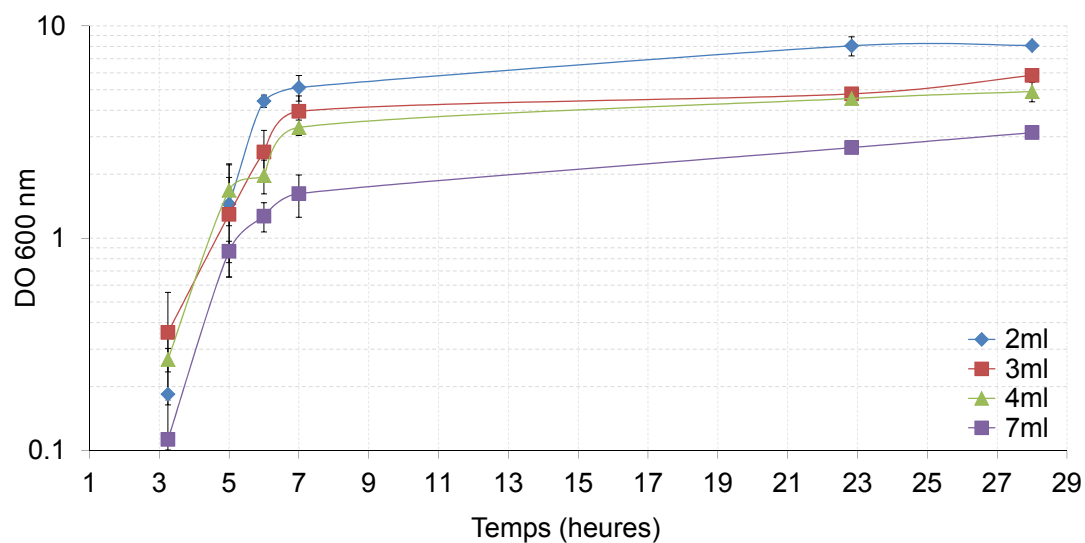
à  $4^{\circ}\text{C}$  et utilisée pendant plusieurs semaines. Cependant, à  $T = 4^{\circ}\text{C}$ , les bactéries peuvent continuer à se multiplier, et il peut y avoir aussi un changement de métabolisme des bactéries. De plus, la décongélation et la recongélation répétitive de la culture peuvent également affecter le métabolisme de ces cellules.

Pour que les expériences soient reproduites dans des conditions identiques, un mode de préparation du milieu de culture plus rigoureux a été mis en place. Ainsi la culture est prélevée sans être décongelée au moyen d'un inoculateur en inox. Elle est ensuite étalée sur des boîtes de pétri contenant le milieu LA. Le milieu est cultivée pendant 23 heures à  $30^{\circ}\text{C}$  dans un incubateur statique. Après 23 heures, un prélèvement sur la boîte est réalisé pour la préparation de la pré-culture. La colonie prélevée est ensuite incubée dans un milieu de culture LB jusqu'à atteindre la phase exponentielle où les bactéries sont en conditions optimales. Nous obtenons ainsi notre pré-culture.

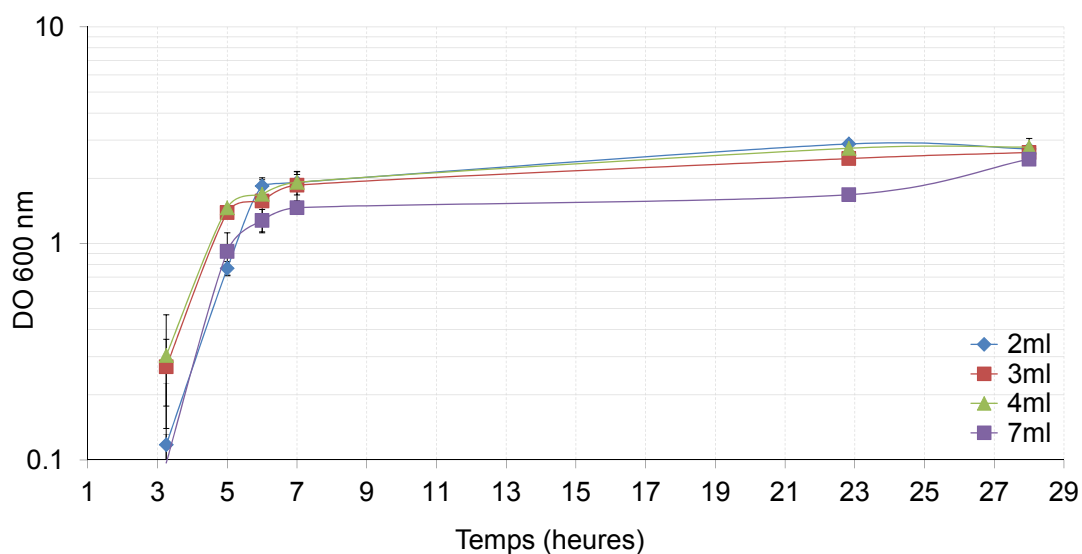
Il est possible d'utiliser le milieu LB standard ou modifié pour préparer la pré-culture car ces deux milieux ont des avantages et des inconvénients. En utilisant le milieu LB standard pour la pré-culture, les bactéries vont atteindre la phase exponentielle beaucoup plus vite qu'avec le milieu de culture LB modifié. Par contre il va y avoir un changement de milieu de culture au moment de la dilution de la pré-culture, dans la mesure où la pré-culture est diluée avec le milieu LB sans peptone avant d'être injectée dans la chambre d'écoulement remplie également avec le milieu LB sans peptone. Selon [Sherwood et al. \(2010\)](#), le passage d'un milieu riche à un milieu pauvre (shift-down) provoque une croissance en équilibre instable, car les vitesses de synthèses des composants cellulaires varient les unes par rapport aux autres, jusqu'à ce qu'un nouvel état d'équilibre soit atteint. Dans l'expérience de shift-down, il y a une période de latence parce que les cellules ont besoin de temps pour fabriquer les enzymes nécessaires à la biosynthèse de nutriments disponibles. Les cellules deviennent plus petites et se réorganisent, d'un point de vue métabolique, jusqu'à ce qu'elles soient capables de se développer à nouveau. En utilisant directement le milieu LB modifié, il n'y a pas de changements de milieux de culture pendant les essais. Ainsi les bactéries ne ressentent pas le stress provoqué par un changement du milieu de culture qui peut occasionner des modifications de leur comportement.

Afin de déterminer le milieu de culture, le volume et le temps d'inoculation pour atteindre la phase exponentielle, des mesures des cinétiques de croissance des bactéries ont été effectuées. La cinétique de croissance est mesurée pour quatre volumes différents de chaque milieu : 2, 3, 4 et 7 ml. Afin d'établir de façon rigoureuse la quantité de bactéries initiale à utiliser dans l'expérience de développement de biofilm, nous avons mesuré la cinétique de croissance. Pour cela, nous avons prélevé sous hotte à flux laminaire une colonie sur la boîte de pétri qui a ensuite été inoculée dans les quatre milieux différents. De manière générale, on considère qu'une seule bactérie donne une seule colonie (Unité Formant Colonie - UFC) sur un milieu de culture LA (boîte de pétri). Des milieux de culture contenant des colonies prélevées à partir de la boîte de pétri sont cultivés dans une étuve à température constante  $T = 30^{\circ}\text{C}$  et sous agitation de 180 rpm. Les valeurs de  $DO_{600}$  de chaque échantillon sont relevées au cours du temps d'incubation.

Afin de vérifier la reproductivité de l'expérience, à chaque analyse trois exemplaires ont été comparés. La figure 3.2, montre l'évolution de la  $DO_{600}$  en fonction du temps d'inoculation. La



(a) Cinétique de croissance bactérienne : milieu LB avec peptone



(b) Cinétique de croissance bactérienne : milieu LB sans peptone

**Figure 3.2** – Cinétique de croissance bactérienne ( $DO_{600}$ ) avec la bactérie *P. putida* et les milieux LB sans et avec peptone.

figure (a) correspond au milieu LB sans peptone, et la figure (b) correspond à celui avec peptone. Les valeurs de  $DO_{600}$  correspondent aux valeurs moyennes des trois exemplaires analysés. Le tableau 3.1 montre le taux de croissance bactérienne pour les différents milieux LB avec différents volumes.

Comme évoqué auparavant, des précautions ont été prises pour que la quantité de bactéries initiale soit la plus constante possible (prélèvement d'une colonie sur le milieu LA). Malgré cela, nous ne pouvons pas avoir une certitude que la quantité de bactéries initiale inoculée est la même

| Volume Milieu LB | $\mu$ ( $[h^{-1}]$ )<br>LB sans peptone | $\mu$ ( $[h^{-1}]$ )<br>LB avec peptone |
|------------------|---|---|
| 2 ml             | 1.0                                     | 1.2                                     |
| 3 ml             | 0.7                                     | 0.7                                     |
| 4 ml             | 0.7                                     | 0.8                                     |
| 7 ml             | 1.0                                     | 0.9                                     |
| Moyenne          | 0.85                                    | 0.9                                     |

**Table 3.1** – Taux de croissance bactérienne  $\mu$  dans la phase exponentielle pour les différents milieux LB.

pour tous les exemplaires. Les valeurs de  $DO_{600}$  mesurées à l’instant zéro ne peuvent pas être prises en compte car l’erreur de mesure de l’instrument d’analyse de la  $DO$  (spectrophotomètre) est grande par rapport à la mesure de la  $DO$  initiale ( $DO_{600}$  initiale proche de 0.002). De ce fait, les courbes de cinétique de croissance bactérienne ne peuvent pas être normalisées.

Comme observé sur les courbes présentées sur la figure 3.2, les pentes de la phase exponentielle pour les deux milieux (milieu LB sans et avec peptone) sont semblables. Cette observation est confirmée par le tableau 3.1, où les taux de croissance bactérienne dans la phase exponentielle sont du même ordre de grandeur. Ainsi nous considérons que la peptone n’influence pas (ou très peu) la phase exponentielle.

Pour la préparation de la pré-culture, nous cherchons à avoir un volume présentant un temps d’incubation adapté pour les essais de développement du biofilm. Comme évoqué précédemment, le prélèvement de la pré-culture doit être fait pendant la phase exponentielle, où le taux de croissance est maximal et le taux de mortalité presque nul. La pré-culture doit également avoir une concentration bactérienne importante.

Comme mentionné antérieurement le taux de croissance bactérien dans la phase exponentielle pour les deux milieux de culture sont du même ordre de grandeur. Ainsi, nous avons choisi d’utiliser le milieu LB sans peptone car, comme cela a déjà été dit auparavant, l’avantage d’utiliser le milieu de culture LB modifié est qu’on évite un changement de milieu de culture au moment de la dilution de la pré-culture ou au moment de l’injection des bactéries dans la chambre d’écoulement, précédemment remplie avec le milieu LB modifié. Ainsi, les bactéries ne seront pas soumises à un effet “shift-down” qui provoque une croissance en équilibre instable.

Pour la suite de travail, nous allons utiliser un volume de 3 ml LB modifié pour la préparation de la pré-culture. Le prélèvement de la solution bactérienne sera réalisé après 4 heures d’incubation ( $T = 30^\circ$  sous agitation à 180 rpm), ce qui correspond à une  $DO_{600}$  d’environ 1, autrement dit, vers le milieu de la phase exponentielle. Ce temps d’incubation est adéquat et adapté à la logistique nécessaire à la mise en place du protocole expérimental complet.

En conclusion, dans ce travail, le microorganisme sélectionné pour le développement du biofilm mono-espèce est la bactérie *P. putida*, déjà utilisée dans les travaux de thèse de Mbaye (2011). Différents milieux de cultures ont été étudiés, dans le but de trouver un compromis entre la composition du milieu de culture et les temps de cultures des biofilms ou des pré-cultures. Ainsi, un milieu plus simple en terme de sources de carbone rend plus facile d’éventuelles interprétations ultérieures en terme de cinétique de croissance. Il s’est avéré qu’un milieu LB

sans peptone offrait un tel compromis car la peptone influence très peu la croissance.

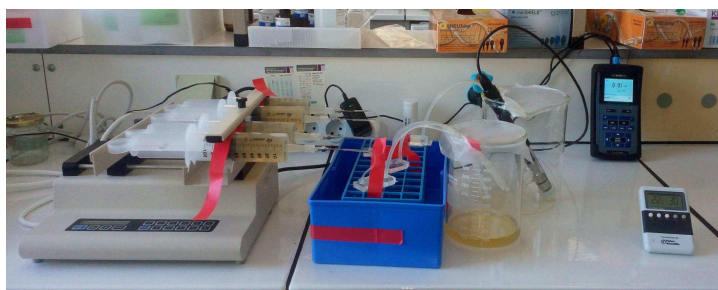
Pour assurer une reproductibilité des expériences que nous réaliserons, il était en outre nécessaire de s'assurer, que dès la phase de pré-culture, l'état métabolique des bactéries prélevées pour établir cette pré-culture soit le plus stable possible. C'est pourquoi nous avons modifié le protocole standard utilisé jusque-là. En particulier, (i) nous évitons la décongélation de la culture stock pour effectuer le prélèvement bactérien permettant la préparation des boîtes de pétri qui seront incubées et serviront à l'inoculation des pré-cultures (ii) ces boîtes de pétri ne sont pas conservées pour être réutilisées et une boîte de pétri est préparée systématiquement à chaque fois qu'une pré-culture est nécessaire. De même, pour éviter des effets de shift-down (passage d'un milieu riche à un milieu pauvre) et un stress bactérien, le milieu LB modifié sans peptone sera utilisé quelles que soient les étapes au cours des expériences (pré-culture, croissance du biofilm)

## 3.2 Dispositifs expérimentaux

Le dispositif expérimental est composé des éléments suivants : un système d'injection du milieu nutritif (LB modifié), une chambre d'écoulement où le biofilm est développé, un microscope pour faire la visualisation et la capture des images, un réservoir à l'aval pour la récupération des déchets.

Pour étudier le développement du biofilm sous faible cisaillement, un pousse-seringue multicanaux (KDSscientific, modèle Legacy 220) est utilisé pour alimenter la chambre d'écoulement (Fig.3.3). Pour étudier le développement du biofilm sous fort cisaillement, le pousse-seringue est remplacé par un système d'alimentation gravitaire à pression constante (Fig.3.4).

Ce second système est composé : d'un réservoir de stockage, d'une pompe-péristaltique et d'un deuxième réservoir (réservoir d'alimentation) avec un dispositif de débordement. Le dispositif fonctionne grâce à un système de double récipient (réservoir d'alimentation) où le niveau de la colonne d'eau est gardé constant, selon le schéma illustratif de la figure 3.5. Le dispositif de débordement permet d'envoyer le fluide vers la chambre d'écoulement avec un débit constant : le débordement du fluide dans le réservoir d'alimentation est renvoyé dans le réservoir de stockage pour garder un niveau constant du milieu LB modifié et ainsi une alimentation en continue.



**Figure 3.3** – Système d'alimentation pousse-seringue multicanaux



Figure 3.4 – Système d'alimentation à débit constant

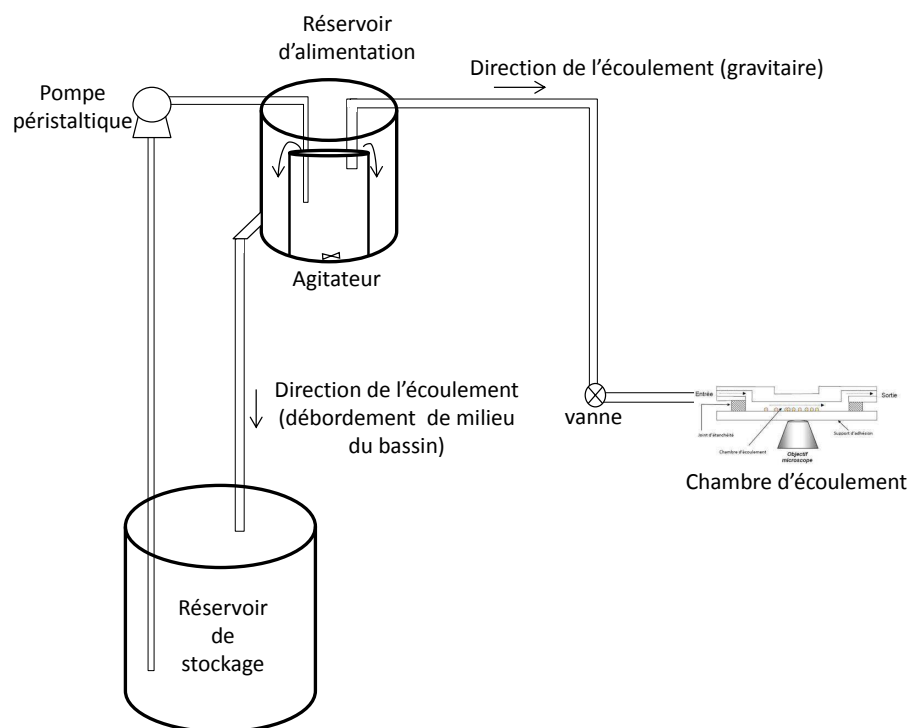


Figure 3.5 – Schéma illustratif du système gravitaire

### 3.2.1 Chambre d'écoulement

Nous avons utilisé des chambres d'écoulement dans l'optique d'étudier le développement de la croissance des bactéries de *P. putida* et l'influence éventuelle de l'écoulement sur ce développement et sur la structure du biofilm à micro échelle (quelques centaines de microns).

Les 3 chambres présentées par la suite utilisent comme plaque inférieure une lamelle en verre borosilicaté transparent. L'angle de contact de la lamelle en verre après la procédure de nettoyage (éthanol à 70% puis rinçage avec de l'eau type 1 stérilisée) est de  $37^\circ$ . Par la suite nous dénommerons les dimensions des chambres d'écoulement et ses composants : "l" pour la longueur, "w" pour la largeur et "h" pour la hauteur.

#### 3.2.1.1 Chambre d'écoulement pour l'observation au microscope à fluorescence

Pour les observations des biofilms sous microscope à fluorescence, une chambre d'écoulement micronique a été spécialement conçue pendant la thèse de Mbaye (2011) (Fig. 3.6.a). Un schéma illustratif est présenté sur la figure 3.6.b. La plaque supérieure en polyméthacrylate de méthyle (PMMA) a les dimensions suivantes :  $l = 75 \text{ mm}$ ,  $w = 25 \text{ mm}$ , et  $t = 13 \text{ mm}$ . Elle est percée de puits d'entrée et de sortie. La plaque inférieure (lamelle en verre) sert de support d'adhésion aux bactéries. Ses dimensions sont :  $l = 22 \text{ mm}$ ,  $w = 32 \text{ mm}$  et  $h = 0.15 \text{ mm}$ .

Un joint d'étanchéité (Gene Frame, Thermo Scientific) de dimension intérieure :  $l = 28 \text{ mm}$ ,  $w = 17 \text{ mm}$  et  $h = 250 \mu\text{m}$  est collé entre la plaque inférieure et le support supérieur, ce qui permet de créer un micro canal parallélépipédique pour l'écoulement tout en assurant son étanchéité par rapport au fluide. Les dimensions de ce canal sont présentées sur figure 3.6.c. La zone d'observation est de :  $l = 20 \text{ mm}$ ,  $w = 17 \text{ mm}$  et  $h = 250 \mu\text{m}$  (zone en gris). Par la suite nous dénommerons cette chambre : "chambre en PMMA".

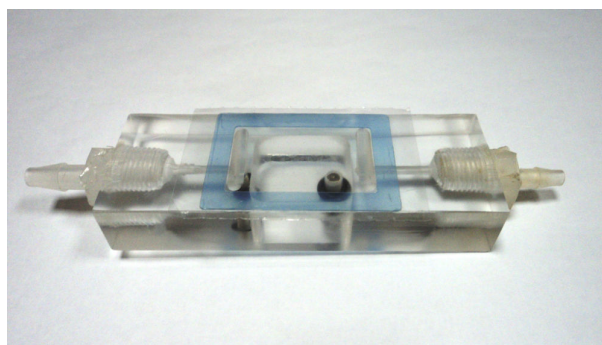
#### 3.2.1.2 Chambre d'écoulement pour l'observation sous MCBL fluorescence

Le microscope confocal à balayage laser - MCBL (en anglais CLSM pour *confocal laser scanning microscope*) permet de réaliser des images bien définies et de très faibles profondeurs de champs. Ceci exige que la chambre d'écoulement soit bien plane et horizontale sur la platine du microscope pendant la visualisation et la réalisation des images, ceci, sur l'ensemble de l'image, sans avoir de décalage dans la netteté de l'image. Pour les observations sous microscope confocal, nous avons utilisé deux modèles de chambres d'écoulement : Chambre d'écoulement en PMMA et chambre d'écoulement PDMS.

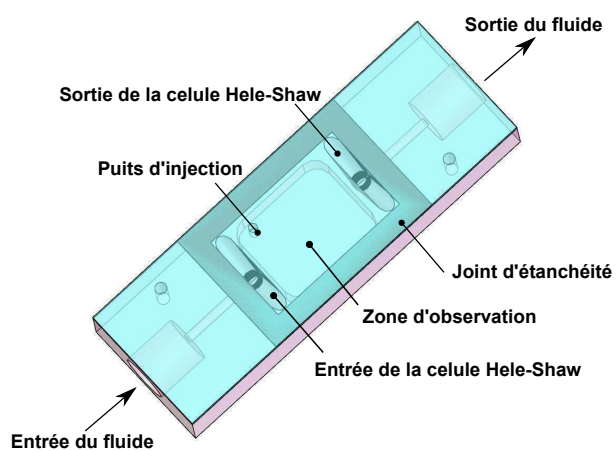
#### Chambre d'écoulement en polyméthacrylate de méthyle (PMMA)

Nous avons modifié la chambre d'écoulement conçue pendant la thèse de Mbaye (2011) pour le microscope à fluorescence (Olympus modèle IX70) du LRP afin qu'elle soit mieux adaptée à la platine du microscope confocal. La nouvelle chambre d'écoulement est moins épaisse et plus étroite dans sa longueur (Dimension :  $l = 50 \text{ mm}$ ,  $w = 25 \text{ mm}$  et  $h = 9 \text{ mm}$ ), avec l'entrée et la sortie située au-dessus de la chambre d'écoulement ; cela rend la chambre plus stable et évite qu'elle se déplace pendant les observations, comme le montre la figure 3.7.a. Un schéma

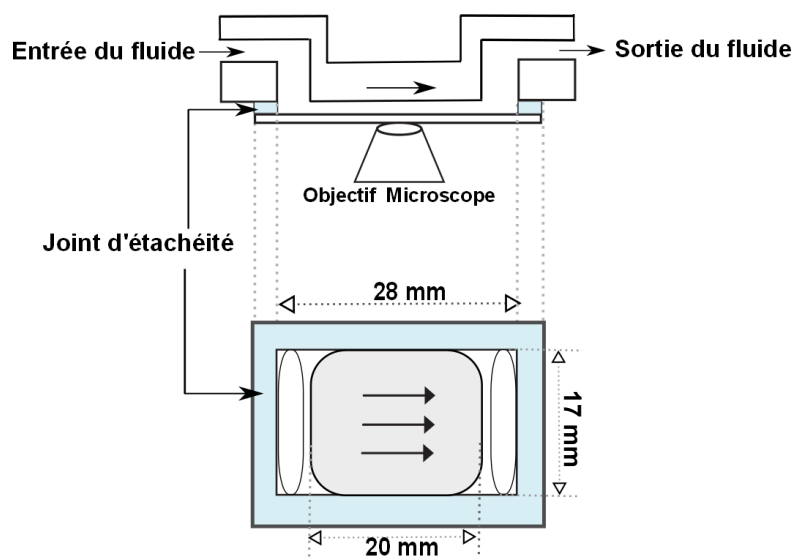




(a)



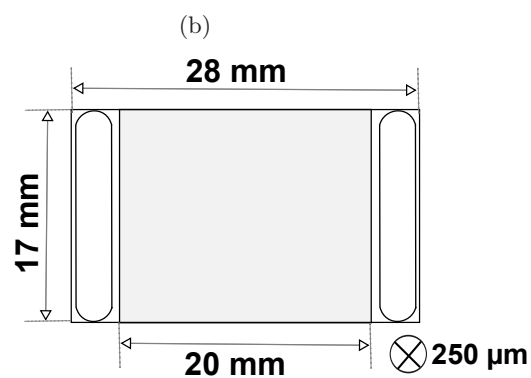
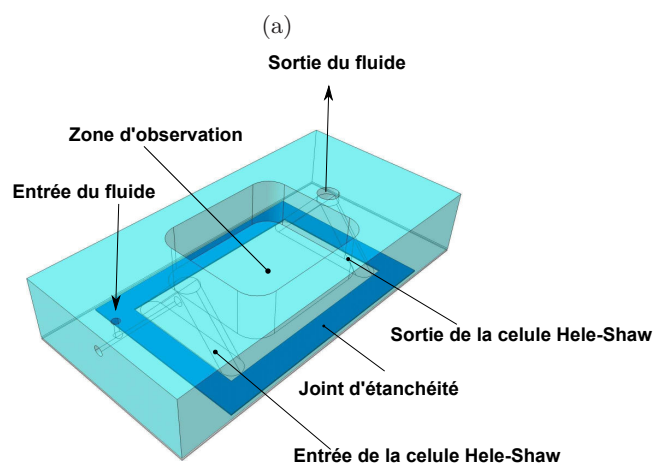
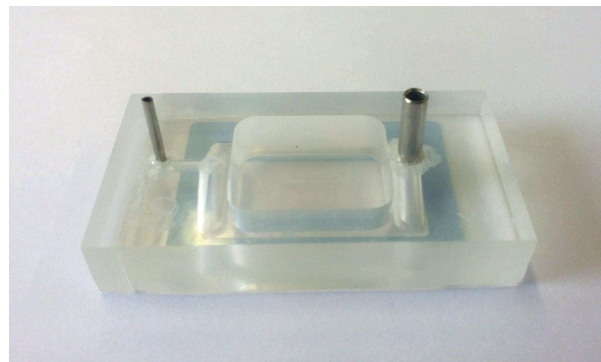
(b)



(c)

**Figure 3.6** – (a) Chambre en PMMA (Mbaye, 2011); (b) Schéma de la chambre en PMMA (Mbaye, 2011) et (c) Dimensions de la zone d'écoulement du fluide. En gris les dimensions de la zone d'observation.

illustratif est présenté sur la figure 3.6.b.



**Figure 3.7** – (a) Chambre en PMMA modifié; (b) Schéma de la chambre en PMMA modifié et (c) Dimensions de la zone d'écoulement du fluide. En gris les dimensions de la zone d'observation.

Nous avons repris le même joint d'étanchéité pour délimiter la zone d'écoulement du fluide. Pour le support d'adhésion nous utilisons la lamelle en verre ayant une taille qui couvre la totalité de la chambre d'écoulement ( $l = 50 \text{ mm}$  et  $w = 24 \text{ mm}$ ). Ceci permet d'avoir la partie inférieure de la chambre d'écoulement bien horizontale et reposant sur la platine du microscope, sans porte-à-faux. Cela permet de fournir des images sans décalage du plan focal. La zone parallélépipédique d'écoulement est créée également par le joint d'étanchéité ( $l = 28 \text{ mm}$ ,  $w = 17 \text{ mm}$  et  $h = 250 \text{ μm}$ ) et la zone d'observation est aussi de  $l = 20 \text{ mm}$ ,  $w = 17 \text{ mm}$  et



$h = 250 \mu m$  (Fig. 3.6.c). Par la suite nous dénommerons cette chambre : “chambre en PMMA modifiée”.

Comme évoqué dans la section 2.3.1 (chapitre 2), les systèmes microfluidiques sont normalement à usage unique car ils sont difficiles à nettoyer. Deux problématiques majeures existent pour le nettoyage du système microfluidique en PMMA : celui-ci ne peut pas être autoclavé et les petits canaux d’alimentation peuvent s’obstruer facilement (Fig.3.7). De plus, dans notre cas, des fluorochromes sont utilisés lors des essais, ce qui rend le nettoyage encore plus délicat. Cependant, pour cette chambre, nous avons pris la décision de la réutiliser en raison de contraintes de coût et de temps de fabrication considérablement élevés.

Au cours des expériences avec cette chambre, nous avons néanmoins constaté pour certaines expériences des contaminations du système d’écoulement par des bactéries autres que *P. putida*, ce qui nous a amené à rejeter les résultats obtenus lorsqu’il y avait contamination. L’ensemble du système d’écoulement est préalablement stérilisé avant chaque expérience, à l’exception de la chambre car le PMMA ne peut pas être autoclavé. De ce fait, la seule hypothèse vraisemblable est que les contaminations proviennent de la chambre d’écoulement, probablement à travers des spores bactériens formés dans la chambre. Nous avons expérimenté plusieurs techniques de nettoyage de la chambre, comme par exemple l’utilisation d’un bain ultrasonore ou d’un bain avec un mélange d’éthanol et d’hypochlorite de sodium ou l’exposition à une lampe à rayons ultraviolets. Malgré cela, nous avons encore rencontré des problèmes de contaminations sur plusieurs essais ce qui a conduit à leur invalidation. Pour résoudre cette problématique, nous avons mis en œuvre une nouvelle technique d’élaboration en concevant une chambre d’écoulement à usage unique utilisant l’élastomère PDMS. Cette chambre est détaillée dans le prochain paragraphe.

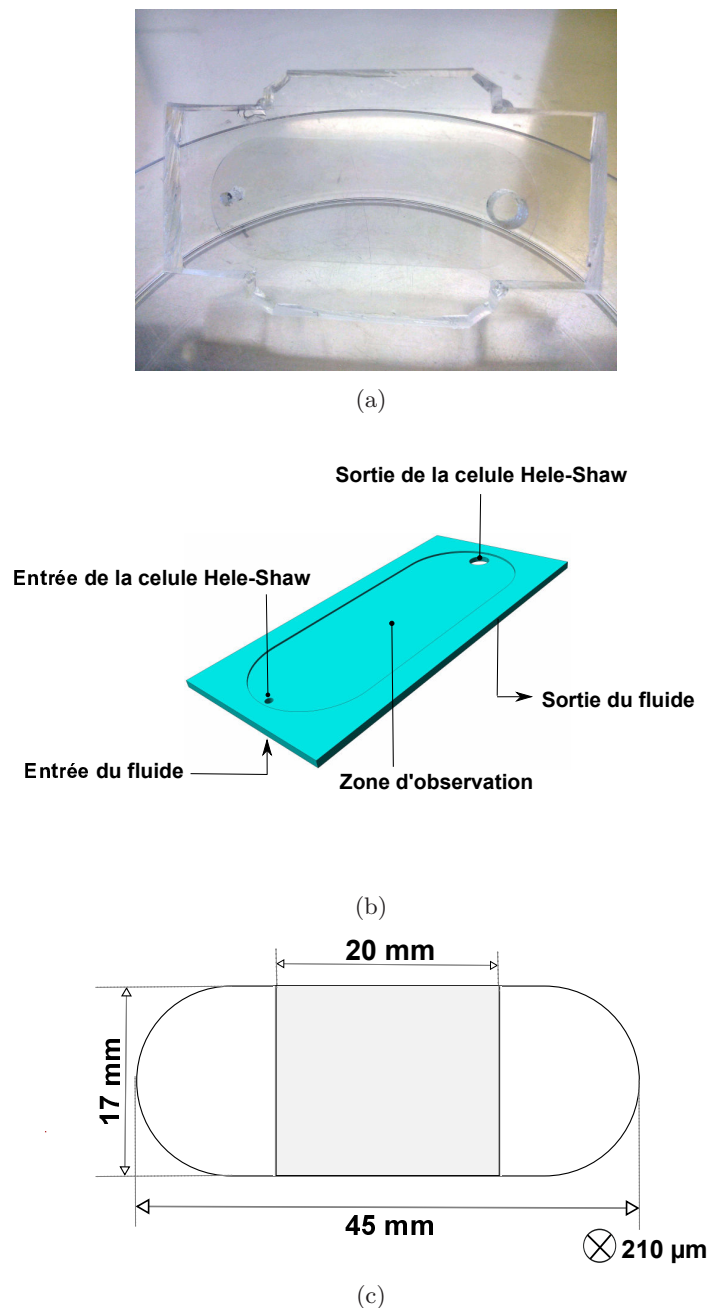
### Chambre d’écoulement avec l’élastomère Polydiméthylsiloxane (PDMS)

Comme évoqué dans la section 2.3.2 (chapitre 2), la fabrication des systèmes microfluidiques avec l’élastomère PDMS a de nombreux avantages, comme par exemple le coût relativement bas du produit et le temps rapide de fabrication de la chambre. Ainsi, à chaque expérience une nouvelle chambre a été fabriquée pour minimiser d’éventuelles contaminations. La chambre en PDMS et son schéma illustratif sont présentés sur la figure 3.8.a et 3.8.b, respectivement.

Le protocole de fabrication de la chambre d’écoulement en PDMS suit 2 étapes : la fabrication du moule, où sera coulé le PDMS, puis la fabrication du système microfluidique. Ces 2 étapes ont été réalisées au laboratoire Liphy. L’annexe A détaille ces 2 étapes de fabrication.

Pour que la partie inférieure de la chambre d’écoulement s’ajuste parfaitement sur la platine du microscope et soit bien plane et horizontale, la chambre en PDMS aura les mêmes dimensions que la ”chambre en PMMA modifiée”, ainsi ses dimensions en “x” et “y” sont les mêmes que la lamelle en verre utilisée comme support d’adhésion ( $l = 50 mm$  et  $w = 24 mm$ ). La dimension extérieure en z de la chambre est d’au moins  $1.5 mm$ , suivant la quantité de PDMS coulé dans le moule. L’entrée et la sortie sont situées également au-dessus de la chambre d’écoulement. Selon les dimensions montrées sur la figure 3.8.c, la zone d’écoulement du fluide est de :  $l = 45 mm$ ,  $w = 17 mm$  et  $h = 210 \mu m$ . La zone d’observation (en gris) est de :  $l = 20 mm$ ,  $w = 17 mm$  et  $h = 210 \mu m$ .

Le rapport d’aspect du système microfluidique est le rapport entre la profondeur (hauteur)



**Figure 3.8** – (a) Chambre en PDMS ; (b) Schéma de la chambre en PDMS et (c) Dimensions de la zone d’écoulement du fluide. En gris les dimensions de la zone d’observation.

et l’ouverture (largeur) du circuit fluide. Selon [Tabeling \(2003\)](#), on se limite généralement à des rapports d’aspect supérieurs à 0.05, à cause de la déformabilité de l’élastomère.

Pour réaliser des comparatifs avec les essais réalisés sur la chambre en “PMMA modifié”, nous voulons essayer de garder les mêmes dimensions de la zone d’observation sur les chambres en PDMS. Le rapport d’aspect de la chambre en PDMS est de 0.01 ( $y = 17 \text{ mm}$  et  $z = 210 \mu\text{m}$ ), ce qui est inférieur à 0.05 : cela pourrait entraîner des effets de déformation du système au cours des essais. Pour avoir un système microfluidique en PMDS moins déformable, nous avons alors pris quelques précautions :

- Les chambres ont été considérablement épaissies, avec une épaisseur d’au moins  $1.5 \text{ mm}$  ;

- L'utilisation du PMDS Sylgard 184 (Dow Corning) permet d'obtenir un bon compromis entre la rigidité et la facilité de démoulage ;
- Le temps de réticulation de ce PDMS est de 48 heures à la température ambiante ( $25^{\circ}\text{C}$ ) et 35 minutes à  $100^{\circ}\text{C}$ . Pour assurer la réticulation complète de l'élastomère, et ainsi augmenter la rigidité, à la fin de la fabrication du système, celui est placé dans un four à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant plus de 48 heures.

Un autre point du rapport d'aspect, est le collage de la lamelle de verre sur le système en PMDS. Selon le protocole présenté sur l'annexe A.2, le PDMS se colle facilement sur une lamelle de verre à l'aide d'un traitement plasma. Cependant, avec un rapport d'aspect inférieur à 0.05, la partie supérieure du micro-canal peut également coller sur la lamelle en verre, supprimant ainsi le passage du fluide. Pour éviter que la zone d'écoulement soit obstruée pendant le collage de la lamelle en verre, un cache en plastique a été conçu avec les mêmes dimensions que la zone d'écoulement. Ce cache est mis sur la zone d'écoulement avant le traitement plasma et il est retiré avant la pose de la lamelle en verre. Avec ce cache, la zone d'écoulement n'est pas affectée par le traitement plasma assurant que la zone de collage de la lamelle en verre soit constituée uniquement par les bords de la chambre.

### 3.2.2 Caractérisation de l'hydrodynamique des chambres d'écoulement

Afin d'étudier l'influence des conditions hydrodynamiques sur la croissance et la structure du biofilm, il est indispensable d'avoir un régime d'écoulement bien établi et contrôlé dans la zone d'observation, d'où l'importance et la rigueur à accorder au dimensionnement des systèmes d'écoulement. En particulier, la forme de l'entrée et de la sortie doit être bien choisie pour atteindre un régime établi le plus rapidement possible. Bakker *et al.* (2003) ont comparé les profils de vitesse obtenus par la simulation numérique pour des chambres d'écoulement de formes différentes. Les résultats de ces simulations ont montré que la forme de la taille de l'entrée et la sortie des chambres d'écoulement pouvaient avoir une influence sur le régime hydrodynamique. Le tableau 3.2 présente quelques exemples des dimensions des systèmes microfluidiques pour l'étude de la formation de biofilm.

Ainsi, comme nous pouvons l'observer à partir de ce tableau, de part ses dimensions, notre système diffère de la plupart des chambres d'écoulement de très faibles dimensions couramment utilisées dans le domaine de la microfluidique : la chambre d'écoulement que nous avons conçue comporte un microcanal rectangulaire de surface  $28\text{ mm} \times 17\text{ mm}$  et une hauteur égale à  $250\text{ }\mu\text{m}$  pour la chambre en PMMA modifié et égale à  $210\text{ }\mu\text{m}$  pour la chambre PDMS.

Cette géométrie a été choisie afin de créer une zone d'observation à cisaillement uniforme, sans effet des bords, avec une surface d'observation suffisamment grande. La surface de la zone d'observation doit en effet permettre une prise des images sur l'ensemble du biofilm afin de délimiter la surface minimale représentative du biofilm.

Pour les deux premières versions de la géométrie du système (chambre en PMMA et chambre en PMMA modifié), la section divergente de l'entrée permettait d'avoir une répartition uniforme du flux la plus rapide possible. Enfin, quelques soient les versions, l'entrée et la sortie de la cellule ont été réalisées de manière symétrique afin de minimiser les zones de recirculation qui pourraient

| Auteur                           | Microorganisme                                    | Matériaux   | Longueur $x$               | Largeur $y$   | Hauteur $h$          |
|----------------------------------|---|-------------|----------------------------|---|----------------------|
| Rupprecht <i>et al.</i> (2012)   | <i>Dictyostelium discoideum</i>                   | PDMS        | 36 mm                      | entrée : 200 $\mu m$<br>et sortie : 5 mm<br>(forme conique) | 50, 100, 150 $\mu m$ |
| Janakiraman <i>et al.</i> (2009) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | PDMS        | 8 mm                       | 600 $\mu m$   | 250 $\mu m$          |
| Meyer <i>et al.</i> (2011)       | <i>Escherichia coli</i>                           | PDMS        | 2 cm                       | 500 $\mu m$   | 100 $\mu m$          |
| Bahar <i>et al.</i> (2010)       | <i>Acidovorax citrulli</i>                        | PDMS        | 3.7 cm                     | 80 $\mu m$  | 50 $\mu m$           |
| Park <i>et al.</i> (2011)        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | PDMS        |                            | 300 $\mu m$   | 40 $\mu m$           |
| Rusconi <i>et al.</i> (2010)     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | PDMS        |                            | 200 $\mu m$   | 100 $\mu m$          |
| Rusconi <i>et al.</i> (2010)     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | PDMS        | 88.5 mm                    | 200 $\mu m$   | 85 $\mu m$           |
| Benoit <i>et al.</i> (2010)      | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     | Polystyrène | canal long (forme serpent) | 370 $\mu m$   | 70 $\mu m$           |
| Richter <i>et al.</i> (2007)     | <i>Pichia pastoris</i> et <i>Candida albicans</i> | PDMS        | 3 mm                       | 1 mm  | 20 $\mu m$           |

**Table 3.2** – Quelques exemples des dimensions des systèmes microfluidiques pour l'étude de la formation de biofilm.

affecter l'écoulement dans la zone d'observation. Le design de la sortie de ces chambres a comme objectif d'éviter l'accumulation des biofilms et des gazes formés pendant la respiration cellulaire à l'intérieur des chambres.

### 3.2.2.1 Hypothèses sur le régime d'écoulement

Du fait des faibles dimensions de la chambre et du petit rapport d'aspect (hauteur/largeur), l'écoulement créé dans le microcanal est laminaire et presque partout du type Hele-Shaw, sauf près de l'entrée et de la sortie. La vitesse verticale est très faible et l'écoulement peut être considéré en première approximation comme bidimensionnel :

$$\mathbf{u} = \begin{cases} u_x &= u(z) \\ u_y &= 0 \\ u_z &= 0 \end{cases} \quad (3.1)$$

La vitesse du fluide s'écrit alors :

$$u(z) = 6 \mathbf{u}_{mean} \left[ \left( \frac{z}{h} \right) - \left( \frac{z}{h} \right)^2 \right] \quad (3.2)$$

où  $\mathbf{u}_{mean}$  est la vitesse moyenne du fluide qui passe par la section verticale du microcanal :  $\mathbf{u}_{mean} = Q_{in}/(h \times w)$ . Le profil théorique de la vitesse d'écoulement est parabolique. La contrainte de cisaillement à la paroi notée  $\tau_w$  est donnée par la relation suivante :

$$\tau_w = \mu \left. \frac{du}{dz} \right|_w = \frac{6\mu Q_{in}}{h^2 w} \quad (3.3)$$

Les débits appliqués pour chaque expériences sont de l'ordre de  $Q_{min} = 25 \mu l/min$  et  $Q_{max} = 1000 \mu l/min$ . Ces vitesses correspondent à de faibles contraintes de cisaillement. Le choix de cette gamme relativement faible est justifié par la taille réduite de la zone d'observation traversée par les cellules bactérienne (tableau 3.3). D'ailleurs, les gammes du nombre de Reynolds utilisé dans ce travail est conforme à la gamme utilisée sur la biofiltration dans le milieu industriel (Mbaye, 2011).

|                  | Conditions hydrodynamiques |                      |
|------------------|----------------------------|----------------------|
|                  | min                        | max                  |
| $\tau_w [Pa]$    | $2.4 \times 10^{-3}$       | $9.4 \times 10^{-2}$ |
| $Re$             | 0.05                       | 2                    |
| $Q [\mu l/min]$  | 25                         | 1000                 |
| $u_{mean} [m/s]$ | $9.8 \times 10^{-5}$       | $3.9 \times 10^{-3}$ |

**Table 3.3** – Gamme de débit, de vitesse et de contraintes de cisaillement dans les chambre d'écoulement.

### 3.2.2.2 Validation de l'hydrodynamique

Pour valider la nature laminaire du régime d'écoulement, des simulations numériques directes ont été réalisées sous OpenFOAM pour déterminer le champ hydrodynamique du fluide

au sein de la chambre d'écoulement. OpenFOAM est un code open-source codé en  $C++$ . Il utilise la méthode des volumes finis pour simuler des phénomènes de mécanique des fluides. Ces calculs peuvent s'effectuer en parallèle et sont par défaut en 3D. Nous allons présenter les résultats obtenus sur la chambre en PMMA modifié. Des calculs similaires ont été effectués pour la chambre en PDMS et les valeurs des champs de vitesse obtenus sont similaires.

Les équations de Navier-Stokes sont écrites avec la formulation vitesse-pression et résolues à l'aide de la méthode des volumes finis.

$$\begin{aligned} \nabla \cdot \mathbf{u} &= 0 \\ \rho \left( \frac{d\mathbf{u}}{dt} + \mathbf{u} \cdot \nabla \mathbf{u} \right) &= \nabla (-p\mathbf{I} + \tau) \end{aligned} \quad (3.4)$$

Nous avons utilisé le solveur "simpleFoam" pour la résolution des équations de Navier-Stokes. C'est un solveur implanté dans OpenFOAM pour les écoulements incompressible et stationnaire. La discrétisation utilise un maillage décalé pour les variables de pression et vitesses et suit un schéma décentré du second ordre en espace.

Le maillage utilisé ici a été créé sous ANSYS 15.0, puis converti au format OpenFOAM grâce à la fonction "fluent3DMeshToFoam" (Fig. 3.9). Le maillage compte 3989508 mailles. Afin d'avoir une meilleure précision et convergence, pour la partie de la zone d'observation, nous avons choisi un maillage structuré qui ne contient que des hexaèdres. Pour les parties convergentes et divergentes, un maillage non-structuré a été employé. Ce dernier maillage contient principalement des tétraèdres dont la taille minimum est de  $10^{-4} \text{ mm}$ . Les connexions entre les différentes zones ont été raffinées afin de capter le maximum d'informations au niveau des changements de section.

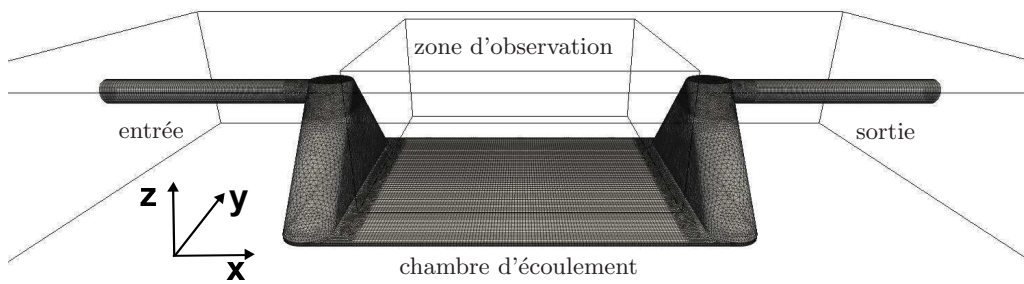
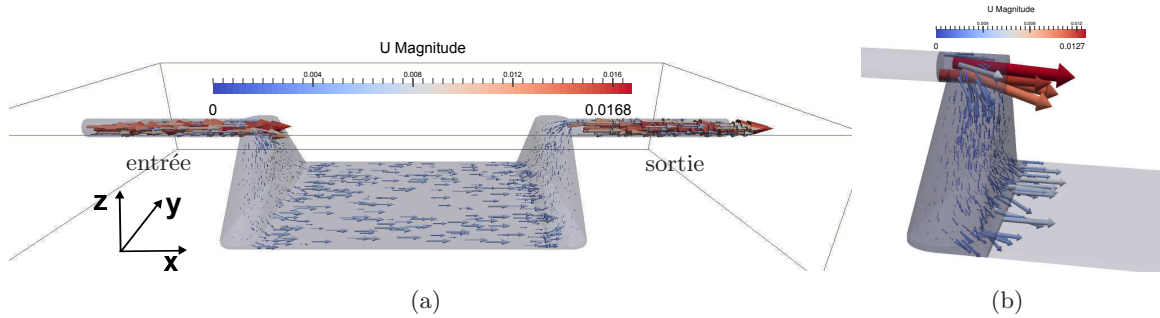


Figure 3.9 – Géométrie et maillage

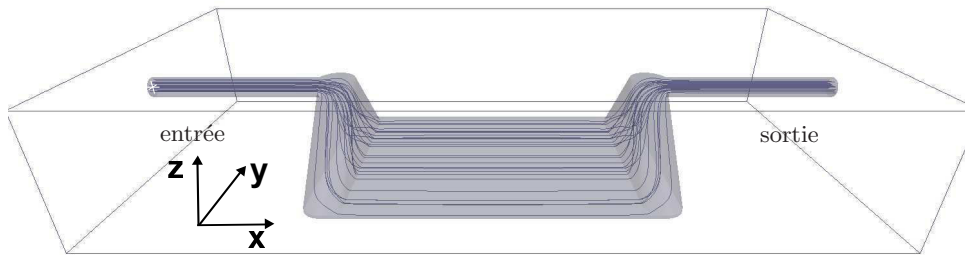
À l'entrée, un profil de vitesse sous forme parabolique  $\mathbf{U}_{inlet}$  est imposé. À la sortie, la pression est supposée constante  $p = 101325 \text{ Pa}$ . Pour les surfaces solides de la chambre d'écoulement, une condition d'adhérence est appliquée.

Les équations (3.4) ainsi que les conditions limites sont résolues de manière itérative jusqu'à ce que le critère de convergence soit atteint. La technique "under relaxation" est adoptée afin d'éviter les divergences.

La figure 3.10 représente le champ de vitesse dans la chambre d'écoulement pour un débit du fluide  $Q = 1000 \mu\text{l}/\text{min}$ . Nous pouvons constater que le distributeur divergent crée bien un écoulement 2D selon le plan  $(x, y)$  dans la zone d'observation. Ainsi du fait de la section divergente, le fluide ralentit très rapidement, sans que des recirculations, ou des écoulement secondaire soient observés dans cette partie (Fig. 3.10.b). Les lignes de courant sont également tracées sur la figure 3.11 : elles confirment qu'il n'y a pas de zones de recirculation mises en évidence dans la zone d'entrée du divergent ainsi que la zone de sortie du convergent.

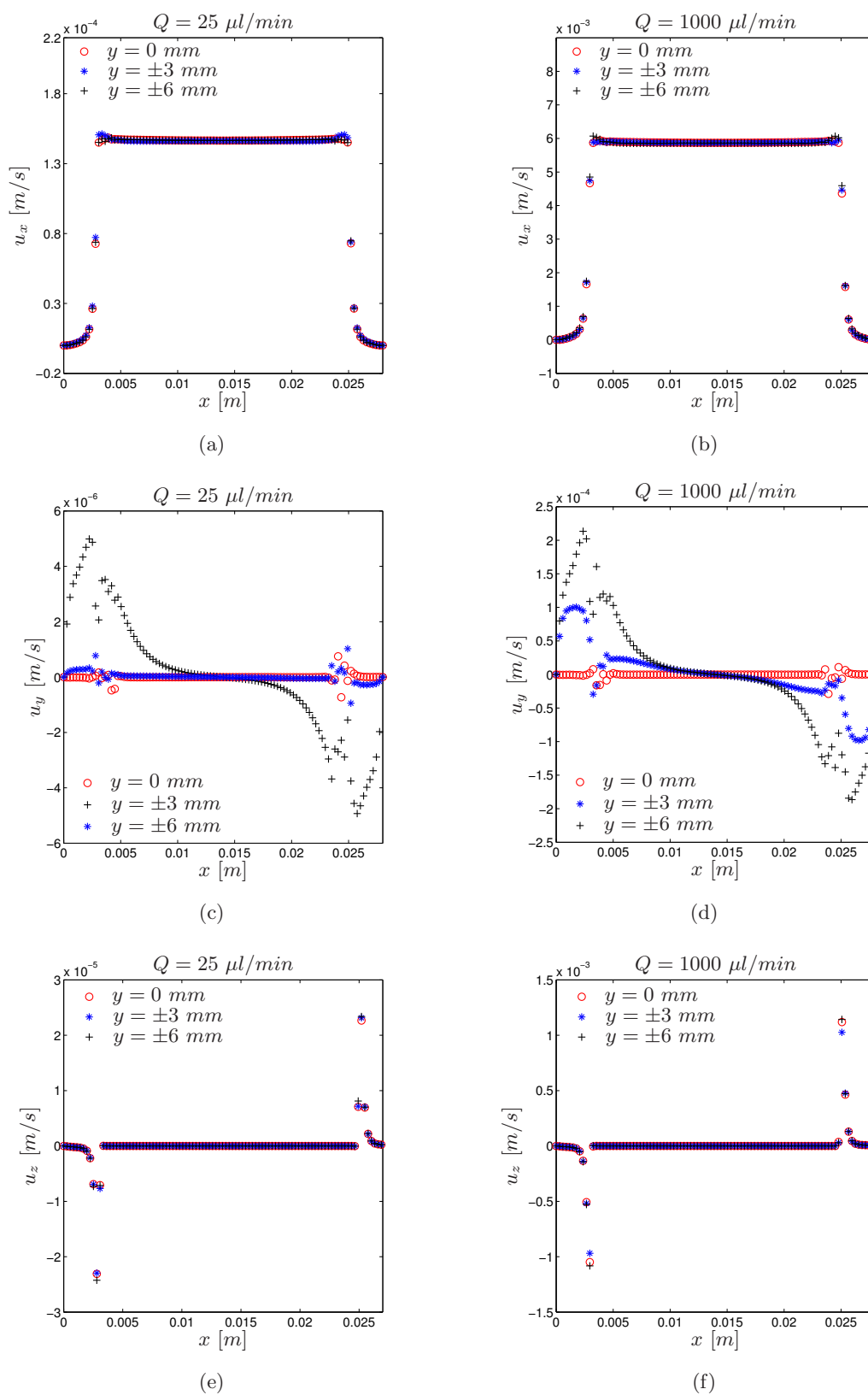


**Figure 3.10** – (a) Champ de vitesse dans la chambre d'écoulement pour un débit du fluide  $Q = 1000 \mu\text{l}/\text{min}$ ; (b) zoom sur la section entrée divergente



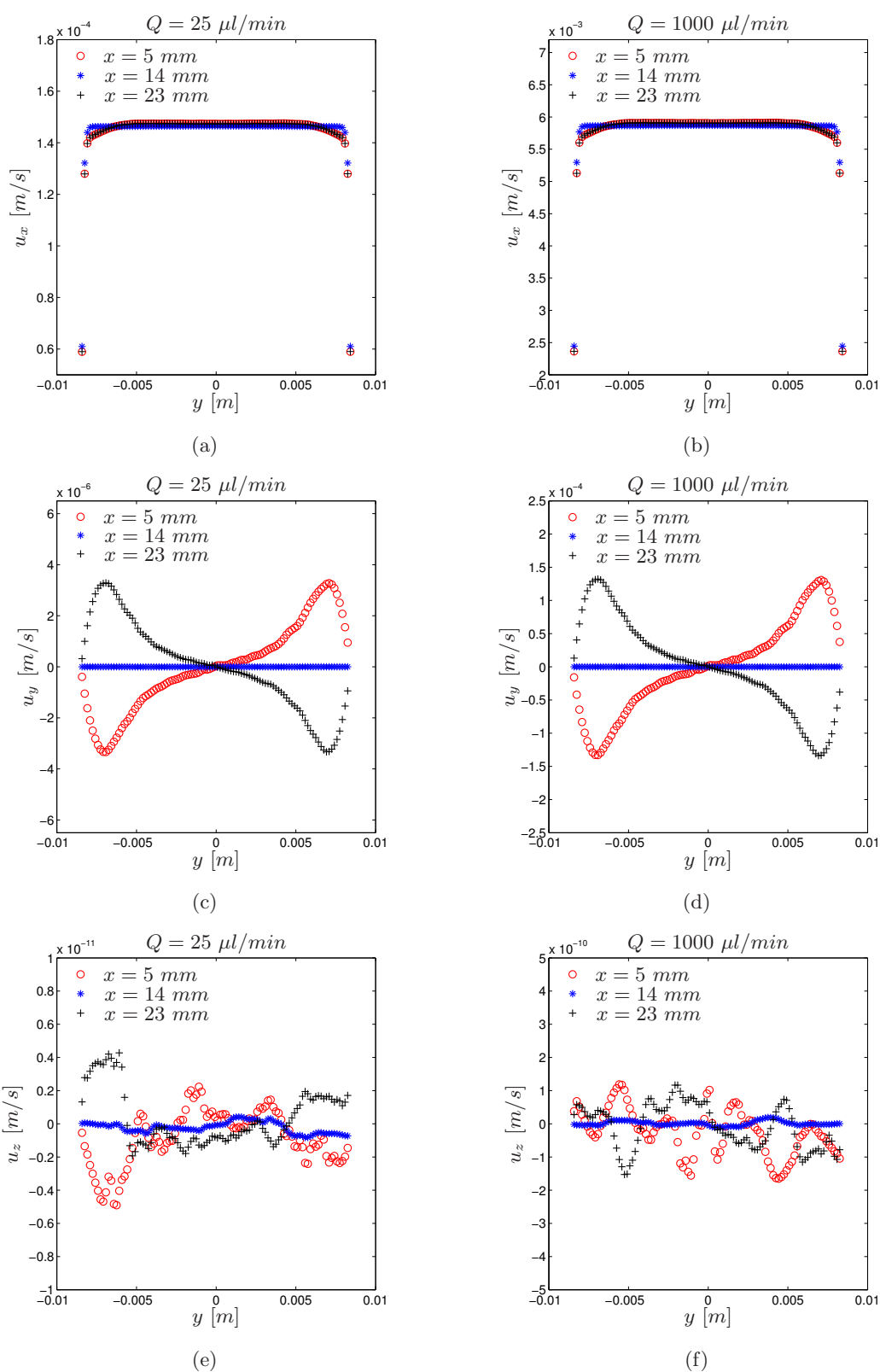
**Figure 3.11** – Ligne de courants pour un débit du fluide  $Q = 1000 \mu\text{l}/\text{min}$

Sur les figures 3.12 et 3.13, nous avons tracé les profils des trois composantes du vecteur vitesse du fluide  $u_x$ ,  $u_y$  et  $u_z$  selon la longueur (direction  $x$ ) et selon la largeur (direction  $y$ ) de la partie “microcanal”. Premièrement, nous constatons que quelque soit le débit appliqué, la composante  $u_z$  est de l'ordre de  $10^{-11} - 10^{-10} \text{ m}/\text{s}$ , sauf à l'entrée ( $x < 0.003 \text{ m}$ ) et à la sortie ( $x > 0.025 \text{ m}$ ). Ceci implique qu' $u_z$  est très faible et négligeable devant  $u_x$  et  $u_y$ . Deuxièmement, la composante  $u_y$  est presque nulle au centre du microcanal, mais non négligeable dans les zone proche de l'entrée et de la sortie. Cependant le rapport  $(u_y/u_x)_{\text{max}}$  reste inférieur à 0.1, ce qui signifie que l'écoulement selon  $x$  est dominant dans le microcanal. Troisièmement, les profils de  $u_x$  selon  $x$  et  $y$  montrent que dans une zone limitée  $0.005 \text{ m} < x < 0.0023 \text{ m}$  et  $-0.006 \text{ m} < y < 0.006 \text{ m}$ ,  $u_x$  est quasi-constante avec une variation inférieure à 2.6%. Ceci correspond à une zone de  $l \times w = 18 \times 12 \text{ mm}^2$  au centre du microcanal, dans laquelle, la contrainte de cisaillement locale est uniforme et peut être bien contrôlée par le débit d'entrée, comme le montre la figure 3.14. Cette zone est utilisée par la suite pour l'observation par microscopie.

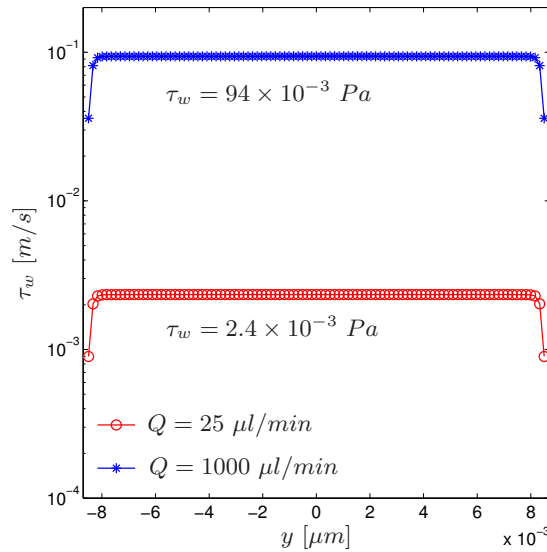


**Figure 3.12** – Profil de vitesses  $u_x$ ,  $u_y$  et  $u_z$  selon  $x$  sur les lignes  $y = 0$  mm ( $\circ$ ),  $y = \pm 3$  mm ( $\star$ ) et  $y = \pm 6$  mm ( $+$ ).



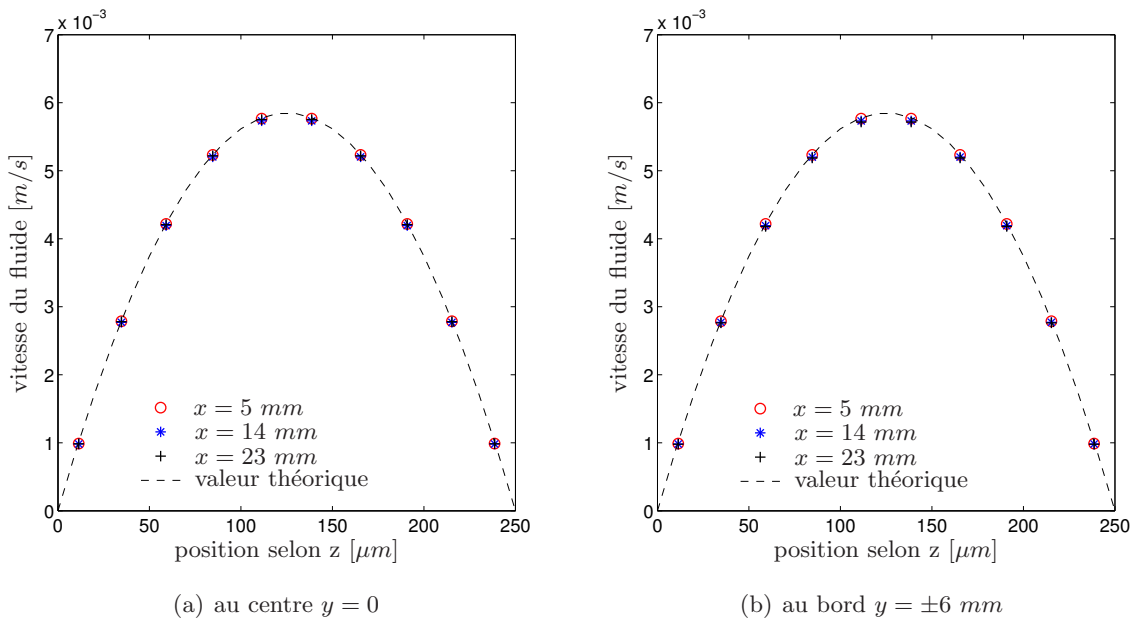


**Figure 3.13** – Profil de vitesses  $u_x$ ,  $u_y$  et  $u_z$  selon la largeur (direction  $y$ ), à différentes positions sur la longueur du microcanal :  $x = 5$  mm ( $\circ$ ),  $x = 14$  mm ( $\star$ ) et  $x = 23$  mm ( $+$ ), avec un débit du fluide égal à 25 et à  $1000 \mu\text{l}/\text{min}$



**Figure 3.14** – Contrainte de cisaillement à la paroi sur la coupe transversale à mi longueur de la chambre d'écoulement

La validation des champs de vitesse dans la chambre d'écoulement a été effectuée en comparant nos résultats numériques avec ceux donnés par l'équation 3.2. Les profils de vitesse  $u(z)$  sont tracés pour différentes positions dans le microcanal. Sur les figures 3.15.a et .b sont présentés les résultats obtenus avec le débit  $100 \mu\text{l}/\text{min}$ . Les résultats pour le débit du fluide  $Q = 25 \mu\text{l}/\text{min}$  sont similaires.



**Figure 3.15** – Profil de vitesse selon  $z$  sur les lignes  $x = 5$  ( $\circ$ ),  $x = 14 \text{ mm}$  ( $\star$ ) et  $x = 23 \text{ mm}$  ( $+$ ) pour un débit du fluide  $Q = 1000 \mu\text{l}/\text{min}$ . La vitesse théorique calculée par l'équation 3.2 est représentée par la ligne pointillée  $--$ .

La figure 3.15.a compare le profil de vitesse  $u(z)$  au centre ( $x = 14 \text{ mm}, y = 0 \text{ mm}$ ) avec celui proche de l'entrée ( $x = 5 \text{ mm}, y = 0 \text{ mm}$ ) et celui proche de la sortie ( $x = 23 \text{ mm}, y = 0 \text{ mm}$ ). La figure 3.15.b quant à elle compare le profil de vitesse  $u(z)$  en proximité de paroi ( $y = \pm 6 \text{ mm}$ ) à  $x = 5, 14$  et  $23 \text{ mm}$ .

La concordance entre les résultats numériques et théoriques implique que sur toute la zone rectangulaire délimitée par  $[x = 5 \text{ mm}, y = -6 \text{ mm}]$  et  $[x = 23 \text{ mm}, y = 6 \text{ mm}]$ , l'écoulement est de type 2D parabolique et invariant selon le plan  $(x, y)$ . Etant donné que le rapport d'aspect ( $h/w = 0.25/17$ ) est très faible devant 1, l'effet des parois n'influence donc que très peu l'écoulement et cet effet est perçu uniquement sur une région très réduite à proximité des parois latérales de la chambre d'écoulement (Happel & Brenner, 1965). Par ailleurs, grâce à la forme particulière de l'entrée et de la sortie, la répartition du fluide est homogène, et le régime d'écoulement est établi très rapidement ( $2 \text{ mm}$  après le distributeur divergent).

Comme cité auparavant, les valeurs des champs de vitesse obtenus pour la chambre en PDMS sont similaires.

Cette qualification de l'écoulement est primordiale pour la suite car elle permet de bien contrôler les conditions hydrodynamiques. L'existence d'un écoulement laminaire et établi 2D plan nous permettra d'exercer un cisaillement uniforme dans la zone d'étude pourvu que le débit imposé soit contrôlé.

### 3.3 Technique d'observation du biofilm

L'observation du biofilm est basée sur la spectroscopie de fluorescence, appelée aussi fluorométrie ou encore spectrofluorométrie. Le principe de la méthode consiste à colorer les cellules bactériennes avec un fluorochrome, à exciter le système à une longueur d'onde donnée  $\lambda_{ex}$  (lumière d'excitation), puis à observer, à l'aide d'un microscope muni de filtres spécifiques, la fluorescence émise à la longueur d'onde caractéristique du fluorochrome  $\lambda_{em}$  (lumière d'émission), généralement par absorption des photons. Selon la loi de Stokes, l'énergie emmagasinée par un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde.

$$E = h.c/\lambda$$

où  $h$  = constante de Planck,  $c$  = vitesse de la lumière. Du fait de la dissipation d'énergie, l'énergie émise est plus faible que l'énergie excitatrice et donc la longueur d'onde d'émission est toujours plus élevée.

Les bactéries que nous avons utilisées n'étant pas naturellement fluorescentes, elles doivent être au préalable colorées par des fluorochromes. Un fluorochrome, ou encore fluorophore ou sonde fluorescente, est une substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation. Ce sont souvent des molécules polynucléaires hétérocycliques contenant de l'azote, de l'oxygène avec des systèmes d'électrons délocalisés et des structures réactives qui permettent de les coupler à des structures biologiques. Ce sont d'excellents marqueurs pour identifier les structures bioactives. L'utilisation de fluorochromes en biologie moléculaire débute fin du 19ème siècle. L'intérêt de cette technique est grande car leur sensibilité est élevée (Bunthof *et al.*, 2001) et leur mise en œuvre est rapide (30 à 60 *min*). Cependant la fluorescence ne peut pas être permanente, l'intensité de la fluorescence diminuant avec le temps jusqu'à devenir indétectable.

Les marqueurs fluorescents utilisés pour quantifier la viabilité bactérienne sont des indicateurs d'états physiologiques et d'activités biologiques tels que l'intégrité membranaire ou une activité enzymatique. Dans nos études, nous utilisons divers fluorochromes en fonction des composants existant dans le biofilm (cellules vivantes, cellules mortes, EPS). Le choix des fluorochromes est donc primordial pour une analyse optimale en multi-fluorescence :

- fluorochromes dont les spectres ne doivent pas ou très peu se chevaucher ;
- intensité de fluorescence forte pour des marqueurs de faible expression ;
- et enfin compatibilité des fluorochromes avec la configuration optique du microscope.

Dans les paragraphes suivants, nous détaillons les microscopes utilisés pendant notre étude, ainsi que les tests réalisés pour déterminer les types de fluorochromes à utiliser pour l'identification des différents composants dans le biofilm ainsi que leurs dosages.

#### 3.3.1 Microscope

L'analyse de l'évolution spatiale et temporelle de la croissance du biofilm dans la chambre d'écoulement a été réalisée au moyen d'un microscope confocal à balayage laser à objectif inversé. Les tests réalisés à propos des fluorochromes ont été effectués au moyen d'un microscope à fluorescence à haute résolution aussi à objectif inversé, mais également à l'aide du microscope confocal. Ce système inversé nous permet d'observer progressivement la structure du biofilm

selon  $z$  depuis la plaque inférieure jusqu'à la position de la plaque supérieure sans retourner la chambre d'écoulement, contrairement à des systèmes de microscopie classique.

### 3.3.1.1 Microscope confocal à balayage laser

Le principe du microscope confocal à balayage laser (CLSM) consiste à focaliser, par l'intermédiaire d'un objectif, un faisceau laser qui va exciter les fluorochromes en un point de l'échantillon, puis à récupérer, sur un photomultiplicateur, le signal lumineux émis en ce point. Un diaphragme (pinhole) qui arrête tout signal ne provenant pas du plan focal est placé devant le photomultiplicateur. Le pinhole autorise une des principales caractéristiques du microscope confocal : avoir une très faible profondeur de champ, comme nous pouvons l'observer dans le tableau 3.4. Avec une faible profondeur de champs, nous pouvons réaliser l'analyse de minces couches de biofilm (épaisseur de la taille des bactéries), ainsi que la reconstitution de sa structure 3D via ordinateur.

| Objectif  | Ouverture numérique (NA) | Milieu de contact | Distance de travail | Profondeur de champ (488 nm) |
|-----------|--------------------------|-------------------|---------------------|------------------------------|
| 10× phase | 0.3                      | air               | 11000 $\mu m$       | 4767.61 nm                   |
| 40× phase | 1.3                      | huile             | 100 $\mu m$         | 299.10 nm                    |
| 63×       | 1.4                      | huile             | 100 $\mu m$         | 236.00 nm                    |
| 40×       | 0.8                      | air               | 3300 $\mu m$        | –                            |

**Table 3.4** – Objectifs du microscopes confocal

Le signal reçu des fluorochromes est amplifié dans le photomultiplicateur, traité afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, puis numérisé. L'image est construite point par point par balayage du champ analysé à l'aide de miroirs de déflexion de la source lumineuse.

Le microscope confocal (TCS SP8, Leica) que nous avons utilisé est celui localisé au Liphy (Laboratoire Interdisciplinaire de Physique). Il est équipé de plusieurs sources laser : un laser Argon modulable en puissance avec trois raies 458/488/514 nm de 50 mW ; un laser solide DPSS 561 nm de 20 mW et un laser Hélium Néon 633 nm de 10 mW. Ces lasers à gaz permettent de fournir des faisceaux lumineux de faible diamètre (quelques dixièmes de mm), intenses et monochromatiques (longueur d'onde parfaitement définie). Les objectifs utilisés sont apochromatiques (Tab.3.4)

Le système de scanner est configuré pour obtenir des images de haute résolution, jusqu'à  $8192 \times 8192$  pixels. La gamme de la fréquence de balayage par ligne est de 1 à 8000 Hz. Une platine motorisée et automatisée permet de gérer la déplacement de l'échantillon suivant 3 axes. L'acquisition d'images peut se faire suivant diverses configurations : XY, XYZ, XZ, Xt, XZt, XYt, XYZt, XY $\lambda$ , XZ $\lambda$ , XYZ $\lambda$ , XY $\lambda$ t, XYZ $\lambda$ t avec une fréquence et sur une durée paramétrables. Les images ainsi formées sont stockées sur la mémoire d'un ordinateur.

### 3.3.1.2 Microscope à fluorescence

Les microscopes à fluorescence permettent d'observer un échantillon via un marquage spécifique par des fluorochromes. Seul le signal provenant de ces molécules fluorescentes est

déecté, ce qui permet de localiser et d'observer un constituant donné dans un échantillon. Le microscope de fluorescence utilisé dans cette étude (IX70, Olympus) est situé au Laboratoire Rhéologie et Procédés. Il est équipé de trois objectifs, 10×, 40× et 100×, à immersion d'huile. Le microscope dispose d'un système de zoom à 1.5×. La source lumineuse de ce microscope est une lampe à vapeur de mercure. Le tableau 3.5 présente les filtres disponibles sur le microscope :

| Filtre | Longueur d'onde d'excitation | Longueur d'onde d'émission |
|--------|------------------------------|----------------------------|
| UV     | 365 – 415                    | 450 – 515                  |
| Blue   | 470 – 500                    | 510 - fin du spectre       |
| Rouge  | 503 – 552                    | 565 – 637                  |

**Table 3.5** – Les filtres disponibles sur le microscope à fluorescence.

Ces filtres nous permettent de sélectionner la bande spectrale d'émission selon le fluorochrome utilisé. Une caméra CCD (KY-F55B, JVC) permet d'enregistrer des images.

### 3.3.2 Marqueurs des bactéries

Les marqueurs des bactéries sont des marqueurs des acides nucléiques qui se fixent à l'ADN après avoir pénétré dans la cellule. Le principe pour différencier les cellules vivantes et mortes se base sur leur intégrité membranaire.

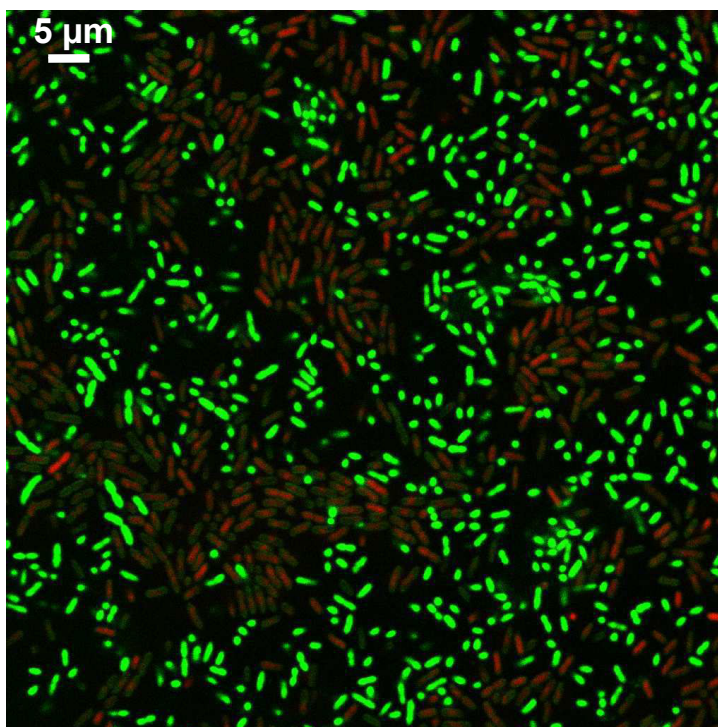
#### 3.3.2.1 DAPI

Le marqueur DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) est une molécule fluorescente capable de se lier fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN. Il colore les cellules mortes et vivantes. DAPI absorbe la lumière ultraviolette ( $\lambda_{ex}^{max} = 358 \text{ nm}$ ), et émet une fluorescence bleue brillant ( $\lambda_{em}^{max} = 461 \text{ nm}$ ). Nous avons vérifié la performance du DAPI (Invitrogen) sous le microscope à fluorescence (IX70, Olympus) avec avec une excitation par UV (produits par une lampe à vapeur de mercure).

#### 3.3.2.2 Live/Dead BacLight

LIVE/DEAD BacLight est une méthode développée par *Molecular Probes* qui permet de différencier et de dénombrer les cellules viables et mortes. Le principe est basé sur une double coloration par l'intermédiaire de deux fluorophores : Syto9 et l'iodure de propidium (propidium iodide - PI). SYTO9 cible les acides nucléiques, mais il est capable de traverser la membrane cellulaire des cellules mortes et vivantes (Auty *et al.*, 2001). Il colore donc, en vert, la totalité des cellules d'un échantillon (émission à  $\lambda_{em}^{max} = 500 \text{ nm}$ ) après une excitation à  $\lambda_{ex}^{max} = 480 \text{ nm}$ . L'iodure de propidium (PI) est un agent intercalant de l'ADN, une fois lié à ce dernier le PI émet une fluorescence rouge ( $\lambda_{em}^{max} = 635 \text{ nm}$ ) après excitation à  $\lambda_{ex}^{max} = 490 \text{ nm}$ . Ce fluorochrome ne peut pénétrer dans les cellules que si les membranes sont altérées, donc seules les cellules mortes ou endommagées sont colorées en rouge. (Fig.3.16).

La concentration optimale pour ces deux fluorochromes a été établie à : 2.5 ml (Syto9 ou PI)/L et 2.0 ml (Syto9 ou PI)/L, pour le microscope à fluorescence et le microscope confocal,



**Figure 3.16** – Cellules *P. putida* DSM 6521 marqués par SYTO9 et PI. En vert : cellules vivantes, en rouge : cellules mortes.

respectivement. Pour le microscope à fluorescence, la concentration des fluorochromes a été mesurée sur quelques bactéries. Pour le microscope confocal, la concentration a été mesurée dans un biofilm développé pendant 72h, c'est à dire pour une quantité de biomasse plus élevée. Nous pouvons constater que la concentration de Syto9/PI optimale pour le microscope confocal est inférieure à celle pour le microscope fluorescence, alors que les essais au microscope confocal ont été réalisés avec une biomasse plus importante. Cela est dû au système de détection du microscope confocal qui possède une haute sensibilité : pour obtenir la même intensité de signal, moins d'énergie lumineuse est donc nécessaire.

### 3.3.3 Marqueur des EPS

Comme mentionné dans la section 2.1 (chapitrier 2), un composant important des EPS est constitué par les polysaccharides. Les polysaccharides font partie de la famille des glucides, autrement dit des sucres. Le marquage des EPS se fait classiquement par des lectines. Ce sont des protéines capables de se fixer sur des glucides de façon spécifique. Concanavalin A (Con.A) est une protéine (glycoprotéine) de la famille des lectines. Elle se fixe aux sucres D-mannose et D-glucose. Con.A ne fluoresce pas toute seule, elle est en générale conjuguée avec un fluorochrome pour colorer les EPS.

Nous avons testés le marqueur des EPS Con.A lie à deux fluorochromes : Tetramethylrhodamine (ConcTetra, Invitrogen) et Alexafluor 647 (Conc647, Invitrogen). Tetramethylrhodamine émet une fluorescence jaune ( $\lambda_{em}^{max} = 580 \text{ nm}$ ) après excitation à  $\lambda_{ex}^{max} = 555 \text{ nm}$ , tandis que Alexafluor 647 émet une fluorescence rouge ( $\lambda_{em}^{max} = 668 \text{ nm}$ ) après excitation à  $\lambda_{ex}^{max} = 650 \text{ nm}$ .



Les deux fluorochromes conjugués avec la lectine Con.A sont dilués à une concentration de 2.5 g/L avec 0.1 M de bicarbonate de sodium. De l'azoture de sodium à 2 mM est également ajouté. Il agit comme un biocide pour inhiber la croissance des bactéries. Les solutions sont ensuite conservées à 20°C.

Lors de la dilution, avant l'injection dans la chambre d'écoulement, nous nous sommes aperçus qu'un pourcentage du conjugué reste sous forme d'agrégats visibles en suspension. Pour avoir une meilleure dissolution de ces agrégats, plusieurs techniques ont été expérimentées : filtration avec filtre PVDF (Polyvinylidène difluorure) à 0.2 µm, filtration avec filtre AC (Acétate de cellulose) à 0.2 µm, ultrason à faible puissance (30 watts) et centrifugation à faible vitesse (2500 rpm).

Les filtrations et le système à ultrasons n'ont pas suffisamment changé la quantité d'agrégats dans la solution de ConA. La technique la plus efficace était la centrifugation à faible vitesse (2500 rpm pendant 2 min). Après la centrifugation, le surnageant est récupéré et dilué avec du bicarbonate de sodium (0.1 M) jusqu'à la concentration de travail. Nous avons constaté également que la solution de Conc647 présente des agrégats plus petits.

### 3.3.4 Compatibilité des fluorochromes

Afin d'obtenir une analyse optimale en multi-fluorescence, un des critères les plus importants est que les spectres d'émission de fluorescence ne doivent pas se chevaucher. Nous avons donc réalisé des tests de compatibilité des fluorochromes avec une pré-culture bactérienne de *P. putida 6521* dans un milieu de culture LB modifié. La concentration finale des fluorochromes dans l'échantillon est :

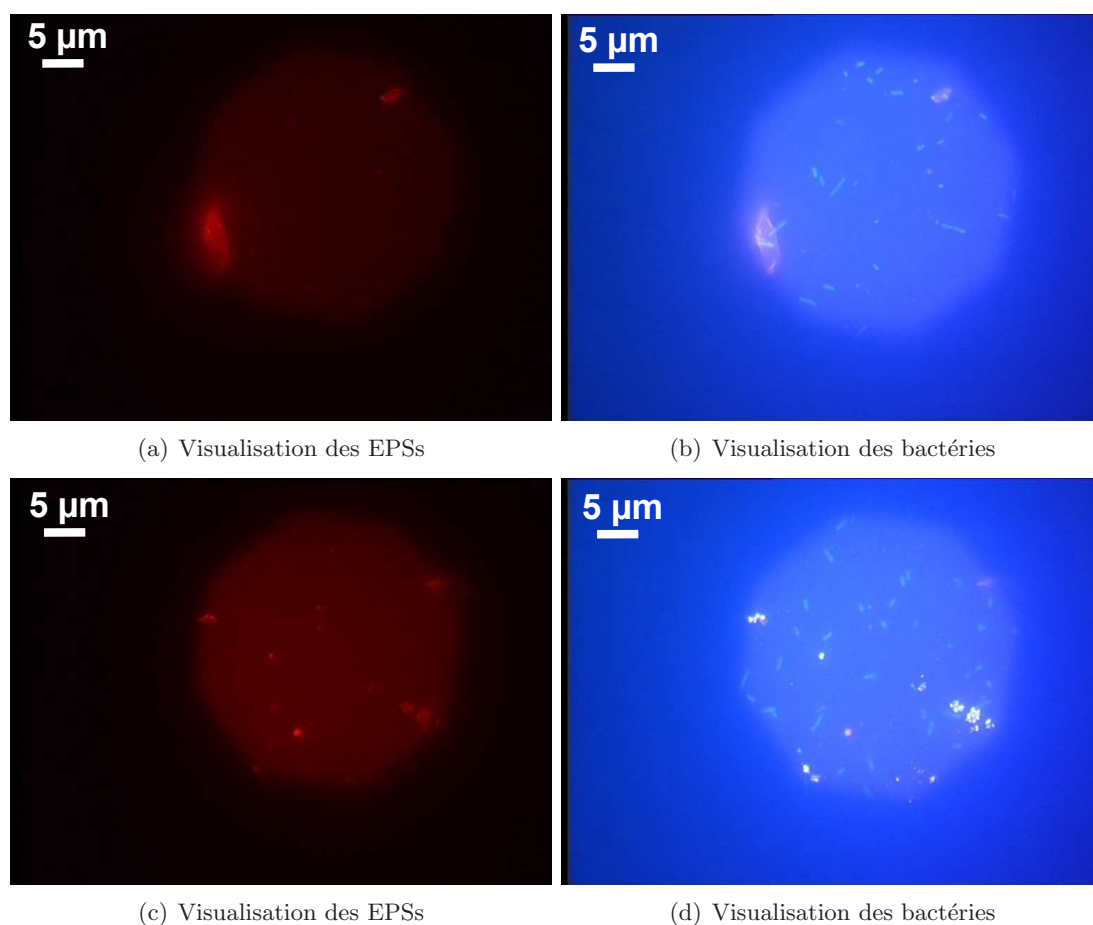
- SYTO9 : 24.88 µl/L ;
- Iodure de propidium : 24.88 µl/L ;
- DAPI : 1 mg/L ;
- ConcTetra et Conc647 : 0.1 g/L

#### 3.3.4.1 Compatibilité entre ConcTetra et DAPI

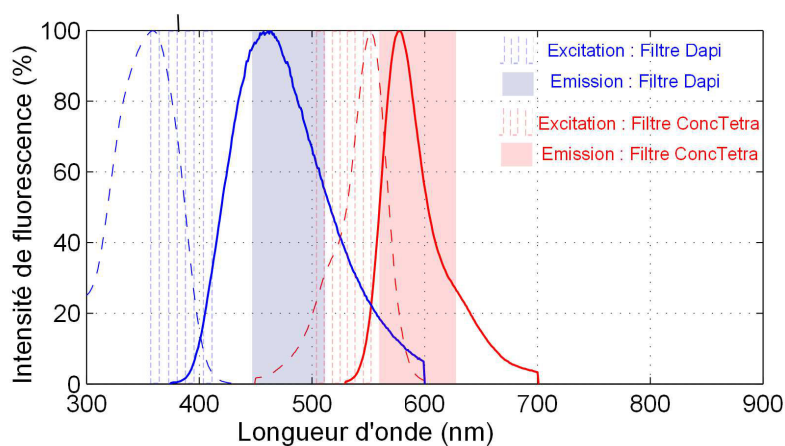
Les figures 3.17 montrent les images du double marquage ConcTetra/DAPI obtenues par le microscope à fluorescence (IX70, Olympus). Les images sont prises avec les filtres de détection correspondant à chaque fluorochrome dans deux positions différentes.

La figure 3.18 montre les spectres d'excitation et d'émission du marqueur DAPI, ConcTetra et des différents filtres respectifs. Par rapport à l'intensité de fluorescence émise par le ConcTetra, nous avons observé une perte de l'intensité avec le double marquage. Dans la figure 3.18, nous pouvons observer une superposition entre la fin du spectre d'émission du DAPI et le spectre d'émission du filtre pour la ConcTetra. Cela peut justifier la perte de l'intensité avec le double marquage.





**Figure 3.17** – Images d’une culture bactérienne de *P. putida* avec les fluorochromes ConcTetra et Dapi prises sous microscope à fluorescence : (a) et (c) Visualisation des EPSs avec ConcTetra ; (b) et (d) Visualisation des bactéries avec le fluorochrome Dapi ; (a) et (b) Images prises sur le même emplacement et (b) et (d) Images prises sur le même emplacement.

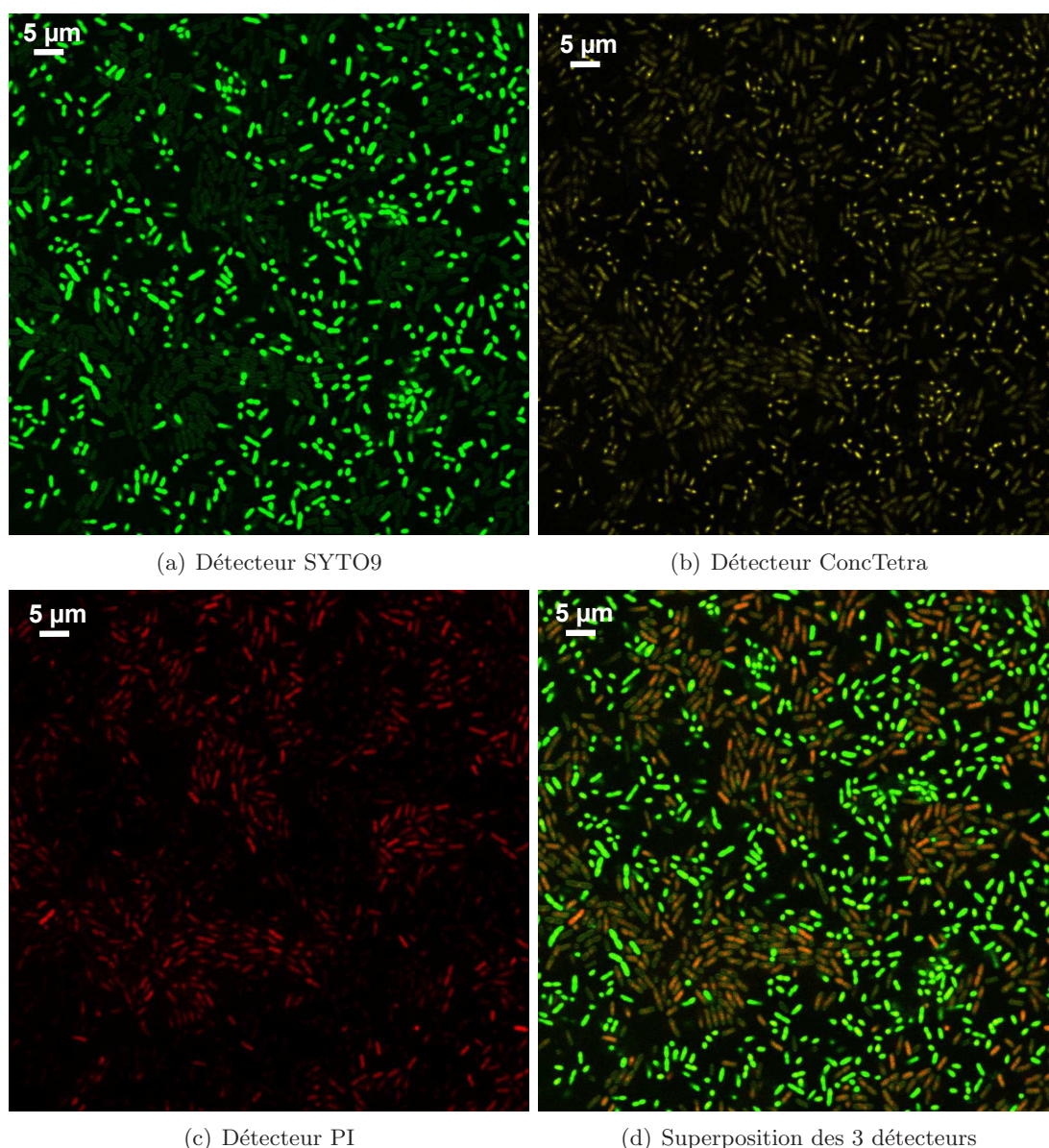


**Figure 3.18** – Spectres d’excitation (---) et d’émission (—) du marqueur DAPI (en bleu) et du marqueur ConcTetra (en rouge).

Nous avons constaté également que DAPI perd rapidement ses propriétés de fluorescence (quelques minutes) dû au photobleaching, c'est à dire la destruction irréversible d'un fluorochrome excité par la lumière en présence d'oxygène. Ce même comportement a été observé avec le double marquage.

### 3.3.4.2 Compatibilité entre ConcTetra et Syto9/PI

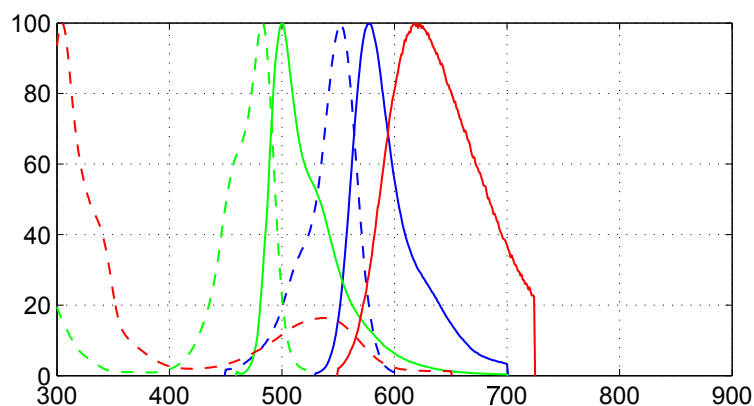
Les figures 3.19 (a), (b) et (c) montrent les images prises sur microscope confocal du triple marquage ConcTetra/SYTO9/PI. Nous pouvons observer les bactéries vivantes (en vert), mortes (en rouge) et les EPS (en jaune).



**Figure 3.19** – Images avec le triple marquage ConcTetra/SYTO9/PI sous microscope confocal de fluorescence d'un biofilm de *P. putida* après 48 h de croissance.

Sur la figure 3.20 nous pouvons observer quelques superpositions des spectres d'émission. Cependant, en ce qui concerne la détection sous le microscope confocal, il est possible d'ajuster

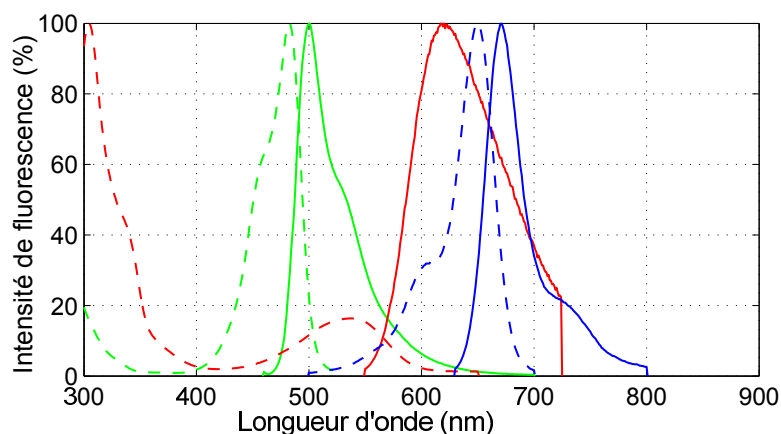
la fenêtre spectrale de détection pour chaque fluorochrome afin d'avoir une meilleure séparation des différentes fluorescences. Dans le microscope confocal TCS SP8 (Leica), la lumière émise par l'échantillon est diffractée par un prisme. La lumière passe ensuite par une fente, et est collectée par un photomultiplicateur. En se déplaçant, la fente "balaie" ainsi la gamme de longueur d'onde voulue. Ainsi, avec un réglage de la fenêtre spectrale adapté pour chaque fluorochrome, nous pouvons détecter de manière spécifique l'émission de chaque marqueur.



**Figure 3.20** – Spectres d'excitation (---) et d'émission (—) des fluorochromes : ConcTetra (en bleu), SYTO9 (en vert) et PI (en rouge)

### 3.3.4.3 Compatibilité entre Conc647 et Syto9/PI

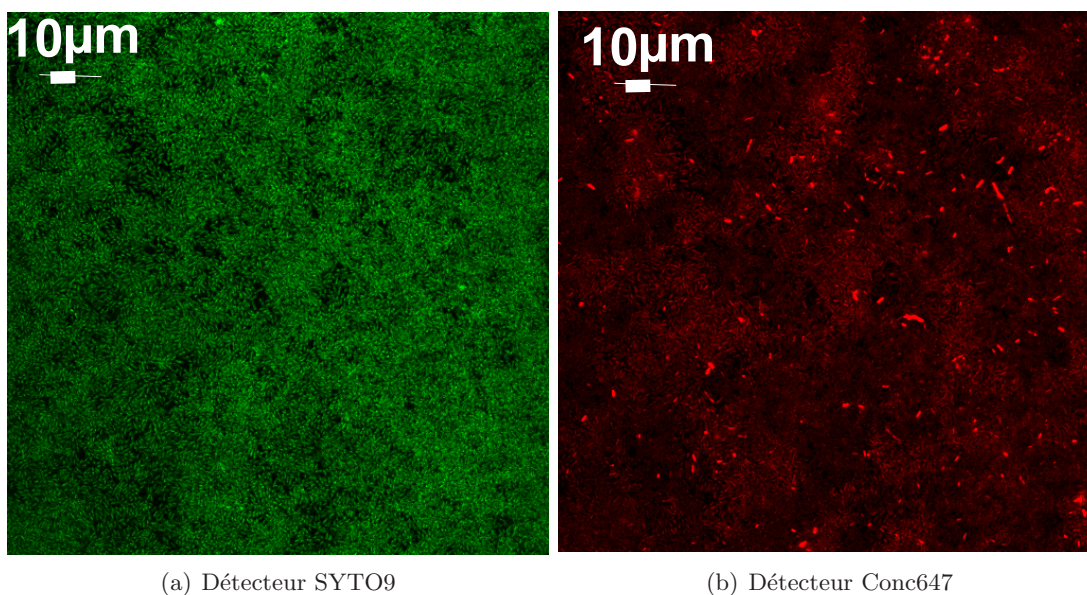
Comme nous l'avons montré précédemment, le fluorochrome Conc647 permet aussi de marquer les EPS en les colorant en rouge. En comparant les spectres d'excitation et d'émission du Conc647 avec ceux du SYTO9 et ceux du PI (Fig. 3.21), nous pouvons constater l'incompatibilité entre le marqueur Conc647 et le marqueur PI, car leurs spectres d'émission sont presque entièrement superposés, ce qui signifie qu'il est impossible de distinguer les deux.



**Figure 3.21** – Spectres d'excitation (---) et d'émission (—) des fluorochromes : Conc647 (en bleu), SYTO9(en vert) et PI(en rouge)

Par contre, il y a un écart important entre le spectre d'émission du SYTO9 et celui du Conc647 : il sera facile de détecter ces deux fluorescences sur deux fenêtres différentes (Fig. 3.22

prise sous microscope confocal).



**Figure 3.22** – L'image avec le double marquage SYTO9/Conc647 réalisée sous microscope confocal d'un biofilm de *P. putida* après 320 h de croissance.

### 3.3.5 Conclusion sur les fluorochromes

La détermination du choix des fluorochromes et de leur condition d'utilisation a été réalisée à partir de l'analyse de culture bactérienne sur des lamelles en verre et dans les chambres d'écoulement PMMA et PMMA modifiée et observées principalement avec le microscope confocal (TCS SP8, Leica) et, dans une moindre mesure, avec le microscope à fluorescence du LRP. En ce qui concerne le microscope confocal, qui constituera notre principal moyen d'observation par la suite, les réglages des fentes spectrales de détection pour chaque fluorochromes sont présentés dans le tableau 3.6.

La visualisation des bactéries avec les fluorochromes Syto9 et PI a présenté des performances acceptables, comme on peut l'observer sur la figure 3.19.a et 3.19.c. Nous constatons que le fluorochrome DAPI n'est pas adapté pour les expériences que nous envisageons car il perd rapidement ses propriétés de fluorescence (quelques minutes), alors que l'acquisition des images pour chaque expérience dure quelques heures. D'ailleurs, ce type de fluorochrome n'est pas compatible avec le microscope confocal, car il n'est pas équipé d'une lampe UV pour l'excitation de DAPI. En conséquence, les fluorochromes choisis pour l'observation des bactéries ont été le Syto9 et PI.

Le marquage des EPS, même en utilisant les techniques de dilution présentées auparavant, s'avère toujours délicat et pose des problèmes méthodologiques difficiles à appliquer. En particulier, quelques soient les précautions prises, le fluorochrome ConcTetra forme encore des agrégats plus ou moins gros. Ces agrégats nuisent à l'observations des EPS car il est difficile de distinguer les agrégats des EPS que l'on désire marquer.

Le tableau 3.6 montre en outre qu'il existe un recouvrement des spectres d'émission entre les fluorochromes iodure de propidium (PI) et Conc647. Par conséquent, il est impossible de



réaliser un double marquage PI/Conc647, que ce soit avec le microscope à fluorescence ou avec le microscope confocal.

| Fluorochrome           | Source laser | fente spectral |
|------------------------|--------------|----------------|
| SYTO9                  | Argon 448 nm | 490-522 nm     |
| ConcTetra              | Argon 555 nm | 570-590 nm     |
| Iodure de pro-<br>dium | Argon 514 nm | 699-747 nm     |
| Conc647                | HeNe 633 nm  | 651-800 nm     |

**Table 3.6** – Source laser et fente spectrale de détection pour chaque fluorochrome

Pour des biofilms plus développés, on rencontre deux autres difficultés pour l’observation des EPS avec la lectine ConA ; à savoir : (1) l’identification du temps de diffusion des fluorochromes à l’intérieur du biofilm et (2) l’ajustement de la puissance du laser.

L’EPS n’étant pas visible sous lumière transmise, nous n’avons ainsi pas de repère comparatif pour savoir si des EPS sont présents en certains lieux du biofilm. Par conséquent, nous ne pouvons pas savoir si la diffusion de la ConA à l’intérieur du biofilm a été réalisée de manière complète, d’autant plus que, dans les expériences réalisées, sur les premières couches des biofilms nous n’observons pas une quantité considérable d’EPS. La puissance du laser joue également un rôle important car l’observation des zones rouges (qui sont potentiellement des EPS) augmente avec la puissance du laser. Ainsi, selon le réglage de la puissance du laser nous pouvons visualiser des fausses régions ou supprimer des régions contenant des EPS.

Pour toutes ces raisons, dans notre travail de thèse, nous n’avons pas poursuivi l’objectif de l’observation des EPS sur les expériences de croissance du biofilm, et nous nous sommes principalement consacrés à l’études de la structuration du biofilm, via l’observation des bactéries vivantes (fluorochrome Syto9) et mortes (fluorochrome PI).

### 3.4 Conclusion

Ce chapitre a présenté certains outils, méthodes, protocoles et dispositifs expérimentaux qui seront utilisés pendant la thèse. Les expériences de croissances du biofilm nécessitent de passer par trois étapes principales : (i) la préparation des cultures bactériennes avant inoculation dans les chambres d’écoulement (ii) la croissance du biofilm sous hydrodynamique contrôlée (iii) l’observation du biofilm sous microscope au moyen de fluochrome.

Quelle que soit l’étape de déroulement du processus expérimental, des précautions ont été mises en place pour assurer la reproductibilité des essais et ainsi avoir une interprétation non biaisé des résultats. La reproductibilité des essais est d’autant plus nécessaire dans notre travail que l’observation de l’évolution temporelle de la croissance du biofilm ne peut pas être réalisée en continu sur la même chambre d’écoulement : la bactérie utilisée pour cette étude, *P. putida*, déjà utilisée dans la thèse de Mbaye (2011), ne fluoresce pas naturellement et les marqueurs fluorescents endommagent la structure du biofilm.

Au niveau de l’étape de pré-culture, différents milieux de cultures ont ainsi été étudiés. Le but était en premier lieu de trouver un compromis entre la composition du milieu de culture et les temps de cultures des biofilms ou des pré-cultures. De plus, un milieu plus simple en

terme de sources de carbone rend plus facile d'éventuelles interprétations ultérieures en terme de cinétique de croissance. Il s'est avéré qu'un milieu LB sans peptone offrait un tel compromis car la peptone influence très peu la croissance. Pour assurer une reproductibilité des expériences que nous réalisons, il était en outre nécessaire de s'assurer, que dès la phase de pré-culture, l'état métabolique des bactéries prélevées pour établir cette pré-culture soit le plus stable possible. C'est pourquoi nous avons modifié le protocole standard utilisé jusque-là. En particulier, (i) nous évitons la décongélation de la culture stock pour effectuer le prélèvement bactérien permettant la préparation de la culture bactérienne solide (en milieu LA) qui servira à l'inoculation des pré-cultures (ii) cette culture bactérienne solide n'est pas conservée pour être réutilisée et une nouvelle culture est préparée systématiquement à chaque fois qu'une pré-culture est nécessaire. Cette dernière procédure minimise aussi certains risques de contamination. De même, pour éviter des effets de shift-down (passage d'un milieu riche à un milieu pauvre) et un stress bactérien, le milieu LB modifié sans peptone sera utilisé quelles que soient les étapes au cours des expériences (pré-culture, croissance du biofilm).

Au niveau des dispositifs permettant la croissance des biofilms, des chambres d'écoulements ont été conçues afin de pouvoir développer un biofilm sous conditions hydrodynamiques contrôlées et permettre son observation sous microscope à fluorescence ou microscope confocal. En ce qui concerne les observations sous microscope à fluorescence, c'est la chambre d'écoulement en PMMA conçue pendant la thèse de Mbaye (2011) (figure 3.6) qui a été utilisée. Pour les observations sous microscope confocal des développements spécifiques ont été réalisés. Pour cela, deux chambres ont été conçues : Chambre en PMMA modifiée (Fig. 3.7) et chambre en PDMS (Fig.3.8). Une des raisons qui a amené à ces développements concerne la bonne adaptation des chambres d'écoulement avec la platine du microscope confocal. Cela a nécessité quelques changements dans le design de ces chambres par rapport à la chambre en PMMA initiale : (1) diminution de l'épaisseur, (2) diminution de sa longueur (3) modification des positions de l'entrée et de la sortie situées désormais au-dessus de la chambre d'écoulement et (4) taille de la lamelle en verre qui couvre désormais la totalité de la partie inférieure de la chambre d'écoulement. Ce design permet d'avoir une chambre plus stable sur la platine et ainsi d'obtenir des images sans décalage du plan focal. Une autre raison de ces développements a été l'existence de contaminations sur la chambre PMMA, qui pour des raisons de coût et de temps de réalisation, est recyclée sur les expériences. Le développement de chambres moulées en PDMS, jetables, permet de pallier cette difficulté. Il est à noter que la géométrie des chambres d'écoulements que nous avons conçues diffère de la plupart des chambres de très faibles dimensions, couramment utilisées dans le domaine de la microfluidique (la réalisation d'une chambre PDMS avec un micro-canal de notre taille est d'ailleurs une première originale). Les choix effectués sur la taille de la zone d'observation ont en particulier été guidés par la volonté de pouvoir générer un cisaillement contrôlé et uniforme et d'avoir une surface suffisamment grande pour garantir de pouvoir observer la structure du biofilm sur une surface représentative. La validation des champs de vitesse dans ces deux chambres d'écoulement (PMMA modifiée et PDMS) a été réalisée en comparant le résultat théorique (eq. 3.2) avec les résultats de simulations numériques. Les simulations ont été réalisées avec des débits de l'ordre de ceux qui seront appliqués sur les essais de croissance du biofilm.

Cette comparaison montre que sur la zone d'observation, et dans la gamme des débits qui seront utilisés, l'écoulement (zone maximale :  $18 \times 12 \text{ mm}^2$  situé au milieu de chambre) est bien de type laminaire 2D, avec un profil de vitesse parabolique (poiseuille), invariant selon le plan  $(x; y)$ .

Enfin, l'observation du biofilm nécessite l'utilisation de fluorochrome. Des tests ont été effectués afin de déterminer les marqueurs fluorescents à mettre en œuvre et leurs conditions d'utilisation dans la suite du travail (développement du biofilm - chapitre 6). Ces tests ont été réalisés sous les deux microscopes : le microscope confocal avec la chambre PMMA modifiée et lamelles en verre, et le microscope à fluorescence (IX70, Olympus) avec la chambre PMMA et lamelles en verre.

Concernant les marqueurs des bactéries, les fluorochromes testés étaient : SYTO9, IP et DAPI. L'observation des bactéries avec les fluorochromes Syto9 et PI a présenté des performances acceptables (Fig. 3.19.a et Fig. 3.19.c), tandis que le DAPI perd rapidement ses propriétés de fluorescence. De plus, le fluorochrome DAPI n'est pas compatible avec le microscope confocal, où sera effectué la majorité des observations de la croissance du biofilm dans la suite du travail. Par conséquent, les fluorochromes choisis pour l'observation des bactéries ont été le Syto9 et PI à une concentration de  $2.0 \text{ ml}(\text{Syto9 ou PI})/L$ .

Deux marqueurs des EPS ont été testés : ConcTetra et Conc647. Nous avons rencontré 3 difficultés majeures pour l'observation des EPS avec ces marqueurs : (1) la formation d'agrégats fluorescents, (2) l'identification du marquage des fluorochromes (sans repère comparatif sous lumière transmise) et (3) l'ajustement de la puissance du laser.

De ce fait, dans la suite du travail nous n'avons pas poursuivi l'objectif de l'observation des EPS. Les essais expérimentaux de ce travail de thèse ont été focalisés sur l'observation des bactéries vivantes (fluorochrome Syto9) et mortes (fluorochrome PI).

## Chapitre 4

# Traitement d'images

Ce chapitre est consacré à la mise en place des outils de traitement et d'analyse d'image que nous avons utilisés dans notre travail. Pour les traitements envisagés, nous nous sommes servis de bibliothèques de fonctions déjà existantes (boîte à outil de Matlab). Cependant, bien que nous n'ayions pas développé d'algorithmes spécifiques pour réaliser la plupart des opérations mathématiques sur les images, le choix des traitements réalisés et leur séquençement a fait l'objet d'une attention particulière. En effet, il s'agit d'extraire des images l'information utile, à savoir les pixels correspondant à la présence de bactéries dans le plan focal d'observation. Or une image brute comporte toujours du bruit qui peut amener à des erreurs dans les mesures. Cela est d'autant plus délicat ici que les objets d'intérêts sont petits, et que le bruit peut générer des artefacts de même taille que les objets recherchés.

Du point de vue de sa numérisation, une image peut être vue comme un ensemble d'informations exprimées sur un certain nombre de bits dans une matrice de pixels. L'information associée à chaque pixel est en général dérivée de l'intensité du rayonnement mesuré en ce point.

Le traitement d'images numériques est l'ensemble des techniques qui utilisent des opérations mathématiques qui visent à améliorer l'image, corriger les défauts d'acquisition et à améliorer les détails d'intérêt. En général, l'objectif est de faire des modifications de l'image pour faciliter sa visualisation ou pour la préparer pour l'analyse numérique, c'est à dire, l'extraction de données quantitatives à partir de l'image.

Il n'existe pas une méthode de traitement d'images générale à tous les domaines d'application possibles et chaque domaine nécessite le développement d'algorithmes spécifiques. Nous avons utilisé le logiciel MATLAB qui dispose d'une boîte à outils dédiée au traitement d'images numériques afin de mettre en place des programmes qui permettent de faire le traitement d'une façon "semi-automatique" et "itérative". Dans notre cas, un programme "semi-automatique" est d'autant plus important que la quantité d'images à traiter est considérable.

De manière générale, toute méthode de traitement d'images comprend 5 étapes majeures : formation et numérisation de l'image, pré-traitement, segmentation, post-traitement et analyse de l'image. Ainsi, dans ce chapitre nous allons présenter ces 5 étapes avec les principales techniques adoptées pour le traitement d'images de l'état initial de colonisation et du biofilm développé.



## 4.1 Formation et numérisation d'image

L'étape initiale de formation de l'image est fortement dépendante des capacités et de la qualité de l'équipement qui capture l'image (par exemple l'objectif du microscope et le détecteur de lumière visible). La numérisation est la transformation de l'image en un fichier informatique où des opérations sur chaque pixel peuvent être effectuées via un ordinateur.

Les images de l'état initial de colonisation ont été prises avec l'objectif 40× (immersion dans l'huile) et un zoom égal à 1. Ces images ont une forme carrée. Cela correspond à une taille d'image de  $290.63 \mu\text{m} \times 290.63 \mu\text{m}$ , pour une définition de  $1024 \text{ pixels} \times 1024 \text{ pixels}$ . Les images du biofilm ont été prises également avec l'objectif 40× (immersion dans l'huile), avec un zoom allant de 2 à 3. Cela correspond à une taille d'image comprise entre  $83.04 \mu\text{m} \times 83.04 \mu\text{m}$  et  $145.31 \mu\text{m} \times 145.31 \mu\text{m}$ . Pour les images du biofilm, la définition était de  $512 \text{ pixels} \times 512 \text{ pixels}$ .

Les images ont été enregistrées au format *.tiff* non compressé. Chaque pixel de l'image correspond à une certaine intensité lumineuse que l'on notera  $I$ . Les images de la colonisation initiale sont codées sur 8 bits, c'est-à-dire, sur 256 niveaux de gris allant de 0 (noir) pour une intensité minimale à 255 (blanc) pour une intensité maximale. Les images du biofilm formé, colorées avec les fluorochromes, sont codées sur 24 bits, c'est-à-dire, 3 fois 8 bits, avec une intensité lumineuse divisée entre les couleurs primaires rouge, vert et bleu. L'intensité lumineuse est codée de 0 à 255 pour chaque couleur (codage RVB).

Les prises des images ont été faites de manière à représenter au mieux l'ensemble de la zone d'observation. Ainsi, les images ont été acquises d'une façon "semi" aléatoire : nous avons fixé un point situé au niveau du centre de la chambre d'écoulement et nous avons déplacé l'emplacement de la prise de vue en "x" et en "y". Nous avons ainsi balayé une zone de  $12 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$ . L'acquisition des images a été faite tous les  $4 \text{ mm}$ , pour un total de 17 images au niveau de chaque chambre d'écoulement (conformément à la figure 4.1).

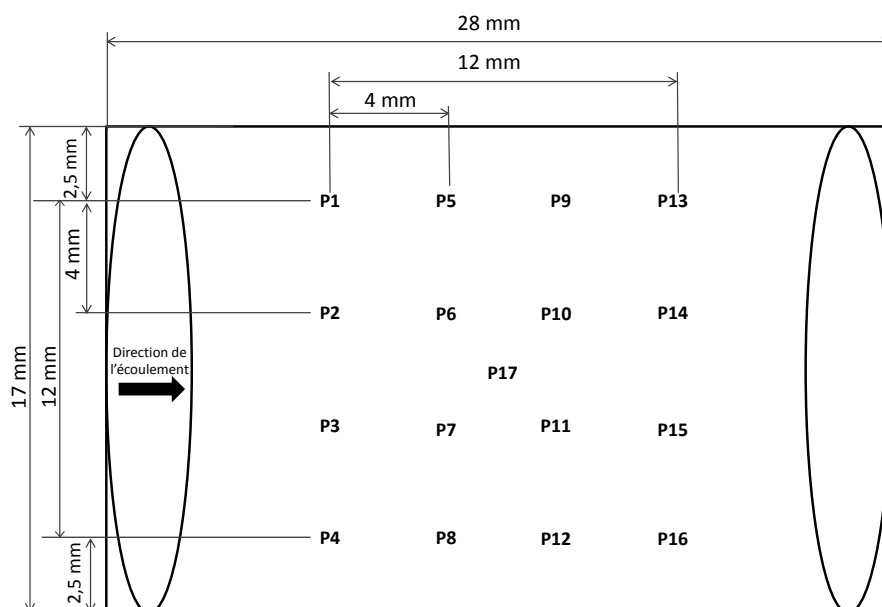


Figure 4.1 – Positions des prises des images

## 4.2 Pré-traitement

L'objectif est d'ajuster la qualité de l'image pour corriger des défauts provenant de l'acquisition et pour mettre en évidence les détails d'intérêt. Cela facilitera leur visualisation et leur segmentation. La correction d'arrière-plan est une opération typique de pré-traitement et cette opération est nécessaire en particulier pour les images issues du microscope optique.

Dans le cadre de cette étude, cette étape est particulièrement importante : dans le cas de l'observation de l'état initial, nous sommes intéressés uniquement par les bactéries attachées sur la plaque inférieure de la chambre d'écoulement, tandis que pour l'observation de la structure du biofilm, nous sommes intéressés par l'évolution spatiale (selon "z") de la quantité de bactéries contenue dans le biofilm. Dans tous les cas, il y a des objets situés en dehors de la zone de focalisation, notamment des bactéries. Ces objets ont tendance à "polluer l'image". Avant d'identifier les bactéries dans un certain plan d'observation, il est donc nécessaire de faire une correction d'arrière plan en éliminant tous ces "bruits de fond" afin de rendre les images plus faciles à exploiter.

Pour éliminer ces bruits de fond, nous avons appliqué un filtre "imbothat" pour le traitement des images de l'état initial, sur laquelle les bactéries apparaissent plus foncées que le fond, et un filtre "imtophat" pour le traitement des images du biofilm, sur laquelle les bactéries apparaissent plus claires que le fond.

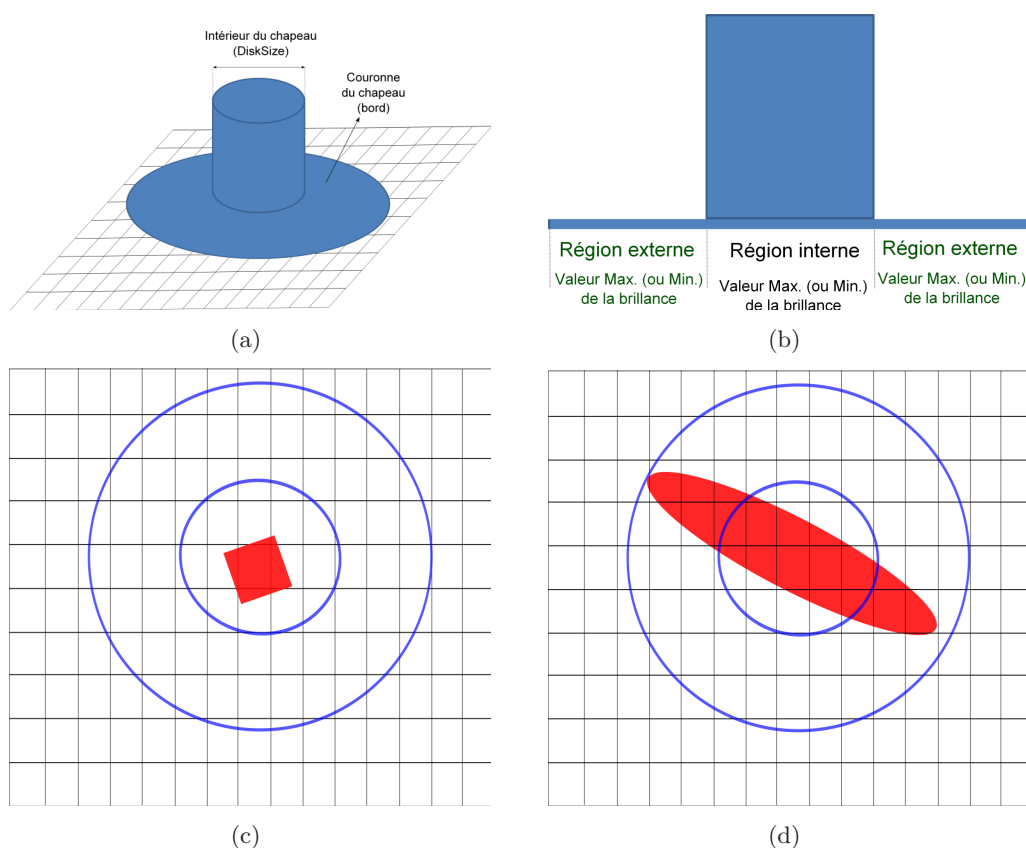
Selon [Russ \(2011\)](#), l'élément structurant des filtres "hats" est constitué d'un disque plat reposant sur la surface de l'image et d'un cylindre central de petit diamètre. Ce filtre est centré sur chaque pixel de l'image, avec le bord reposant sur la surface de l'image (Fig. 4.2.a). La mise en oeuvre de ce filtre est réalisée en comparant la valeur maximum ou minimum de la brillance (en fonction du bruit qui doit être rejeté) entre la région correspondant à l'intérieur du chapeau (région approximativement circulaire) et celle correspondant à la couronne du chapeau (bord)(Fig. 4.2.b). Si la différence entre les pixels les plus brillants (ou les plus sombres) sur la région à l'intérieur et l'extérieur du chapeau dépasse un seuil, la valeur du pixel est remplacé par la moyenne ou la médiane de la région à l'extérieur. Donc, selon l'exemple présenté sur la figure 4.2.c, le bruit retrouvé dans la région à l'intérieur du chapeau sera remplacé par la moyenne (ou médiane) de la région à l'extérieur. La figure 4.2.d présente un objet qui dépasse les frontières de la région interne du chapeau. Comme cet objet est présent à la fois sur la région interne et externe du chapeau, la valeur du maximum (ou minimum) de la brillance sera la même. Dans ce cas la valeur de la brillance dans ce point est conservée. Ainsi, en choisissant proprement la taille de l'élément structurant, ce filtre permet d'homogénéiser le fond sans modifier les objets étudiés.

La taille théorique des bactéries du genre *Pseudomonas* est comprise entre  $0.7\mu\text{m} \times 2.0\mu\text{m}$  et  $1.1\mu\text{m} \times 4.0\mu\text{m}$ . Connaissant la résolution de l'image, nous pouvons calculer, pour chaque image, la taille la plus adaptée pour l'élément structurant du filtre. Nous appelons la taille de cet élément structurel "DiskSize". Cette valeur est comparée ensuite avec la longueur moyenne des cellules calculée à partir des images traitées. Ceci nous permet d'ajuster la structure du

filtre utilisé selon l'échantillon.

$$DiskSize = \frac{L_{Bact}}{Rs} \quad (4.1)$$

“ $L_{Bact}$ ” est la plus petite longueur théorique d'une bactérie (dans notre cas  $2.0\mu m$ ) et “ $Rs$ ” est la résolution de l'image.

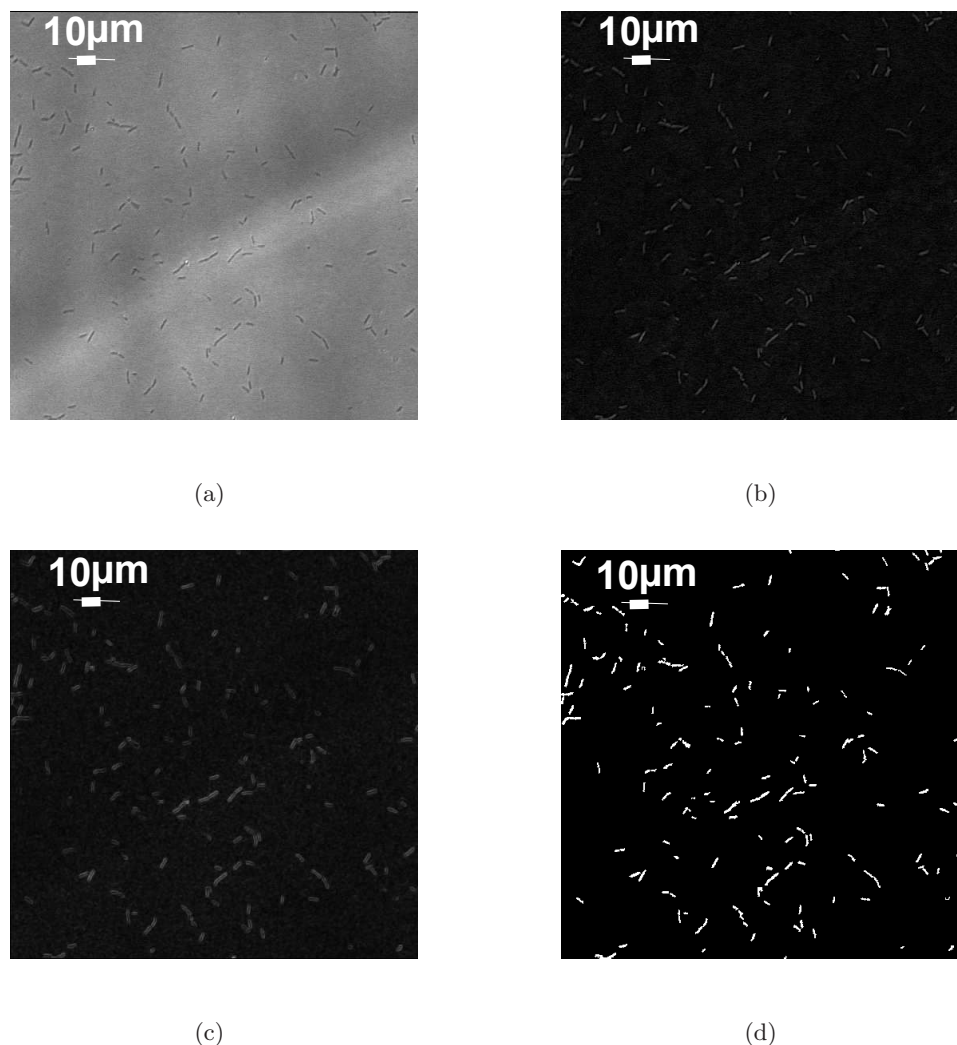


**Figure 4.2** – (a) Image illustrative du filtre “hat” ; (b) Régions du filtre “hat” ; (c) et (d) exemples de l'application du filtre “hat”.

La figure 4.3.a montre une image de l'état initial du biofilm (à  $t = 0$ ) et la figure 4.3.b présente l'image après la transformation “imbothat”. Ce traitement permet d'homogénéiser le fond et de supprimer certains bruits. Cependant, le résultat manque encore de contraste.

### 4.3 Segmentation

La segmentation est le processus de division d'une image numérique en plusieurs régions (ensemble de pixels) ou d'objets dans le but de simplifier et/ou de modifier la représentation d'une image afin de faciliter son analyse. A ce stade les régions d'intérêt pour l'étude sont sélectionnées : dans notre cas, ce sont les bactéries. Ainsi, dans cette étape il faut détecter les bactéries présentes sur chaque image avec la meilleure exactitude possible. Toutefois, dans la plupart des cas, l'histogramme de l'image filtrée n'est pas bimodal, ce qui rend l'identification



**Figure 4.3** – (a) Image originale de l'état initial de la colonisation; (b) Image obtenue après la transformation "imbothat"; (c) Contour des bactéries obtenue en calculant le gradient du niveau de gris; (d) Image obtenue après la binarisation

des bactéries très délicate par un seuillage direct. De ce fait, nous avons choisi une méthode de détection de contour basée sur le gradient des niveaux de gris.

Dans le domaine du traitement d'images numériques, de nombreuses méthodes ont utilisé des filtres de type dérivateur qui permettent d'évaluer le gradient des niveaux de gris. Si nous considérons que le bord réel des bactéries correspond sur l'image à la variation la plus rapide des niveaux de gris, sa présence va donc se traduire par un maximum local dans la valeur du gradient. L'utilisation d'un seuil sur la valeur du gradient offre un moyen simple de différencier les bactéries qui sont situées dans une zone proche du plan focal de l'objectif et celles qui en sont plus éloignées.

Une images numérique se présente sous la forme d'une matrice  $I$  dont la valeur de chaque l'élément  $I_{ij}$  représente l'intensité du niveau de gris du pixel de coordonnées  $(i,j)$ . La norme du

gradient des niveaux de gris de l'image s'écrit mathématiquement par :

$$\|\nabla I\| = \sqrt{\left|\frac{\partial I}{\partial x}\right|^2 + \left|\frac{\partial I}{\partial y}\right|^2} \quad (4.2)$$

Les dérivées peuvent être approximées par des méthodes aux différences finies. Les filtres les plus utilisés (*Roberts, Prewitt, Sobel. ...*) sont prédéfinis dans la boîte à outils de traitement d'images offerte par le logiciel MATLAB ([Gonzalez et al., 2003](#)). Cependant, ces filtres ont le défaut d'être anisotropes et privilégient donc une composante directionnelle sur l'image. Cette observation a conduit [Marmottant \(2001\)](#) à utiliser un filtre, appelé *sigma*, plus respectueux de l'isotropie. Pour chaque pixel, le gradient est défini comme l'écart-type entre la valeur des niveaux de gris de ce pixel et celles des huit pixels voisins :

$$\Sigma = \sqrt{\langle (I - \langle I \rangle)^2 \rangle} \quad (4.3)$$

La moyenne  $\langle I \rangle$  est calculée par la convolution de l'image avec la matrice

|   |   |   |
|---|---|---|
| 1 | 1 | 1 |
| 1 | 0 | 1 |
| 1 | 1 | 1 |

Une valeur de seuil de l'intensité  $I_S$  est ensuite calculée en utilisant la méthode d'Otsu ([Otsu, 1979](#)) afin d'obtenir une image binarisée. En effet, cette valeur correspond à la frontière du contour des bactéries (ou de colonies dans le cas du biofilm). Nous effectuons ensuite un seuillage sur l'image dont le fond a été préalablement homogénéisé (filtre "hat") : tous les minimums locaux dont la profondeur  $h$  est inférieure à  $I_S$  sont éliminés. Les minimums locaux sont définis par des pixels connectés dont les niveaux de gris (notés  $I_{int}$ ) sont identiques et inférieurs à ceux des pixels voisins (notés  $I_{ext}$ ). La profondeur d'un minimum local  $h$  est la différence entre  $I_{int}$  et  $I_{ext}$  [Soille \(1999\)](#). La figure 4.3.c donne un exemple d'image traitée par le filtre *sigma*. L'identification du plus fort gradient délimite le contour des bactéries. La figure 4.3.d donne un exemple d'image binarisée.

Cependant, malgré les précautions prises par rapport au choix de la méthode de segmentation, plus adaptée aux traitements des images avec des bactéries, nous avons rencontré quelques difficultés au niveau de la segmentation des images de façon automatique, principalement dans le cas d'un biofilm développé. Nous observons que chaque image a une intensité lumineuse différente, ce qui complique la segmentation. Cette différence de l'intensité lumineuse est due à deux facteurs principaux :

1) Position de prise des images selon "x" et "y" : Les images prises à la proximité du bord de la chambre d'écoulement ont moins de lumière comparées aux images prises au milieu. Cela se produit car les bords de la chambre d'écoulement sont plus épais qu'au centre. Les bords laissent passer moins de lumière à travers la chambre, créant ainsi des ombres sur la zone d'observation, ce qui gêne l'observation des bactéries ou du biofilm. Par conséquent, à chaque position nous avons besoin d'ajuster la lumière en jouant sur le réglage du microscope confocal. Cependant, même avec cet ajustement, l'intensité de lumière n'est jamais exactement la même pour toutes

les images.

2) Position de prise des images sur “z” : En ce qui concerne le biofilm développé, selon la densité du biofilm et la profondeur de la couche observée, le passage de la lumière est plus ou moins perturbé. Pour remédier à ce problème, nous utilisons la technique de compensation de lumière. Ceci permet de régler l’intensité en fonction des besoins, en réglant soit la puissance du laser, soit le gain, soit les deux.

En pratique, nous fixons la valeur de la puissance du laser ou/et du gain pour obtenir une visualisation optimale de l’image prise au niveau de la lamelle en verre ( $h_{biofilm} = h_{min} = 0$ ) et pour l’image prise au niveau de la couche la plus profonde du biofilm ( $h_{biofilm} = h_{max}$ ). De manière logique, l’intensité de lumière nécessaire pour la visualisation du biofilm est plus faible sur  $h_{min}$  ( $I_{min}$ ) que sur  $h_{max}$  ( $I_{max}$ ).

En faisant augmenter linéairement la puissance (ou gain) de  $I_{min}$  à  $I_{max}$ , suivant l’épaisseur observée, nous pouvons observer clairement les cellules bactériennes à l’intérieur du biofilm. Cependant, comme la compensation se fait de manière linéaire et la densité du biofilm n’est pas forcément linéaire selon l’épaisseur (direction “z”), les images acquises sur les différentes couches du biofilm n’ont pas les mêmes intensités. Par conséquent, il est impossible d’imposer un seuillage unique pour différencier les bactéries situées dans ou hors du plan focal pour l’ensemble des images prises. Malgré la compensation de la lumière avec le microscope CLSM et la technique de segmentation mis en place, certaines images ont une qualité insuffisante pour procéder à l’analyse des images. Ces images correspondent principalement à des biofilms d’épaisseur importante (par exemple les biofilms développés pendant 72 h). A cause de l’obstruction de la lumière, ces images présentent un bruit de fond élevé.

C’est pourquoi, après un premier traitement automatique, on procède systématiquement à un contrôle visuel, en comparant les images traitées aux images originales. Si l’opérateur juge que les images ne sont pas traitées correctement par l’algorithme, celles-ci doivent être alors traitées à nouveau de façon “manuelle”, en ajustant le seuil jusqu’à ce que l’on juge le traitement correct. Pour une expérience donnée, le pourcentage d’images traitées de façon “manuelle” est très variable. Par exemple, dans un biofilm développé sur 24 h à faible débit ( $22\mu l/mim$ ), ce qui correspond à une densité bactérienne faible, le pourcentage d’images traitées de façon “manuelle” est proche de 2%. Pour des biofilms développés sur 72 h à fort débit ( $1000\mu l/mim$ ) ce pourcentage peut monter à 95%.

## 4.4 Post-Traitement

Le post-traitement est la phase dans laquelle la détection et la définition des structures obtenues à l’étape précédente peut être améliorée (lissage des contours, suppression des bruits...). A ce stade, il faut être prudent afin de ne pas produire d’artefacts qui peuvent interférer sur l’analyse de l’image.

Les opérations de traitement les plus largement utilisées pour les images binaires sont les transformations utilisant la morphologie mathématique. Celles-ci comprennent l’érosion et la dilatation, ou des combinaisons ou évolutions de ces deux opérations (Russ, 2011).

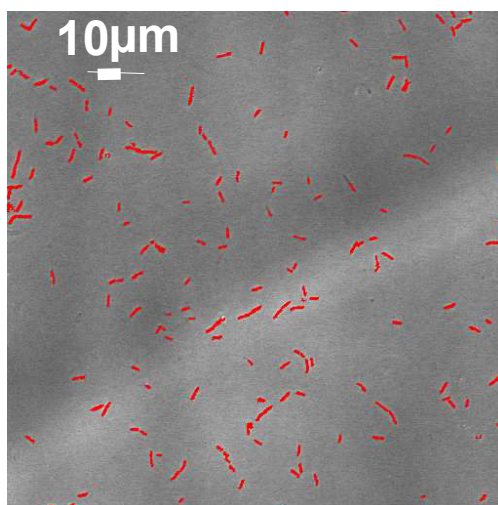
Pour les images du biofilm déjà développé, nous avons utilisé la fermeture morphologique,

qui correspond à l'application de l'opération morphologique de dilatation suivie par une érosion, la transformation transposée. Dans l'opération de dilatation, la valeur du pixel de sortie est la valeur maximale de tous les pixels dans le voisinage du pixel d'entrée. Le voisinage est défini par un élément structurant de taille et forme géométrique données. Dans une image binaire, si l'un des pixels est défini par une valeur égale à 1, le pixel de sortie est ainsi mis à 1. Dans l'opération d'érosion la valeur du pixel de sortie est la valeur minimale de tous les pixels dans le voisinage du pixel d'entrée. Dans une image binaire, si l'un des pixels est réglé sur 0, le pixel de sortie est fixé à 0. La fermeture a finalement pour effet de faire disparaître les trous de petite taille dans les structures et de connecter les structures proches.

## 4.5 Analyse d'image

L'analyse d'image vise à mesurer certaines caractéristiques de l'image traitée afin de l'interpréter de façon pertinente. Les informations recherchées peuvent être de plusieurs genres comme par exemple le nombre moyen ou la dimension des bactéries.

Dans notre cas, après le post-traitement, un programme développé sous logiciel Matlab vient ensuite analyser chaque image en repérant la position de chaque bactérie. Nous obtenons ainsi la surface occupée et le nombre de bactéries sur chaque image. Nous avons choisi de calculer le nombre des bactéries uniquement pour les images concernant l'instant initial de colonisation car il est difficile d'identifier le nombre de bactéries lors qu'elles sont sous forme de colonies dans un biofilm développé. Comme le montrent les images de la figure 4.4, les bactéries dans la phase de colonisation sont dispersées sur toute la surface du support et plus facilement identifiables. L'image 4.3 présente en rouge le résultat du comptage des bactéries. En comparant les résultats donnant le nombre de bactéries obtenu automatiquement via le traitement des images et ceux obtenus par comptage manuel nous estimons que l'erreur est inférieure à 5%.



**Figure 4.4** – Résultat du comptage (identification des bactéries)

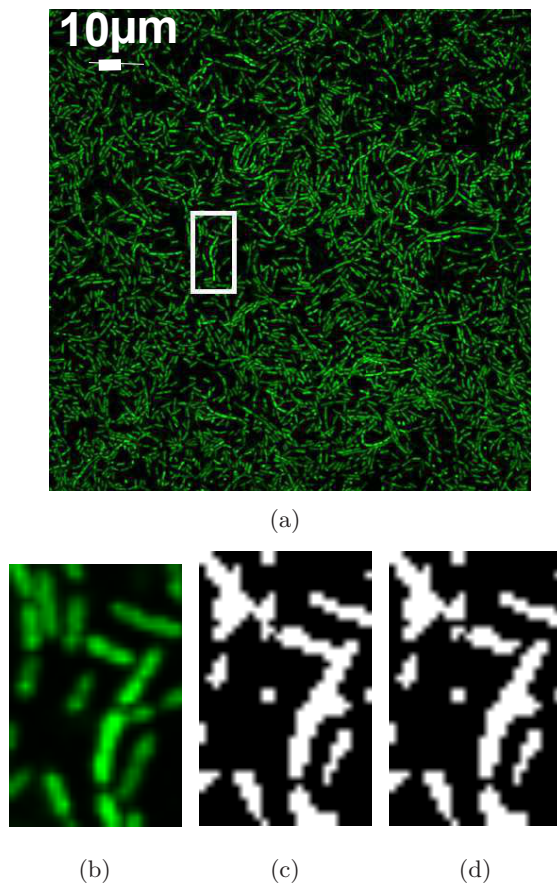


Une méthode bien connue pour délimiter chaque objet est l'algorithme de segmentation "ligne de partage des eaux" (LPE), ou "watershed" en anglais. Toutefois, l'efficacité de cette méthode dépend de la définition de l'image, plus exactement du nombre de pixels que contient l'objet d'intérêt, ainsi que de la forme des objets.

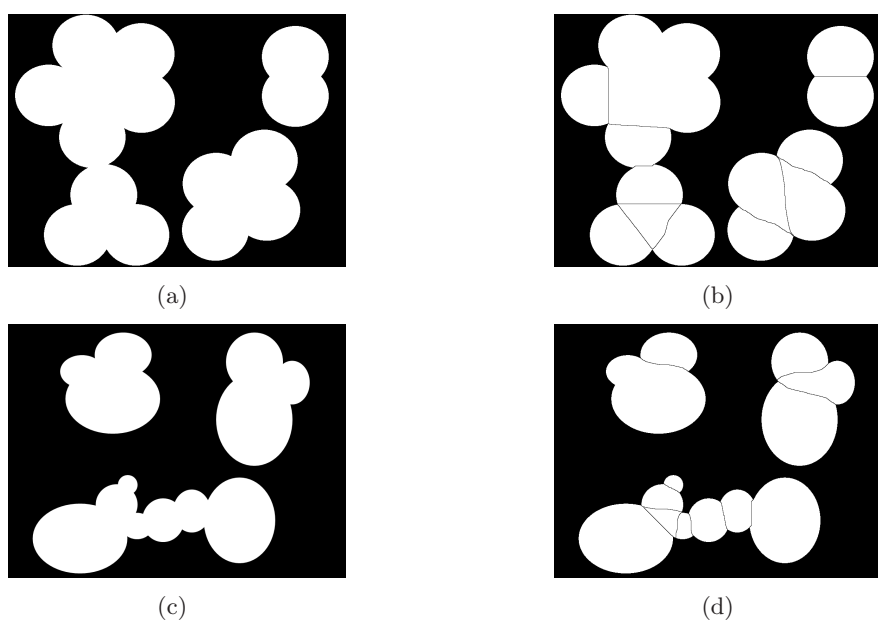
Dans notre étude nous utilisons la bactérie *P.Putidas* qui a une forme de bâtonnet. Dans les images prises sur le biofilm, le nombre de pixel des objets détectés est très variable, selon la taille et la définition de l'image, mais surtout selon le niveau de maturation du biofilm et de l'espace disponible pour le développement des bactéries.

Pour les images concernant le développement du biofilm, nous observons ainsi des filaments bactériens de quelques centaines de pixels. De plus, au cours du développement du biofilm, les bactéries ont moins d'espace disponible sur le support (lamelle en verre). Nous avons alors observé que les bactéries qui se développent avec moins d'espace ont une tendance à avoir une plus petite taille : dans ce cas chaque bactérie est définie pour un nombre réduit de pixels, environ 15 pixels.

La figure 4.5 présente un détail d'une position donnée d'une image de biofilm, après binarisation et l'application du traitement de segmentation "watersheld". Nous pouvons constater sur l'image (b) qu'à cette position plusieurs bactéries se retrouvent sous la forme de petites colonies. Nous observons sur l'image (d) qu'après l'application du traitement "watershed" nous ne retrouvons pas la délimitation exacte des bactéries et donc le nombre correct de bactéries. La figure 4.6 présente une image artificielle test de plus grande résolution, contenant des objets "simples" en forme de "bulles". Dans ce cas on constate que le traitement "watersheld" est plus efficace pour segmenter les bulles agglomérées. Cependant, même dans ce cas, on observe encore des limitations de la méthode : les "bulles" superposées avec une plus grande zone d'intersection ne sont ainsi pas bien identifiées. Notre cas étant plus complexe, on constate au final que la méthode "watersheld" n'est pas adaptée pour le traitement des images avec une petite résolution et avec des bactéries se développant sous formes de colonie.



**Figure 4.5** – (a) Image acquise pendant la formation du biofilm; (b) Image avec un zoom sur un détail de la colonisation; (c) Image obtenue après la binarisation et (d) Image avec l'application du traitement “watersheld”



**Figure 4.6** – Figures (a) et (c) : Images binarisées avec des bulles; Figures (b) et (d) : Images avec l'application de le traitement “watersheld”

## 4.6 Conclusion

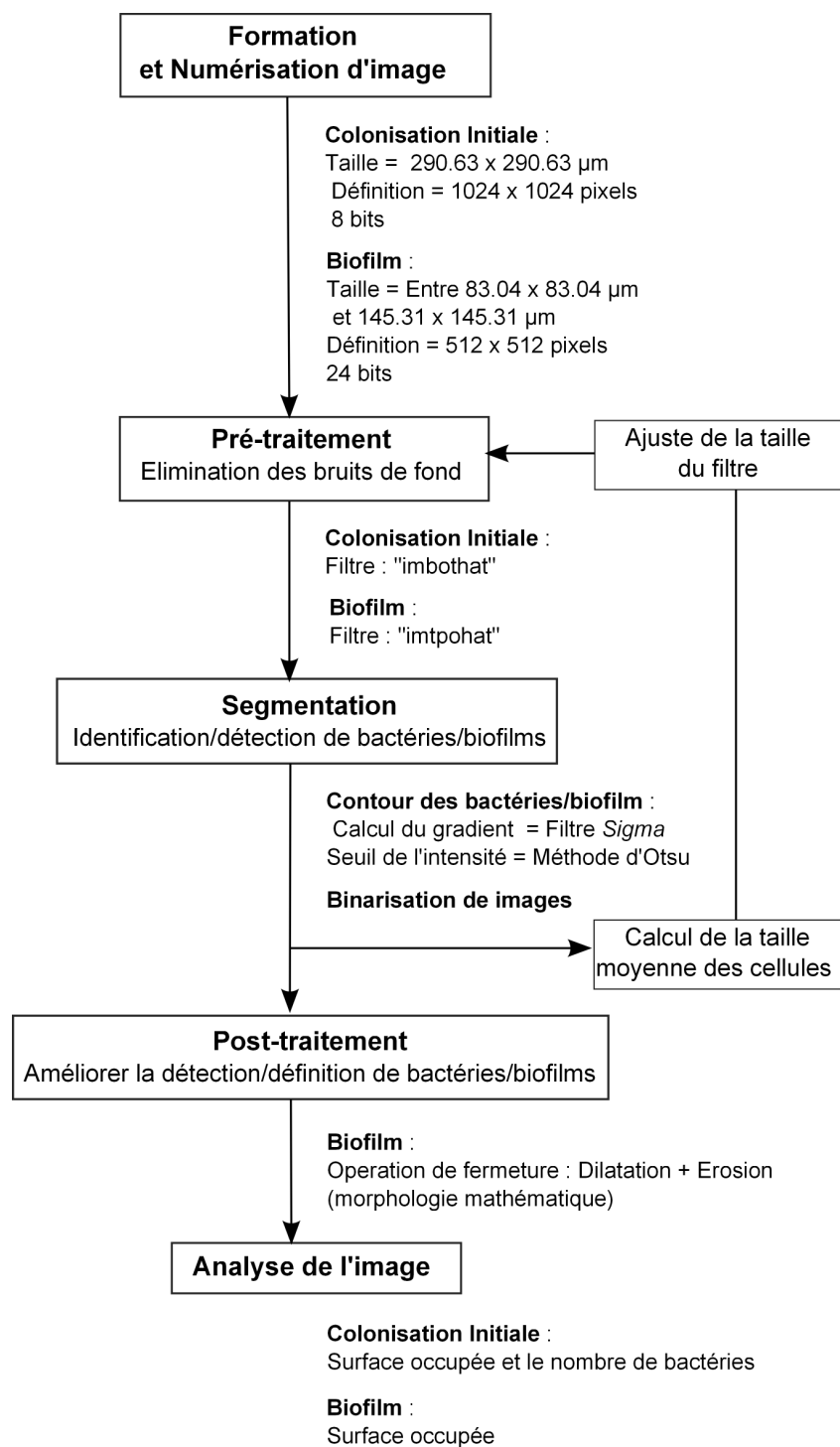
Ce chapitre a présenté la procédure mise en oeuvre pour traiter les images et en extraire l'information pertinente en vue de leur analyse ultérieure.

Selon les configurations étudiées par la suite (colonisation initiale de la lamelle ou étude d'un biofilm développé), les images auront une définition et une résolution différente. Dans la première configuration, la définition des images est de  $1024 \text{ pixels} \times 1024 \text{ pixels}$  (pour un champ d'observation de  $290.63 \mu\text{m} \times 290.63 \mu\text{m}$ ) et elles sont codées sur 8 bits. Dans le second cas, la définition des images est de  $512 \text{ pixels} \times 512 \text{ pixels}$  (pour un champ d'observation allant de  $83.04 \mu\text{m} \times 83.04 \mu\text{m}$  à  $145.31 \mu\text{m} \times 145.31 \mu\text{m}$  selon le zoom utilisé) et elles sont codées sur 24 bits. Les développements ont été réalisés avec Matlab par une utilisation la plus judicieuse possible de la bibliothèque d'outils de traitement disponible sous Matlab. La figure 4.7 présente un schéma illustratif des principales techniques de traitement d'images utilisées.

Quelle que soit la configuration étudiée, une attention particulière a été apportée quant à l'élimination des objets hors focus ou à l'élimination du bruit de fond inhérent à l'instrument de mesure. Les filtres morphologiques de type "imbothat" et "imtophat", pour lesquels la taille de l'élément structurant peut être paramétrée, se montrent particulièrement efficace. Ces filtres permettent une homogénéisation du fond tout en préservant la forme des objets d'intérêts. Malgré cela, du fait du contraste des images prétraitées, l'extraction des objets par un simple seuillage direct n'est pas envisageable. Nous avons donc utilisé une méthode de détection de contour basé sur le calcul du gradient de niveau de gris des images. On a préféré le filtre *Sigma* qui préserve l'isotropie. L'image du gradient est ensuite binarisée, le seuil étant calculé selon la méthode d'Otsu : cette méthode permet de détecter de manière précise le contour des bactéries ou des colonies.

Avant segmentation des images, un opérateur morphologique (fermeture) a été appliqué afin d'améliorer la définition des objets détectés (élimination de pixels isolés ou de trous, connexion de structures proches). La segmentation consiste ensuite à identifier chaque objet afin d'en calculer les caractéristiques (dénombrement, calcul de surface etc.). Pour le dénombrement, l'individualisation de chaque objet est primordiale et nous avons testé l'algorithme de "partage des eaux" (ou "watershed"), afin d'améliorer encore la détection des bactéries sur les images. Cependant, dans nos configurations, cet algorithme ne se montre que "relativement" performant et seulement sur des situations où le nombre d'objets est assez faible. La caractérisation des objets par comptage des bactéries individuelles sera donc réservé au cas où l'on analysera les conditions de la colonisation initiale de la lamelle de verre au cours des expériences. Pour la caractérisation du biofilm, il vaut mieux raisonner en surface pour minimiser les biais.

Notons pour finir que la procédure de traitement présentée 4.7 n'est que semi-automatique. Selon la structure et le degré de développement du biofilm, les conditions d'illumination varient d'une image à l'autre. Malgré les précautions prises au niveau du prétraitement (homogénéisation), il est difficile de trouver un seuil applicable à tout un set d'images de manière automatique. Le traitement s'effectue donc en deux passes : un premier traitement par le programme que nous avons développé, puis, quand cela est nécessaire, ajustement manuel du seuil par inspection visuelle des images traitées par rapports aux images brutes.



**Figure 4.7** – Schéma illustratif des principales techniques adoptées pour les traitements d'images.

## Chapitre 5

# L'état initial de la colonisation

La dynamique de la croissance bactérienne peut être modélisée de différentes façons et, d'un façon générale, la biomasse initiale d'un biofilm, supposée proportionnelle au nombre de bactéries initiales, est donc un des paramètres importants pour la modélisation. Ainsi, un point important concerne l'état initial de colonisation de la plaque inférieure des chambres d'écoulements pour chaque essai. En effet, la structure du biofilm, sur les temps courts, peut être fortement dépendante des conditions initiales. Même sur les temps longs, si les processus hydrodynamiques liés aux phénomènes d'érosion/détachement ont une place importante dans la structuration du biofilm (Picioreanu *et al.*, 2000c), il n'est pas certain que l'on perde la "mémoire" de l'état initial et que la structure du biofilm soit moins sensible à ces conditions initiales. De plus, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, l'utilisation de fluorochromes impose de fortes contraintes sur le déroulement des expériences (puisque'il n'est pas possible de suivre un biofilm en continu) et sur leur analyse du point de vue statistique. Dans ce chapitre, nous présentons ainsi une étude visant à caractériser l'état initial de colonisation de la chambre d'écoulement et sa variabilité d'une expérience à l'autre. Cette étude permettra entre autre de valider un protocole expérimental d'inoculation des chambres d'écoulements qui soit suffisamment robuste pour, à défaut d'assurer une reproductibilité parfaite d'un essai à l'autre, minimiser cette variabilité.

### 5.1 Déroulement de l'expérience

Les préparations des systèmes d'écoulement pour la caractérisation de l'état de la colonisation initiale se sont déroulées au laboratoire LTHE (Laboratoire d'Etude des Transferts en Hydrologie et Environnement). Les observations de l'occupation de la surface du support ont été réalisées au laboratoire Liphy. Pour ces expériences la chambre d'écoulement utilisée était la chambre PMMA modifiée.

L'ensemble du système d'écoulement est préalablement stérilisé avant chaque expérience. Les tuyaux et les aiguilles d'injection sont stérilisés à l'autoclave à une température de 120°C pendant 20 *min*. La chambre d'écoulement et la lamelle en verre sont stérilisées par exposition à une lampe à rayons ultraviolets. Ces deux derniers éléments sont ensuite mis en contact avec de l'éthanol à 70%. Le contact avec l'éthanol doit être rapide pour ne pas modifier les pro-

priétés de la surface des lamelles en verre : quelques secondes sont suffisantes pour compléter la stérilisation. Après le contact avec l'éthanol, la chambre et la lamelle en verre sont rincées avec de l'eau stérilisée. Les seringues utilisées pour le rinçage de la chambre d'écoulement et de la lamelle en verre, sont des seringues stériles à usage unique. L'assemblage et la manipulation du système, aussi bien que le rinçage de la lamelle en verre sont réalisés sur un poste de sécurité microbiologique - PSM (hotte à flux laminaire verticale).

A chaque expérience une nouvelle pré-culture est préparée en trois étapes, selon la section 3.1.2.3 : (i) inoculation des bactéries (prélevée de la solution stoke congelée) dans le milieu LA et incubation pendant 23 h à 30°C (ii) prélèvement d'une colonie dans le milieu LA pour l'inoculation en 3 ml du milieu LB modifié (iii) incubation de la pré-culture pendant 4 h à 30°C sous agitation à 180 rpm. Pour préconiser une concentration surfacique initiale la plus constante possible pour toutes les expériences, après 4 h d'inoculation, la pré-culture est diluée avec le milieu LB modifié jusqu'à une  $DO_{600} \approx 0.1$ .

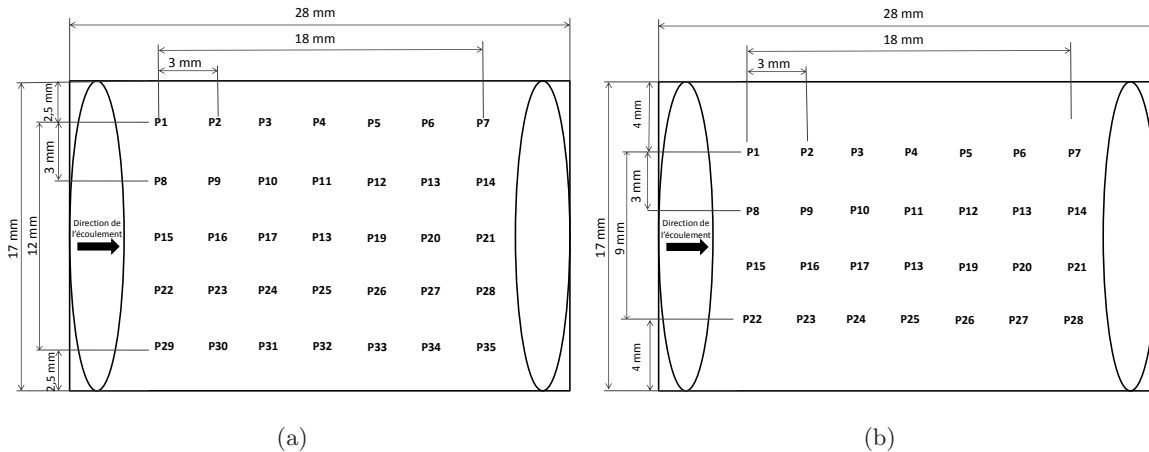
Après assemblage, le système est rempli avec le milieu LB modifié. Ensuite un volume de 1ml de la solution bactérienne préalablement préparée est injecté dans la chambre d'écoulement à l'aide d'une seringue. Le système est laissé au repos en conditions statiques (sans écoulement) pendant 10 min pour effectuer l'adhésion initiale des bactéries sur le support d'adhésion. A la fin de la phase d'adhésion initiale, un volume d'environ 10 ml de milieu LB modifié est injecté manuellement via une seringue pour permettre l'évacuation de la plus grande quantité possible des bactéries restées en suspension.

Après l'évacuation des bactéries en suspension, les bactéries initiales fixées ont été visualisées sous microscope confocal avec la lumière transmise. L'observation de la colonisation initiale a été réalisée en fond clair (les bactéries sont plus foncées que le fond), sans fluorochromes. Nous avons utilisé l'objectif 40× à immersion dans l'huile. Un zoom de 1 est utilisé, ainsi la taille de l'image est de  $290.63 \mu m \times 290.63 \mu m$ , pour une définition de  $1024 \text{ pixels} \times 1024 \text{ pixels}$ . La vitesse du scanner a été fixée à 400 hz. Avec cette définition et cette vitesse de scanner, le temps pour scanner chaque image est d'environ 8 secondes. Cette résolution a été choisie afin d'avoir une bonne visualisation et une bonne identification des bactéries.

## 5.2 Reproductibilité de l'état initial

Des essais ont été effectués pour vérifier la reproductibilité de l'état initial entre les chambres d'écoulement dans une même expérience. Nous avons réalisé 8 expériences où 2 à 4 chambres d'écoulement ont été analysées à chaque essai. Le protocole expérimental suivi était le même que celui décrit dans la section 5.1, le seul changement dans le protocole était le nombre d'images acquises. Pour avoir des données plus représentatives de la surface occupée, une zone plus grande, de taille 18 mm x 12 mm a été balayée. La prise d'images a été faite tous les 3 mm, ce qui donne un total de 35 images pour chaque chambre (voir figure 5.1.a). Les essais  $n$  1 et 2 constituent une exception dans la mesure où la zone balayée était de 18 mm x 9 mm, soit un

total de 28 images pour chaque chambre. (voir figure 5.1.b).



**Figure 5.1** – Positions des prises des images pour l'état initial du biofilm. (a) Les essais  $n$  3, 4 et 5 et (b) les essais  $n$  1 et 2

Après avoir été acquises, les images ont été traitées afin de calculer le nombre de bactéries adhérentes ainsi que la surface occupée par ces dernières. Le tableau 5.1 résume les résultats des 5 essais les plus pertinents. L'annexe B présente les résultats du traitement des images pour toutes les positions dans les chambres. La variable  $s_t$  correspond à la somme de la surface occupée par les bactéries  $s_i$  sur l'ensemble des images prises pour chaque chambre analysée :  $s_t = \sum s_i$ .  $\langle s_t \rangle$  correspond à la valeur moyenne de  $s_t$  à chaque essai.  $\Delta s_{total}$  est l'écart relatif entre  $s_t$  et sa valeur moyenne.  $N$  est la somme du nombre de bactéries dénombrées sur l'ensemble des images prises pour chaque chambre analysée  $N = \sum N_i$ .  $\langle N \rangle$  est le nombre moyen de bactéries attachées.  $\Delta N$  est l'écart relatif sur le nombre de bactéries. Il est calculé par rapport au nombre moyen de bactéries pour chaque essai. Le temps  $t_{P1}$  est le temps écoulé entre l'évacuation des bactéries en suspension et la prise de la première image (P1).

Les résultats de ces essais montrent que le temps écoulé entre l'évacuation des bactéries en suspension et la prise des images joue énormément sur la quantité de bactéries adhérentes sur la surface. Comme les images sont traitées par un programme de façon "semi-automatique", un autre facteur d'importance est la qualité des images acquises. En général, nous pouvons constater que pour un même essai, les dernières chambres à analyser, sans écoulement pendant plus longtemps (environ 2 heures), ont moins de bactéries adhérentes sur la surface, comme on le constate pour les essais  $n$  2 et 3. Suite à des observations sous microscope, il s'avère que les bactéries ont une tendance à se détacher de la surface en verre lorsqu'elles sont exposées à un environnement sans écoulement.

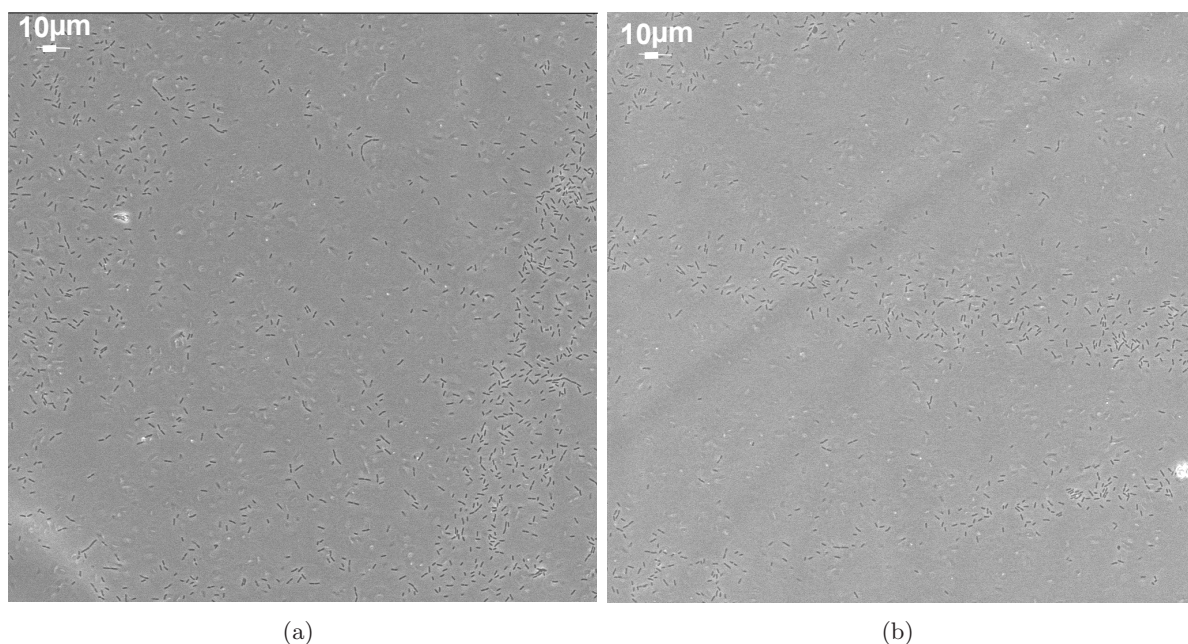
En ce qui concerne l'augmentation de la quantité de bactéries dans la chambre 1.2 de l'essai  $n1$ , on observe l'existence de lignes préférentielles de dépôt avec une plus grande concentration de bactéries sur ces zones (voir figure 5.2). Ces lignes préférentielles sont probablement dues à un défaut de la lamelle de verre ou à des traces laissées lors du nettoyage de la lamelle de verre : cela peut entraîner une plus grande affinité des bactéries pour ces zones à cause



| Essais | Chambre | Nb. images | $s_t$    | $\bar{s}_t$ | $\Delta s_{total}$ | $N$       | $\langle N \rangle$ | $\Delta N$ | $t_{P1}$ |
|--------|---------|------------|----------|-------------|--------------------|-----------|---------------------|------------|----------|
|        |         |            | [pixels] | [pixels]    | [%]                | [cellule] | [cellule]           | [%]        | [hr]     |
| 1      | 1.1     | 28         | 596208   | 644768      | -7.53              | 23311     | 25491               | -11.70     | 1h17     |
|        | 1.2     | 28         | 693329   |             | +7.53              | 28474     |                     | +11.70     | 2h29     |
| 2      | 2.1     | 28         | 395023   | 367311      | +7.54              | 14081     | 13964               | +0.84      | 0h38     |
|        | 2.2     | 28         | 390297   |             | +6.26              | 14302     |                     | +2.42      | 1h02     |
|        | 2.3     | 28         | 316612   |             | -13.80             | 13508     |                     | -3.26      | 1h25     |
| 3      | 3.2     | 35         | 464250   | 436507      | +6.36              | 19867     | 20849               | -4.71      | 0h42     |
|        | 3.3     | 35         | 433566   |             | -0.67              | 20346     |                     | -2.41      | 1h11     |
|        | 3.4     | 35         | 411705   |             | -5.68              | 22333     |                     | +7.11      | 2h15     |
| 4      | 4.1     | 35         | 716231   | 689785      | +3.83              | 29092     | 27166               | +7.09      | 0h57     |
|        | 4.2     | 35         | 739455   |             | +7.20              | 28265     |                     | +4.05      | 1h28     |
|        | 4.3     | 35         | 715558   |             | +3.74              | 27048     |                     | -0.43      | 1h58     |
|        | 4.4     | 35         | 587897   |             | -14.77             | 24257     |                     | -10.71     | 2h21     |
| 5      | 5.1     | 35         | 522464   | 382606      | +36.55             | 26432     | 19573               | +35.04     | 0h34     |
|        | 5.2     | 35         | 309701   |             | -19.05             | 15498     |                     | -20.82     | 1h09     |
|        | 5.4     | 35         | 315652   |             | -17.50             | 16789     |                     | -14.22     | 2h19     |

**Table 5.1** – Reproductibilité de l'état initial. La taille et la définition d'images :  $290.63 \times 290.63 \mu m$  et  $1024 \times 1024 pixels$ , respectivement

de différence dans l'état de surface. En ce qui concerne la plus grande quantité de bactéries mesurée dans la chambre 4.1 de l'essai  $n4$ , il s'avère que certaines images acquises dans cette chambre ont une mauvaise qualité. Cela entraîne des erreurs sur le calcul de la surface colonisée.



**Figure 5.2** – Prise des images de la chambre 1.2 avec l'observation des lignes préférentielles de dépôt des bactéries et une plus grande concentration des bactéries sur cette zone.

Pour l'essai  $n2$ , la chambre 2.1 n'a pas montrée l'existence d'un grande quantité de bactéries en suspension. Cependant, la chambre 2.2, examinée ensuite, a révélée une plus forte remise en

suspension (en particulier à partir de la position  $P16$  - voir figure 5.1.b, soit 1h après l'adhésion). La chambre 2.3, examinée après la chambre 2.2, montrait quant à elle une encore plus forte quantité de bactéries en suspension, ceci sur toutes les positions observées. Si nous négligeons la dernière chambre à analyser (chambre 2.3), l'écart relatif descend à 0.6 % pour la surface occupée et 0.8 % pour le nombre de bactéries.

Pour l'essai  $n3$ , on constate visuellement l'existence de bactéries en suspension en sortie de la zone observée pour la première chambre analysée (chambre 3.2). Ainsi, pour cette chambre, si on compare la surface occupée au niveau des 7 premières positions ( $P1$  à  $P7$ ) et des 7 dernières positions ( $P22$  à  $P28$ ) nous constatons une différence de 157% sur la surface occupée. La dernière chambre quant à elle (chambre 3.4) souffre de la mauvaise qualité de plusieurs images. Si nous négligeons cette dernière chambre, nous obtenons un écart relatif de 3.4 % et 1.2 % pour la surface occupée et le nombre de bactéries respectivement.

L'essai  $n4$  est lui aussi entâché par des biais dus à certaines images de qualité médiocre pour la chambre 4.1 et chambre 4.4. Si nous négligeons la dernière chambre (chambre 4.4), l'écart relatif est 2.2 % et 3.9 % pour la surface occupée et le nombre de bactéries respectivement.

Enfin, dans l'essai  $n5$ , toutes les images de la chambre 5.1 sont de mauvaise qualité, alors que la chambre 5.2 et chambre 5.4 ont des qualités d'images comparables. Si nous négligeons la première chambre, l'écart relatif est de 0.95 % et 4 % pour la surface occupée et le nombre de bactéries respectivement.

Finalement, en ce qui concerne la reproductibilité de la colonisation initiale pour une même série d'essais, si nous faisons abstraction de l'essai  $n1$  (structures préférentielles pour le dépôt et l'adhésion des bactéries), des chambres pour lesquelles les images étaient de qualité médiocre, ainsi que des cas où la quantité de bactéries en suspension est prohibitive pour éviter les biais lors de l'analyse semi-automatique, les valeurs maximales de l'écart relatif sont égales à 3.42 % et 4 % pour la surface occupée et le nombre de bactéries respectivement (conformément au tableau 5.2).

| Essais | Chambre | Nb. images | $s_t$    | $\bar{s}_t$ | $\Delta s_{total}$ | $N$       | $\langle N \rangle$ | $\Delta N$ | $t_{P1}$ |
|--------|---------|------------|----------|-------------|--------------------|-----------|---------------------|------------|----------|
|        |         |            | [pixels] | [pixels]    | [%]                | [cellule] | [cellule]           | [%]        | [hr]     |
| 2      | 2.1     | 28         | 395023   | 392660      | +0.60              | 14081     | 14192               | -0.78      | 0h38     |
|        | 2.2     | 28         | 390297   |             | -0.60              | 14302     |                     | +0.78      | 1h02     |
| 3      | 3.2     | 35         | 464250   | 436507      | +3.42              | 19867     | 20107               | -1.19      | 0h42     |
|        | 3.3     | 35         | 433566   |             | -3.42              | 20346     |                     | -1.19      | 1h11     |
| 4      | 4.1     | 35         | 716231   | 723748      | -1.04              | 29092     | 28135               | +3.4       | 0h57     |
|        | 4.2     | 35         | 739455   |             | +2.17              | 28265     |                     | +0.46      | 1h28     |
|        | 4.3     | 35         | 715558   |             | -1.13              | 27048     |                     | -3.86      | 1h58     |
| 5      | 5.2     | 35         | 309701   | 312677      | -0.95              | 15498     | 16144               | -4.00      | 1h09     |
|        | 5.4     | 35         | 315652   |             | +0.95              | 16789     |                     | +4.00      | 2h19     |

**Table 5.2** – Principaux résultats par rapport la reproductibilité de l'état initial

Pour conclure, afin d'éviter -ou du moins minimiser- le détachement des bactéries lorsque les conditions statiques sont imposées, le temps écoulé entre l'injection du milieu LB pour l'évacuation des bactéries en suspension et la fin de l'acquisition des images ne doit pas dépasser 1 heure. Ce résultat explique les contraintes et donc les difficultés engendrées pour observer dans

des conditions idéales l'état de la colonisation initiale de toutes les chambres d'écoulement pour un même essai.

Parmi ces difficultés, le déplacement du système d'écoulement, depuis le laboratoire où sont cultivés les biofilms (LTHE) vers le laboratoire où sont faites les analyses au microscope confocal (Liphy), est l'un des problèmes les plus contraignants : ce déplacement contribue de manière non négligeable au temps pour lequel les bactéries se retrouvent en conditions statiques (avec une tendance de plus en plus forte au détachement de la plaque inférieure). Le déplacement de l'expérience peut aussi engendrer des dégradations, comme par exemple l'endommagement de la plaque inférieure ou la déconnexion de certains tuyaux. De plus même si ces dégradations sont évitées, le simple déplacement des expériences les rend vulnérables à une contamination extérieure par d'autres bactéries.

Pour contourner ces contraintes, une méthode alternative a été utilisée pour avoir tout de même une caractérisation de l'état initial des expériences qui ont suivies (chapitre 6) : cette méthode consiste à utiliser une seule chambre témoin pour une même série d'essais. La chambre témoin doit être préparée en même temps et selon le même protocole que les chambres où le biofilm se développera. Après préparations, les chambres d'écoulement sont placées sur le système d'alimentation du milieu LB et l'écoulement est amorcé. Ensuite la chambre témoin est déplacée jusqu'au microscope pour l'acquisition des images de l'état initial. D'après ce qui a été montré plus haut, la procédure de colonisation initiale des chambres est relativement bien contrôlée pour une même série d'essai. On fait alors l'hypothèse que la chambre témoin est représentative pour la série et qu'elle donne une bonne indication des conditions initiales pour les autres chambres d'écoulement.

### 5.3 Distribution spatiale

Pour pouvoir analyser l'homogénéité de la répartition spatiale des bactéries initialement adhérees sur le support inférieur, nous avons comparé la quantité de biomasse mesurée à chaque position analysée avec la biomasse moyenne de la chambre d'écoulement. Cette analyse a été réalisée sur les essais présentés dans le tableau 5.2. Nous avons utilisé en priorité les essais disposant de 35 positions analysées, plus représentatifs de la surface. Ainsi l'essai  $n2$ , comprenant seulement 28 positions, n'a pas été pris en compte.

Pour évaluer cette distribution, l'écart type ( $\sigma$ ), le coefficient de variation (CV) et le coefficient de variation corrigé (CV') ont été calculés pour les paramètres concernant la surface et le nombre des bactéries. Le coefficient de variation est le rapport de l'écart-type sur la moyenne arithmétique exprimé en pourcents (donc sans dimension) :

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (5.1)$$

où  $\bar{x}$  est la moyenne de la surface occupée (ou du nombre de bactéries) sur toutes les positions.

Le coefficient de variation sert à évaluer la dispersion d'une distribution (échantillon ou population) et également à valider la représentativité de la moyenne. Selon [Veysseyre \(2006\)](#),

une valeur du coefficient de variation inférieure à 15% traduit une bonne homogénéité de la distribution. Ainsi, si le coefficient de variation est inférieur à 15%, la répartition spatiale est considérée homogène et la moyenne est représentative de la distribution et, inversement, si le coefficient de variation est supérieur à 15%, la répartition spatiale est considérée comme hétérogène et il faut utiliser avec prudence la moyenne de la distribution.

Le coefficient de variation corrigé ( $CV'$ ) est le coefficient de variation sans la prise en compte des images proches de la paroi de la chambre d'écoulement (c'est à dire, sans prendre en compte les positions  $P1$  à  $P7$  et  $P29$  à  $P35$ , conformément à la figure 5.1.a).

Dans notre système, le rapport d'aspect entre la hauteur et la largeur du micro-canal est de 0.015, soit un rapport très petit devant 1. Ainsi, en comparant la valeur de  $CV$  avec  $CV'$ , nous pouvons vérifier si le dépôt bactérien pour l'état initial n'est pas affecté par la proximité des parois.

Dans cette analyse, la distance entre la première (ou dernière rangée) d'images et la paroi de la chambre est la même que pour les essais réalisés pour le développement du biofilm, soit 2.5 mm (voir figure 4.1 et figure 5.1a). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 5.3 et sur les graphiques de la figure 5.3.

| Essais           | Chambre | $\langle s_i \rangle$<br>[pixels] | $\sigma(s_i)$<br>[pixels] | $CV(s_i)$<br>[%] | $CV'(s_i)$<br>[%] | $\langle N \rangle$<br>[cells] | $\sigma(N)$<br>[cells] | $CV(N)$<br>[%] | $CV'(N)$<br>[%] |
|------------------|---------|-----------------------------------|---------------------------|------------------|-------------------|--------------------------------|------------------------|----------------|-----------------|
| 3                | 3.2     | 13264                             | 4239                      | 31.96            | 17.73             | 568                            | 155                    | 27.36          | 14.85           |
|                  | 3.3     | 12388                             | 3462                      | 27.95            | 21.29             | 581                            | 148                    | 26.52          | 17.35           |
| 4                | 4.1     | 20464                             | 2997                      | 14.64            | 12.45             | 831                            | 88                     | 10.65          | 10.32           |
|                  | 4.2     | 21127                             | 3493                      | 16.54            | 17.40             | 808                            | 99                     | 12.25          | 13.66           |
|                  | 4.3     | 20445                             | 6720                      | 32.87            | 38.01             | 773                            | 236                    | 30.54          | 34.54           |
| 5                | 5.2     | 8849                              | 1422                      | 16.07            | 14.47             | 443                            | 58                     | 13.13          | 13.13           |
|                  | 5.4     | 9019                              | 2868                      | 31.80            | 25.24             | 480                            | 138                    | 28.67          | 20.52           |
| <b>Moyenne :</b> |         |                                   |                           | 24.55            | 20.94             | <b>Moyenne :</b>               |                        | 21.16          | 17.83           |

**Table 5.3** – Analyse de la répartition spatiale sur les chambres d'écoulement

En ce qui concerne l'influence des parois sur la déposition bactérienne, en comparant  $CV$  avec  $CV'$ , sur les 7 chambres analysées, lorsque les images acquises à proximité des parois ne sont pas prises en compte, on constate une réduction du coefficient de variation sur 5 chambres et une augmentation sur 2 chambres. Ces valeurs ne présentent pas la même tendance à proximité des parois pour tous les essais (croissance ou décroissance selon les cas). Nous considérerons donc que les parois n'affectent pas l'écoulement et par là même le dépôt des bactéries.

En ce qui concerne la distribution initiale des bactéries sur la chambre d'écoulement, en examinant la valeur de  $CV$ , nous pouvons constater que les chambres 4.1, 4.2 et 5.2 présentent une répartition plutôt homogène. Cependant, 4 chambres sur 7 présentent aussi une valeur de  $CV$  supérieure à 15%. Au final, ces premiers résultats montrent que la distribution spatiale initiale des bactéries présente une certaine hétérogénéité mais qui reste acceptable avec une moyenne  $\overline{CV}(s_i)$  égale à 25% et  $\overline{CV}(N)$  égale à 21%.

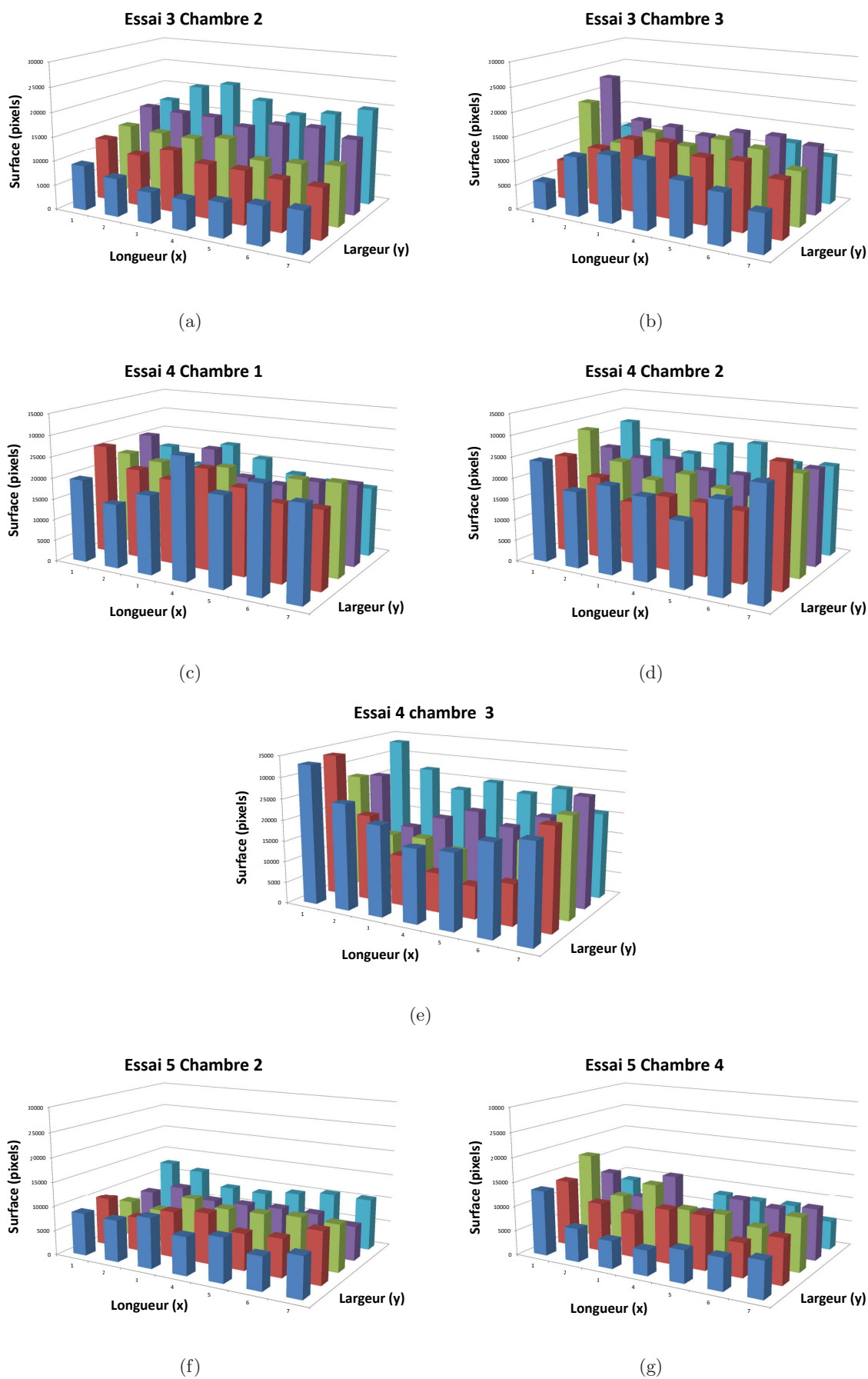


Figure 5.3 – Répartition spatiale initiale des bactéries.



## 5.4 Conclusion

Des essais ont été réalisés pour vérifier la reproductibilité et la distribution spatiale de l'état initial de la colonisation. Les expériences se sont déroulées dans un environnement stérile, en utilisant la chambre PMMA modifiée et le milieu LB modifié.

La caractérisation de la distribution initiale des bactéries a été réalisée tout en identifiant les facteurs pouvant amener certains biais sur cette caractérisation.

Parmi ces facteurs, la qualité intrinsèque des images, prises en lumière transmise, est importante : Comme nous l'avons vu au chapitre 4, nous avons mis en place des traitements visant à réduire au maximum le bruit de fond afin de comptabiliser de la manière la plus précise possible le nombre de bactéries et la surface colonisée.

Au-delà des problèmes de manutention, favorisant d'éventuelles contamination, un autre facteur est lié au protocole suivi pour la mise en place des expériences : nous avons ainsi mis en évidence l'importance de la durée pendant laquelle les bactéries sont en conditions statiques, entre le moment où on procède à l'évacuation des bactéries restant en suspension et la première prise d'image. Une durée trop longue semble favorable à une remise en suspension des bactéries ce qui nuit évidemment à la reproductibilité des résultats. Cela impose des contraintes logistiques au niveau du déplacement des expériences du lieu de culture vers le lieu d'observation. Cela impose aussi des contraintes sur le protocole expérimental lui-même, en particulier quand plusieurs chambres d'écoulement sont cultivées en parallèles. Dans ce cas, il est très difficile d'assurer que cette durée est inférieure au seuil critique pour toutes les chambres (analysées de manières séquentielles) : ceci introduit un biais dans l'analyse de la reproductibilité statistique de l'état initial entre les différentes chambres.

Pour pallier cette difficulté, utiliser une seule chambre témoin pour un jeu d'essai semble en première approximation être une alternative acceptable pour assurer la représentativité de l'état initial pour toutes les chambres de cet essai. Cette méthode a aussi l'avantage d'un gain de temps notable, pour la suite du travail, étant donné la quantité d'images acquises et de la durée nécessaire pour le traitement et l'analyse des images.

En ce qui concerne les données quantitatives pour la caractérisation des conditions initiales : nous n'observons pas l'influence directe des parois en comparant les différentes valeurs du coefficient de variation CV et CV'. Toutes les positions pour lesquelles seront prises les images sont donc représentatives. La distribution initiale des bactéries sur la chambre d'écoulement quant à elle a une tendance vers une hétérogénéité d'un niveau acceptable de l'ordre de 21 à 25%.

Enfin, nous pouvons observer que, dans un même essai, les concentrations surfaciques initiales dans les différentes chambres sont semblables. Cette similitude n'est pas observée d'un essai à l'autre, malgré les précautions prises pour avoir une concentration surfacique initiale la plus constante possible. Cela s'explique par le fait que dans un même essai, les chambres sont inoculées avec la même solution bactérienne, c'est à dire, avec la même pré-culture diluée avec le milieu LB modifié jusqu'à une DO d'à peu près 0.1. Comme pour chaque essai une nouvelle pré-culture est élaborée, les solutions bactériennes d'injection n'ont pas forcément exactement la même concentration d'un essai à l'autre.





## Chapitre 6

# Développement du Biofilm

Ce chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus sur le développement de biofilms sous différentes conditions hydrodynamiques, ainsi qu'à une analyse des phénomènes de croissance et de structuration mis en évidence.

Dans un premier temps, le protocole expérimental utilisé pour le déroulement des expériences ainsi que les conditions hydrodynamiques explorées au cours du suivi de la croissance des biofilms, sont présentés.

Dans un second temps, une analyse est développée afin de déterminer l'aire élémentaire représentative des images pour laquelle le biofilm est représenté dans son ensemble.

Dans un troisième temps la structure du biofilm en développement est analysée en s'intéressant aux courbes moyennées des profils de fractions volumiques sur toutes les positions d'observation. Puis une analyse de la distribution spatiale du biofilm est effectuée afin d'apporter un premier regard à une échelle supérieure de quelques millimètres représentative de la matrice solide du biofilm.

Enfin, la dernière section de ce chapitre a pour but d'identifier une tendance de l'évolution du développement du biofilm avec le temps pour les conditions hydrodynamiques explorées.

### 6.1 Déroulement de l'expérience

Afin d'avoir un débit d'injection stable dans les chambres d'écoulement, deux systèmes ont été utilisés. Pour les expériences sous plus faible cisaillement, nous avons utilisé la chambre d'écoulement en PDMS (Fig. 3.8) alimentée en nutriment à l'aide d'un pousse-seringue (Fig. 3.3). Pour étudier le développement du biofilm sous plus fort cisaillement, le système d'alimentation gravitaire (Fig. 3.4 et 3.5) et la chambre d'écoulement "PMMA modifié" (Fig. 3.7) ont été utilisés.

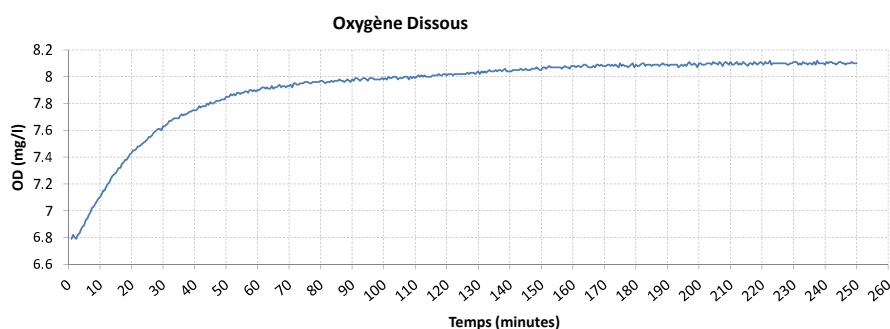
Une chambre témoin pour l'observation de la colonisation initiale est préparée en même temps et de la même manière que les autres chambres pour l'observation du développement du biofilm (conclusion du chapitre 5).

Avant chaque expérience l'ensemble du système d'écoulement est préalablement nettoyé et stérilisé. Les réservoirs du système d'alimentation gravitaire (réservoir d'alimentation et de stockage) sont nettoyés avec un mélange de 50% d'hypochlorite de sodium (5%  $m/m$ ) et 50% d'éthanol à (70 % $m/m$ ). Les seringues utilisées sont stériles et à usage unique. Les tuyaux et

les aiguilles d'injection sont stérilisés sous l'autoclave à une température de  $120^{\circ}\text{C}$  pendant  $20\text{ min}$ . La chambre d'écoulement et la lamelle en verre sont stérilisées par exposition à une lampe à rayons ultraviolets et ensuite mises en contact avec de l'éthanol 70% (pendant environ 5 secondes), puis rincées avec de l'eau stérilisée. L'assemblage et la manipulation du système, ainsi que le rinçage de la lamelle en verre sont réalisés sous un poste de sécurité microbiologique - PSM (hotte à flux laminaire verticale). Le milieu de culture LB modifié (voir section 3.1.2.1) est le milieu de culture choisi comme la source de nutriment. Ce milieu est stérilisé dans un autoclave ( $120^{\circ}\text{C}$  pendant  $20\text{ min}$ ).

Sachant que la bactérie *P. putida* est une bactérie aérobie, le milieu de culture a besoin d'être oxygéné avant d'être injecté dans la chambre d'écoulement. Ceci est assuré par une agitation en continu (agitateur magnétique) du milieu qui est en contact avec l'air filtré.

Pour les expériences avec une alimentation par pousse-seringue, l'oxygénation doit être réalisée avant le remplissage des seringues. Le milieu doit être agité pendant au moins  $3\text{ h}$  à  $180\text{ rpm}$  pour garantir une saturation en oxygène du milieu de culture (LB modifié). La mesure de la concentration en oxygène dans le milieu a été réalisée avec un oxymètre (MultiLine 3430, WTW). La figure 6.1 montre la courbe d'oxygénation du milieu LB modifié à la température de  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Au bout de  $3\text{ h}$  l'oxygène dissous (DO) atteint une valeur de  $8.1\text{ mg/l}$ . Cette valeur est en accord avec la valeur de théorique de l'oxygène dissous dans une solution à salinité de 5 pour mille à une température de  $24^{\circ}\text{C}$ , comme le milieu LB modifié.



**Figure 6.1** – Courbe de l'oxygénation du milieu LB modifié

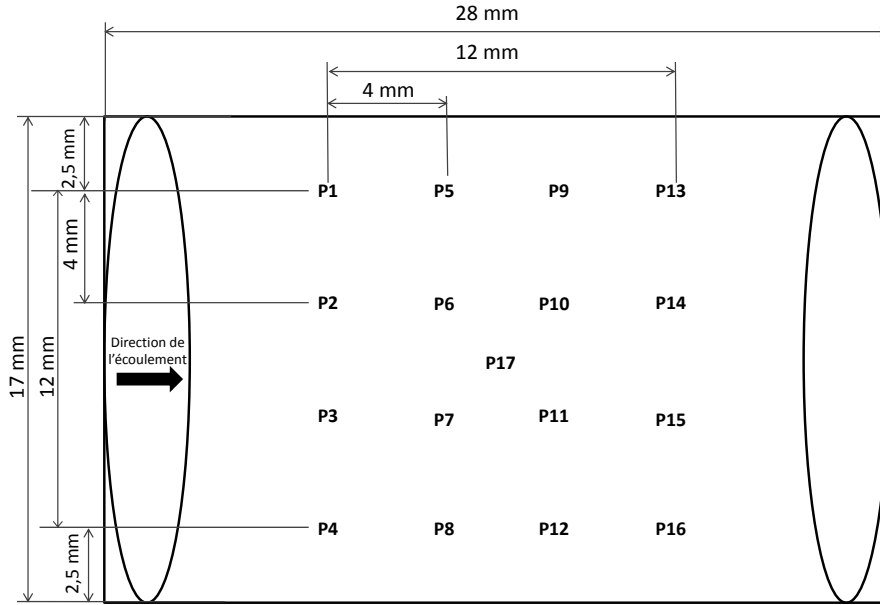
Pour les expériences sous plus fort cisaillement, l'oxygénation est réalisée dans le réservoir d'alimentation en contact avec l'air filtré (Fig.3.5). L'agitation est maintenue en continu tout le long de l'expérience.

La colonisation initiale de la plaque inférieure est réalisée en suivant le protocole présenté en section 5.1 du chapitre 5 : (1°) préparation de la pré-culture, (2°) dilution de la pré-culture jusqu'à ce que la valeur de  $DO_{600}$  diminue à 0.1, (3°) injection de  $1\text{ ml}$  de la pré-culture diluée dans la chambre d'écoulement, (4°) repos statique du système d'écoulement pendant  $10\text{ min}$  pour effectuer l'adhésion initiale sur le support (lamelle en verre) et (5°) évacuation des bactéries en suspension par une injection de  $10\text{ ml}$  de milieu LB modifié.

Ensuite les chambres d'écoulement sont reliées au système d'alimentation et le flux est amorcé. Le biofilm est développé dans des conditions ambiantes à température contrôlée ( $21.5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ). La chambre témoin est placée sous le microscope confocal pour l'observation de la surface

colonisée au temps  $t = 0$ .

Comme décrit dans le chapitre 4, les images de la colonisation initiale ont été prises en lumière transmise sur fond clair en utilisant un objectif  $40\times$  à immersion dans l'huile. La taille de l'image est de  $290.63 \mu\text{m} \times 290.63 \mu\text{m}$  avec une résolution de  $0.28 \mu\text{m}/\text{pixel}$ . Pour chaque chambre témoin 17 positions sont analysées, conformément à la figure 6.2. La zone balayée correspond à une surface de  $12 \text{ mm} \times 12 \text{ mm}$ .



**Figure 6.2** – Positions des prises des images

Pour le développement du biofilm, deux conditions hydrodynamiques ont été imposées, selon le tableau 6.1. Ce tableau présente la vitesse moyenne  $u_{mean}$ , le débit  $Q$ , la contrainte de cisaillement  $\tau_w$  et le nombre de Reynolds  $Re$ .

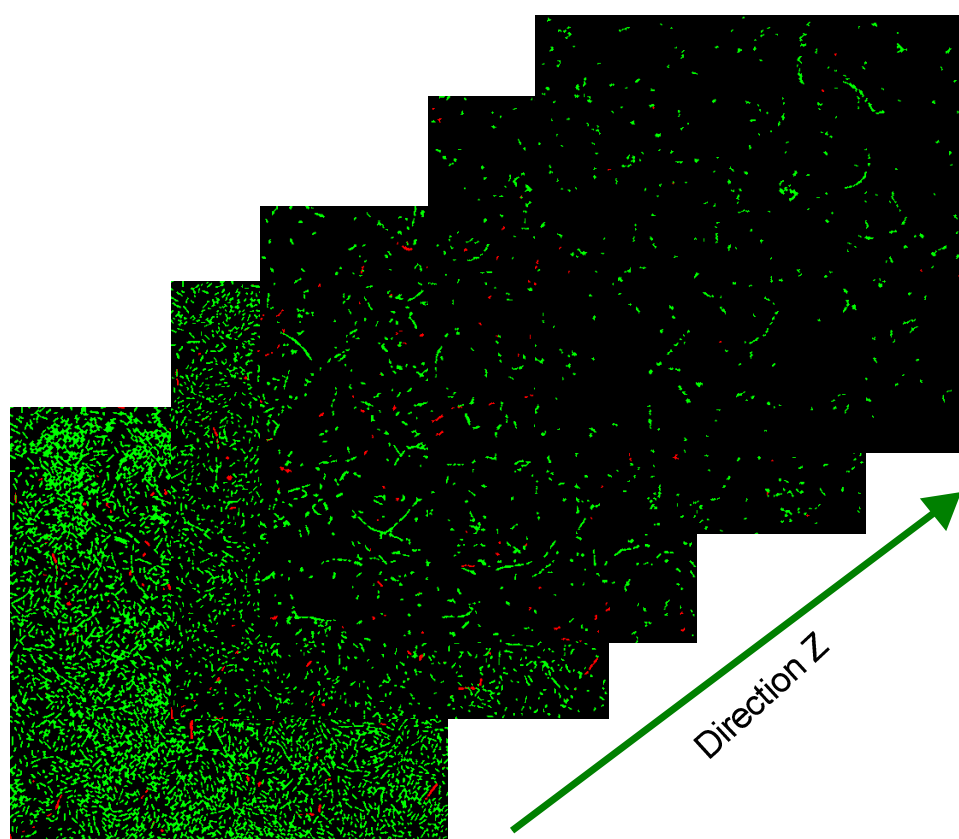
| Expérience | $u_{mean}$           | $Q$           | $\tau_w$             | $Re$ | Système d'alimentation | Chambre d'écoulement |
|------------|----------------------|---------------|----------------------|------|------------------------|----------------------|
|            | $[m/s]$              | $[\mu l/min]$ | $[Pa]$               |      |                        |                      |
| min        | $10 \times 10^{-5}$  | 22            | $2.1 \times 10^{-3}$ | 0.04 | Pousse-seringue        | en PDMS              |
| max        | $3.9 \times 10^{-3}$ | 1000          | $9.4 \times 10^{-2}$ | 2    | Système gravitaire     | en PMMA modifié      |

**Table 6.1** – Les conditions hydrodynamiques employées pour le développement du biofilm

Pour l'observation des bactéries vivantes et mortes dans le biofilm, les fluorochromes Syto9 et l'iodure de propidium (PI) ont été utilisés (voir section 3.3.5 en détail). Pour réaliser l'injection des marqueurs, la chambre est préalablement séparée du système d'alimentation. A l'aide d'un pousse-seringue, un volume de  $1 \text{ ml}$  de fluorochromes dilués ( $4.0 \text{ ml}$ , soit  $2.0 \text{ ml}$  de Syto9 +  $2.0 \text{ ml}$  de PI par litre d'eau stérilisé) est injecté dans la chambre à la même vitesse que celle employée pour d'alimentation du milieu LB modifié. Pour l'observation des bactéries du biofilm sous microscope confocal, les fentes spectrales de détections sont préalablement réglées pour chaque marqueur (tab. 3.6 dans la section 3.3.5).

Comme cité auparavant, l'évolution temporelle de la croissance du biofilm n'est pas visualisée en continu car la bactérie *P.putida* ne fluoresce pas naturellement et les marqueurs fluorescents endommagent les cellules bactériennes ainsi que la structure du biofilm. De ce fait, chaque expérience correspond à un biofilm développé pendant un temps donné : 24 h, 48 h et 72 h.

Les images du biofilm prises avec l'objectif à immersion de 40 $\times$  ont une définition de 512 *pixels*  $\times$  512 *pixels*. La surface de la zone balayée était la même que celle de la colonisation initiale : 12 mm  $\times$  12 mm (Fig. 6.2). A chaque position analysée, les images 2D sont prises (sur la hauteur tous les 1.4  $\mu$ m) pour acquérir les informations de l'ensemble du biofilm (Fig. 6.3). Cet espacement correspond à l'échelle d'une cellule bactérienne. Le temps requis pour réaliser une série d'image 2D à chaque position varie entre 0.3 et 4 min, selon l'épaisseur du biofilm. La compensation de lumière a été mise en œuvre pour obtenir des images exploitables pour les biofilms épais.



**Figure 6.3** – Les images des couches du biofilm après traitement d'images : Expérience 72h A ( $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa) à la position P11. En vert : cellules vivantes, en rouge : cellules mortes.

Le tableau 6.2 présente un résumé sur la prise des images du biofilm, avec le nombre de positions analysées et la taille de chaque image (2D). Le tableau dans l'annexe C présente les positions des images prises pendant chaque expérience. Comme nous pouvons le voir dans le tableau 6.2, pour le plus fort cisaillement, deux expériences ont été réalisées pour chaque temps de formation donné, soit 24 h, 48 h et 72 h. Par la suite nous dénommerons ces expériences, Expériences "A" et "B".

Les images 2D prises sont présentées dans le tableau 6.2. Dans la plupart des cas, les images du biofilm ont une taille de 145.31 $\mu$ m  $\times$  145.31 $\mu$ m. Cependant, pour certaines expériences

nous avons du réduire la taille des images. Ces cas se produisent lorsque l'on constate un décalage du plan focal. Ce décalage peut être dû au réglage de la platine, très sensible, ou un endommagement de la plaque inférieure, lors de la manipulation ou du transport de la chambre. Cet endommagement compromet alors la planéité de la chambre sur la platine et un décalage des images. Pour corriger ce problème, nous avons alors réalisé des images de tailles plus petites.

| Expérience | Temps de développement du biofilm | Nombre de positions analysées |                  | Taille de chaque image (2D) |
|------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|-----------------------------|
|            | [h]                               | Bactéries Vivantes            | Bactéries Mortes | $[\mu m^2]$                 |
| Min        | 24                                | 8                             | 4                | $145.31 \times 145.31$      |
|            | 48                                | 17                            | 4                | $145.31 \times 145.31$      |
|            | 72                                | 17                            | 9                | $96.88 \times 96.88$        |
| Max        | 24 A                              | 17                            | 4                | $145.31 \times 145.31$      |
|            | 24 B                              | 17                            | -                | $145.31 \times 145.31$      |
|            | 48 A                              | 9                             | -                | $96.88 \times 96.88$        |
|            | 48 B                              | 13                            | 12               | $83.04 \times 83.04$        |
|            | 72 A                              | 14                            | 4                | $145.31 \times 145.31$      |
|            | 72 B                              | 11                            | -                | $145.31 \times 145.31$      |

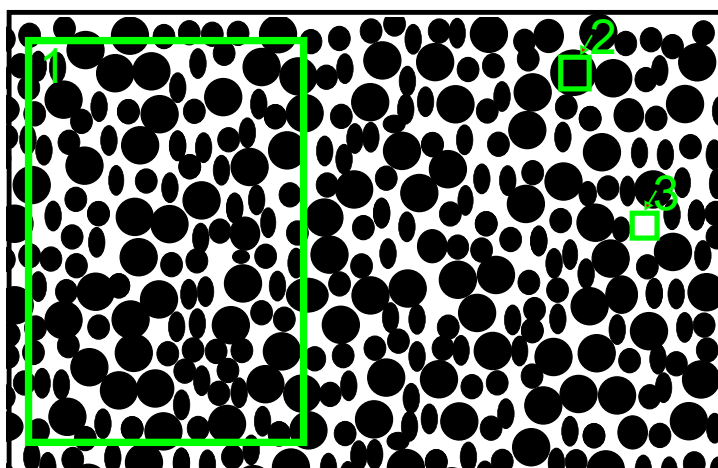
**Table 6.2** – Résumé de la prise d'images pour chaque expérience.

## 6.2 Image Représentative

Un matériau ou milieu poreux est un matériau contenant des espaces vides, les pores. La partie du “squelette” de la matière est souvent appelé matrice. Les pores sont généralement remplis d'un fluide (liquide ou gaz). On peut considérer le biofilm comme un milieu poreux où, dans notre cas, la matrice est le biofilm bactérien et le fluide est le milieu LB modifié.

Un milieu poreux est couramment caractérisé par sa porosité ( $\varepsilon$ ) et le biofilm est généralement un milieu hétérogène avec une porosité variant dans l'espace. La figure 6.4 présente une image illustrative d'un milieu poreux avec différentes fenêtres (ou zone) d'analyse (en vert). Selon Calvet (2003), en observant une zone du milieu poreux suffisamment grande par rapport à la dimension des pores (Fig. 6.4, fenêtre d'analyse 1), on constate que ce volume englobe un certain nombre de pores et la valeur correspondante de la porosité totale peut être considérée comme représentative de la valeur moyenne de la porosité totale du milieu. En revanche, quand la taille de la fenêtre d'analyse diminue, la valeur de la porosité fluctue de plus en plus selon les différentes fractions volumiques du milieu (matrice ou espace vide) qui sont comprises dans ce volume et la position de la fenêtre d'analyse. Cette fluctuation devient maximum (avec des valeurs limites de porosités égales à 0 ou 1) quand la surface est suffisamment petite pour ne se trouver, soit que dans la phase solide, soit que dans un pore (Fig. 6.4, fenêtres 2 et 3). On introduit ici la définition de “MER” : la mesure élémentaire représentative d'un paramètre du milieu. Cette mesure correspond à la valeur de ce paramètre, prise sur une fenêtre d'analyse de taille donnée au-delà de laquelle la valeur moyenne du paramètre considéré ne varie plus.

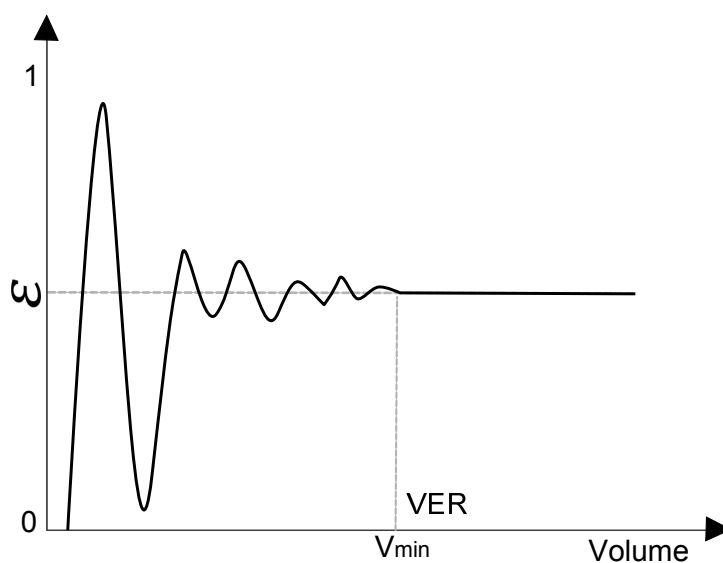
Dans le cas de la figure 6.4, nous analysons la mesure de la porosité et ses variations à l'aide d'une surface élémentaire représentative, notée SER (Calvet, 2003). Cependant, selon le



(a)

**Figure 6.4** – Image illustrative d’un milieu poreux. Les surfaces en vert sont les MER analysées.

contexte, la mesure élémentaire représentative (MER) peut être obtenue non seulement à partir des surfaces (SER), mais aussi des volumes (VER) ou des longueurs (LER). Dans la littérature, on trouve beaucoup de travaux qui s’intéressent principalement au concept de VER. La notion de volume élémentaire représentatif a été au préalable présentée par [Bear \(1972\)](#) où il le définit comme le plus petit volume qu’il peut obtenir pour définir ou mesurer des propriétés moyennes du milieu. La figure 6.5 présente la représentation schématique de la définition d’un volume élémentaire représentatif (VER) utilisé pour la mesure de la porosité ( $\varepsilon$ ) ([Bear, 1972](#)). On observe que jusqu’à la valeur du volume  $V_{min}$  la courbe présente une forme oscillante. Lorsque la valeur  $V_{min}$  est atteinte on trouve une valeur constante de la porosité, quel que soit le volume analysé (espace VER).



(a)

**Figure 6.5** – Représentation de la définition du volume élémentaire représentatif (VER) utilisant la mesure de la porosité ([Bear \(1972\)](#)).

Ainsi, il est clair que la définition du volume élémentaire représentatif est essentielle pour avoir des résultats non biaisés de la structure du biofilm. Il est à noter que pour les milieux isotropes, le VER peut être bien représenté par un SER.

Le VER est donc caractéristique de l'échelle macroscopique, où le phénomène a une représentation continue. Il est la transposition à l'échelle macroscopique de la notion de point matériel utilisée à l'échelle microscopique (Bear (1972)).

On peut d'ailleurs à ce stade définir les différentes échelles pour décrire les milieux poreux :

- L'échelle microscopique : L'échelle du biofilm, qui caractérise les atomes ou les molécules, où les structures apparaissent comme des discontinuités entre les phases solide et fluides. Ces structures sont discontinues à l'échelle des bactéries elle mêmes.
- l'échelle locale ou mésoscopique : L'échelle intermédiaire du biofilm, entre l'échelle microscopique et l'échelle macroscopique. Les structures apparaissent également comme des discontinuités entre les deux phases, mais la discontinuité provient de la structure formée et non plus des objets microscopiques étudiés.
- L'échelle macroscopique : Cette échelle est spécifique des milieux poreux, c'est à son niveau que le mélange polyphasique peut être considéré comme milieu continu. Cette échelle est caractérisée par la dimension des MER. Ainsi, en utilisant le concept de MER, on peut considérer le biofilm comme un milieu continu biphasique, c'est-à-dire comme la superposition de deux milieux continus classiques, le squelette et le fluide.
- L'échelle mégascopique : Cette échelle prend en compte les variations spatiales des propriétés macroscopiques du milieu.

### 6.2.1 Détermination de l'image représentative

Cette étude vise à déterminer l'aire élémentaire représentative des images pour laquelle le biofilm est représenté dans son ensemble. Pour la détermination du SER, nous avons utilisé la fraction volumique ( $\phi$ ) de la biomasse comme variable. La fraction volumique de la biomasse est un paramètre complémentaire de la porosité, telle que :

$$\varepsilon + \phi = 1 \tag{6.1}$$

La fraction volumique de la biomasse est le volume occupé par le biofilm par rapport au volume de contrôle. Un volume de contrôle, en mécanique des fluides, est un volume arbitraire dans l'espace à travers lequel circule le fluide. Le contour géométrique du volume de contrôle est appelé une surface de contrôle. Dans notre étude, pour le calcul de la fraction volumique, nous avons utilisé le volume des bactéries vivantes par rapport au volume de contrôle (Eq. 6.2).

$$\phi_i = \frac{V_{bv}}{V_{cv}} \tag{6.2}$$

où  $V_{bv}$  est le volume des bactéries vivantes et  $V_{cv}$  est le volume de contrôle.



L'équation 6.3 présente la fraction volumique pour une position  $i$  et une hauteur  $z$  dans la chambre d'écoulement :

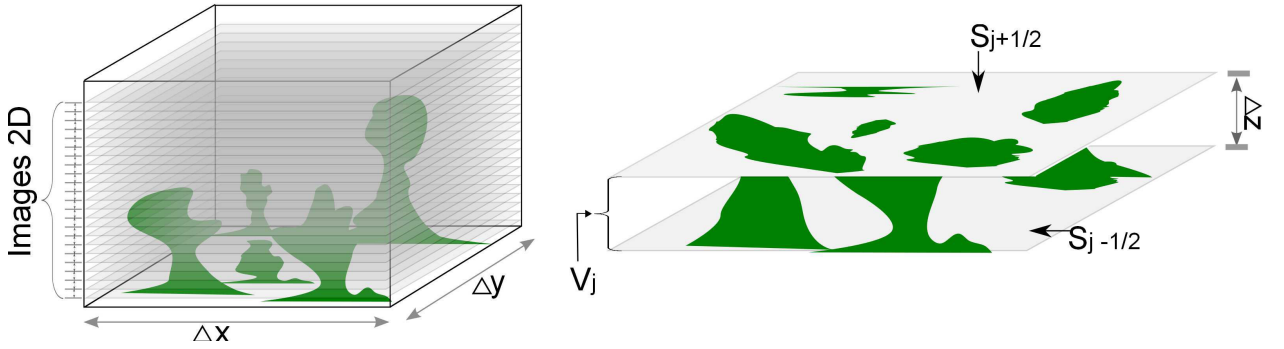
$$\phi_i(z) = \frac{\int_z^{z+\Delta z} s(z) dz}{V} = \frac{(s_z + s_{z+\Delta z}) \cdot \frac{\Delta z}{2}}{\Delta x \Delta y \Delta z} = \frac{s_z + s_{z+\Delta z}}{2 \Delta x \Delta y} \quad (6.3)$$

où l'indice "i" se réfère à la position de la prise d'image dans la chambre (P1 à P17). Ainsi  $\phi_i$  est la valeur fraction volumique pour chaque position analysée dans la chambre d'écoulement ( $i = 1, 2, 3 \dots 17$ ),  $s$  est la surface occupée par le biofilm dans une couche donnée,  $V$  est le volume de contrôle.  $\Delta x$  et  $\Delta y$  correspond à la taille de l'image prise selon la direction  $x$  et  $y$  respectivement.

Ainsi, pour chaque position de mesure ( $i$ ), la fraction volumique d'une couche du biofilm (entre deux plans horizontaux) correspond à :

$$\phi_{i,j} = \frac{s_{j-1/2} + s_{j+1/2}}{2 \Delta x \Delta y} \quad (6.4)$$

où l'indice "j" correspond à la hauteur  $j = (j - 1/2) \Delta z$ .



**Figure 6.6** – Illustration des prises des images (2D) dans la hauteur du biofilm

$\phi_{i,j}$  est la valeur de la fraction volumique pour chaque couche  $j$  et pour chaque position analysée  $i$  dans la chambre d'écoulement.

Ensuite la valeur moyenne de la fraction volumique ( $\bar{\phi}_i$ ) a été calculée sur toute la hauteur du biofilm. On obtient ainsi la fraction volumique moyenne du biofilm pour chaque position analysée :

$$\bar{\phi}_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \phi_{i,j} \quad (6.5)$$

Afin d'identifier une surface représentative pour l'analyse des images, on calcule ensuite la moyenne statistiques des fractions volumiques moyennées sur l'épaisseur du biofilm ( $\langle \phi \rangle$ ), en

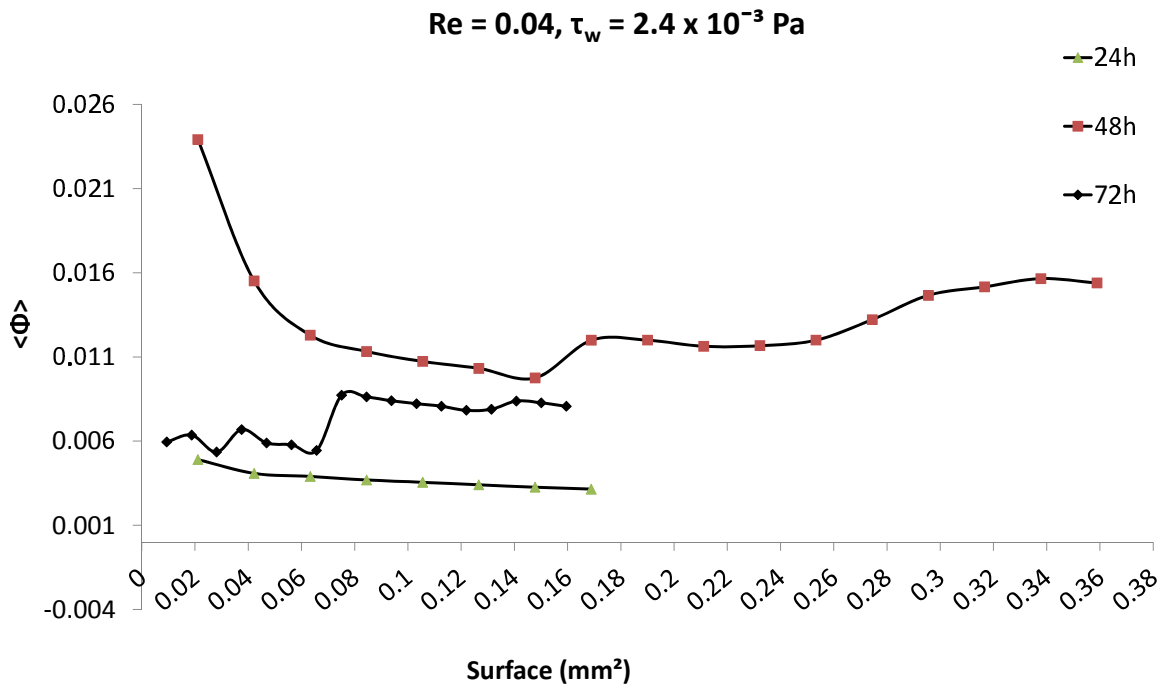
considérant les différentes positions pour lesquelles nous avons pris des images :

$$\langle \phi \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \bar{\phi}_i \quad (6.6)$$

Cette moyenne statistique est effectuée sur un nombre croissant de volumes de contrôle jusqu'à ce que cette valeur converge vers une fraction volumique représentative, invariante avec l'augmentation du nombre de volumes de contrôle utilisés. A ce nombre de volumes de contrôle est associé une surface représentative.

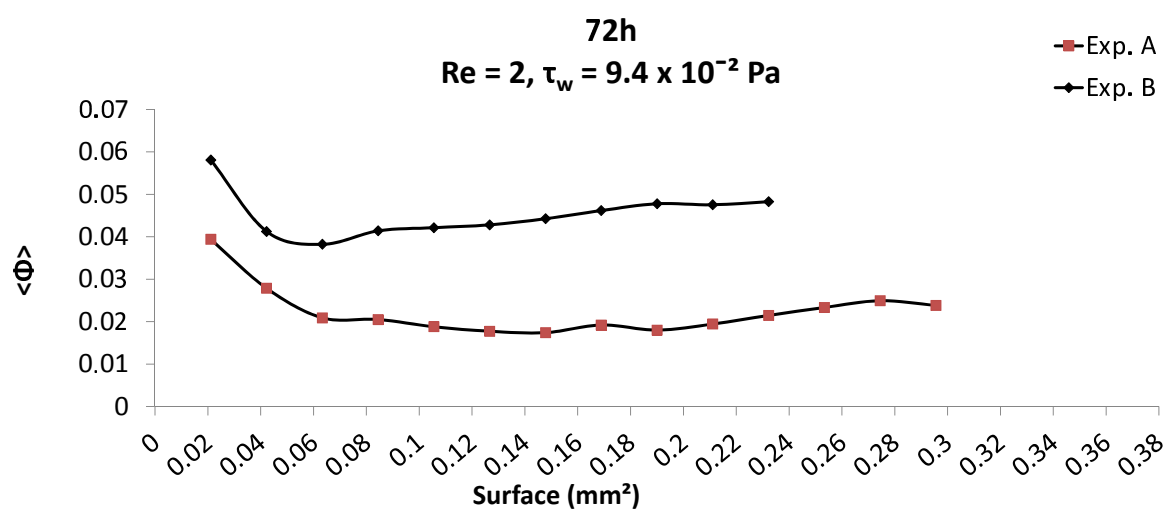
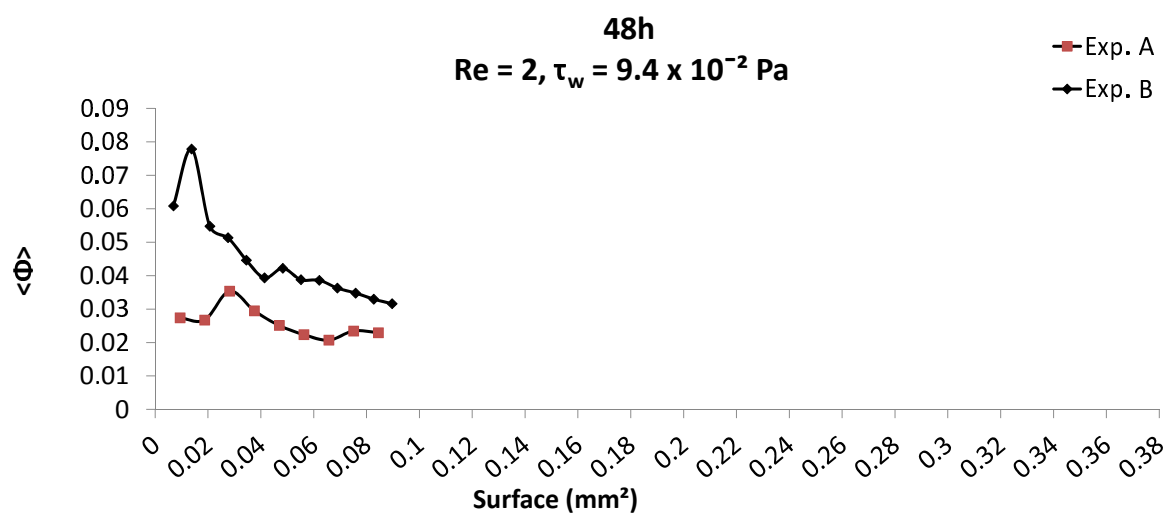
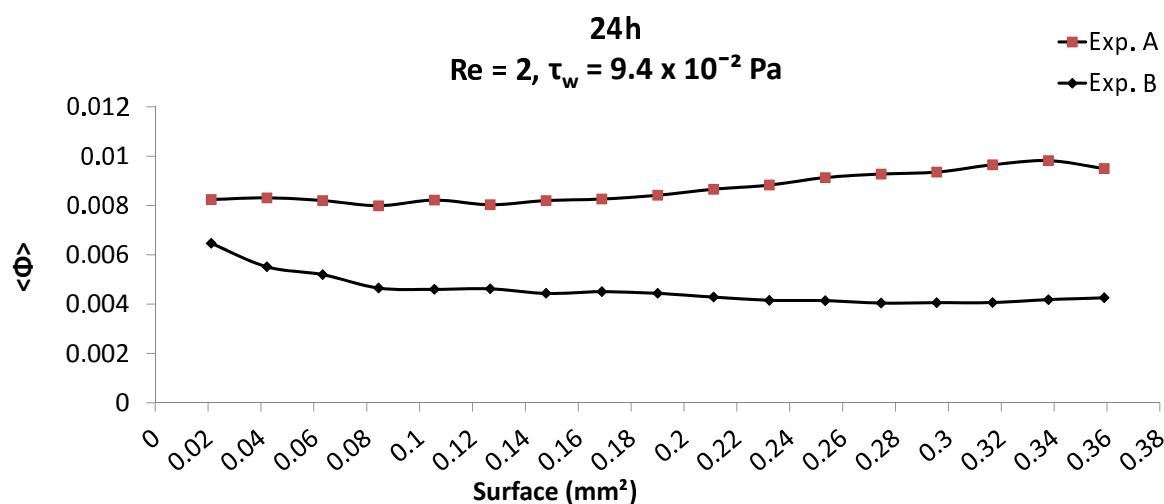
Comme évoqué dans la section 5.3 (chapitre 5), le coefficient de variation sert à évaluer la valeur représentative de la moyenne. Une valeur du coefficient de variation inférieure à 15% traduit une bonne homogénéité et la moyenne représente le comportement de l'ensemble du système analysé (Veyseyre, 2006). Ainsi, dans notre travail, pour évaluer la valeur du SER, nous avons considéré que le SER a été atteint lorsque les coefficients de variation des fractions volumiques moyennes calculés à partir de points consécutifs sur la courbe sont inférieurs à 15%. L'annexe D présent la fraction volumique moyenne sur trois points consécutifs ( $\bar{\phi}_3$ ), les surfaces associées à ces points et le coefficient de variation des fraction volumique moyenne ( $CV_3$ ).

Les figures 6.7 et 6.8 présentent les courbes des moyennes statistiques de la fraction volumique sur l'épaisseur du biofilm ( $\langle \phi \rangle$ ) en fonction de la taille des surfaces d'analyse, pour les expériences à plus faible et plus fort cisaillement :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa et  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa, respectivement.



(a)

**Figure 6.7** – Vérification de la fraction volumique moyenne en fonction de la taille de surface analysée pour les expériences sous plus faible cisaillement :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa



**Figure 6.8** – Vérification de la fraction volumique moyenne en fonction de la taille de surface analysée pour les expériences sous plus fort cisaillement :  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa

Pour le plus faible taux de cisaillement (Fig. 6.7), la courbe correspondant au temps de croissance 24 h présente un comportement plus monotone que celles des biofilms cultivés sur 48 h et 72 h. Après 24 h de croissance, la fraction volumique moyenne présente une valeur de  $CV_3$  inférieure à 15% quelle que soit la surface de contrôle utilisée pour le calcul. Pour les courbes à 48 h et 72 h de croissance,  $CV_3$  atteint une valeur inférieure à 15% pour une surface égale à  $0.084 \text{ mm}^2$ .

En ce qui concerne les cas à fort cisaillement (Fig. 6.8), la plupart ont un comportement monotone à partir d'une certaine taille de surface. Sur les deux expériences correspondant à un temps de croissance de 24 h (6.8.a, Expériences A et B), on observe une très faible oscillation de la fraction volumique avec l'augmentation de la surface analysée. Ces expériences présentent une valeur de  $CV_3$  inférieure à 15% quelles que soient la taille des surfaces analysées. Pour les expériences à 48 h de croissance (A et B), nous obtenons une valeur de  $CV_3$  inférieure à 15% pour une surface supérieure à  $0.047$  et  $0.028 \text{ mm}^2$ , respectivement. De même, pour les expériences à 72 h de croissance (A et B), il faut une surface supérieure à  $0.084$  et  $0.063 \text{ mm}^2$ , respectivement, pour que la valeur de  $CV_3$  soit inférieure à 15%.

On observe que le critère de convergence que nous avons adopté (premier point sur la courbe pour lequel  $CV_3$  est inférieur à 15%) est atteint, selon les expériences, pour une valeur de surface différente. Néanmoins, pour le pire des cas (valeur maximale), cette surface est égale à  $0.084 \text{ mm}^2$ , et correspond à quatre images de taille  $145.31 \mu\text{m} \times 145.31 \mu\text{m}$ . On peut donc considérer qu'avec un nombre minimum de 4 images prises à 4 positions différentes ont atteint une bonne représentativité, du moins pour le paramètre fraction volumique. Ainsi, ces résultats préliminaires montrent que le nombre d'images prises dans ces expériences sont représentatives de la structure du biofilm, et de ce fait, la valeur de la fraction volumique moyenne peut être considérée comme représentative du biofilm.

### 6.3 Hauteur du biofilm considérée dans les chambres en PDMS

Au cours des expériences de développement des biofilms nous avons constaté une adhérence importante des bactéries/biofilm sur la lamelle en verre mais également sur la surface en PDMS, c'est-à-dire, sur le côté opposé à la lamelle en verre (voir figure 6.10.a). Cette adhésion est légèrement plus élevée pour les surface en PDMS que pour la lamelle en verre, et considérablement plus importante que pour la surface en PMMA. La figure 6.10.b montre un biofilm développé sur lamelle en verre mais également sur la surface en PDMS. Le biofilm a été développé pendant 72 h à  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3} \text{ Pa}$ .

L'annexe E présente de façon générale les principaux points du mécanisme d'adhésion bactérienne.

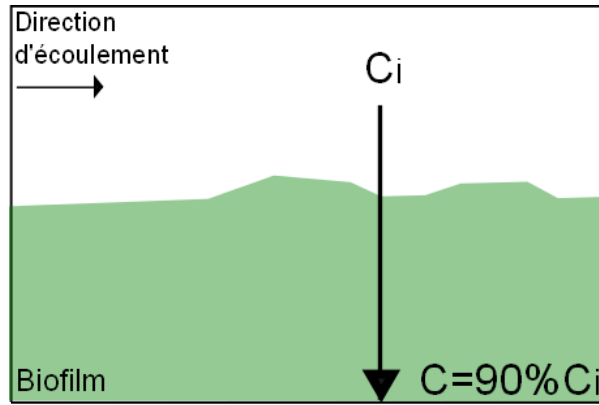
Ainsi, nous voulons vérifier ici si les bactéries adhérentes sur le PDMS occasionnent une influence majeure sur le biofilm développé sur la lamelle en verre.

Picioreanu *et al.* (2000b) montrent que le temps caractéristique  $\tau_{conv}$  du transport convectif des nutriments vers le biofilm est considérablement plus faible que le temps caractéristique de la diffusion  $\tau_{diff}$  du nutriment dans le biofilm. Nous avons réalisé un calcul simplifié pour avoir une idée des temps caractéristiques associés au transfert des nutriments du milieu de culture

au niveau du biofilm. Considérant une bactérie de taille moyenne de  $2 \mu m$ , pour la contrainte de cisaillement la moins élevée, cette bactérie perçoit un renouvellement du milieu 50 fois par seconde, soit un temps caractéristique convectif  $\tau_{conv}$  égal à  $2.0 \times 10^{-2} s$ . Pour la contrainte de cisaillement la plus élevée la bactérie voit le milieu nutritif renouvelé 1950 fois par seconde, soit une valeur de  $\tau_{conv}$  égale à  $5.0 \times 10^{-4} s$ . Le temps caractéristique moyen  $\tau_{diff}$  pour la diffusion des nutriments dans le biofilm a été estimé à partir de valeurs expérimentales existantes de la littérature. L'équation 6.7 présente le temps requis pour un soluté pour pénétrer jusqu'à la base du biofilm avec 90% de sa concentration présente dans le fluide circulant dans la chambre d'écoulement (voir figure 6.9) (Stewart, 2003) :

$$\tau_{diff} = 1.03 \frac{L^2}{De} \quad (6.7)$$

Où  $L$  est l'épaisseur du biofilm, et  $De$  est le coefficient de diffusion effectif dans le biofilm.



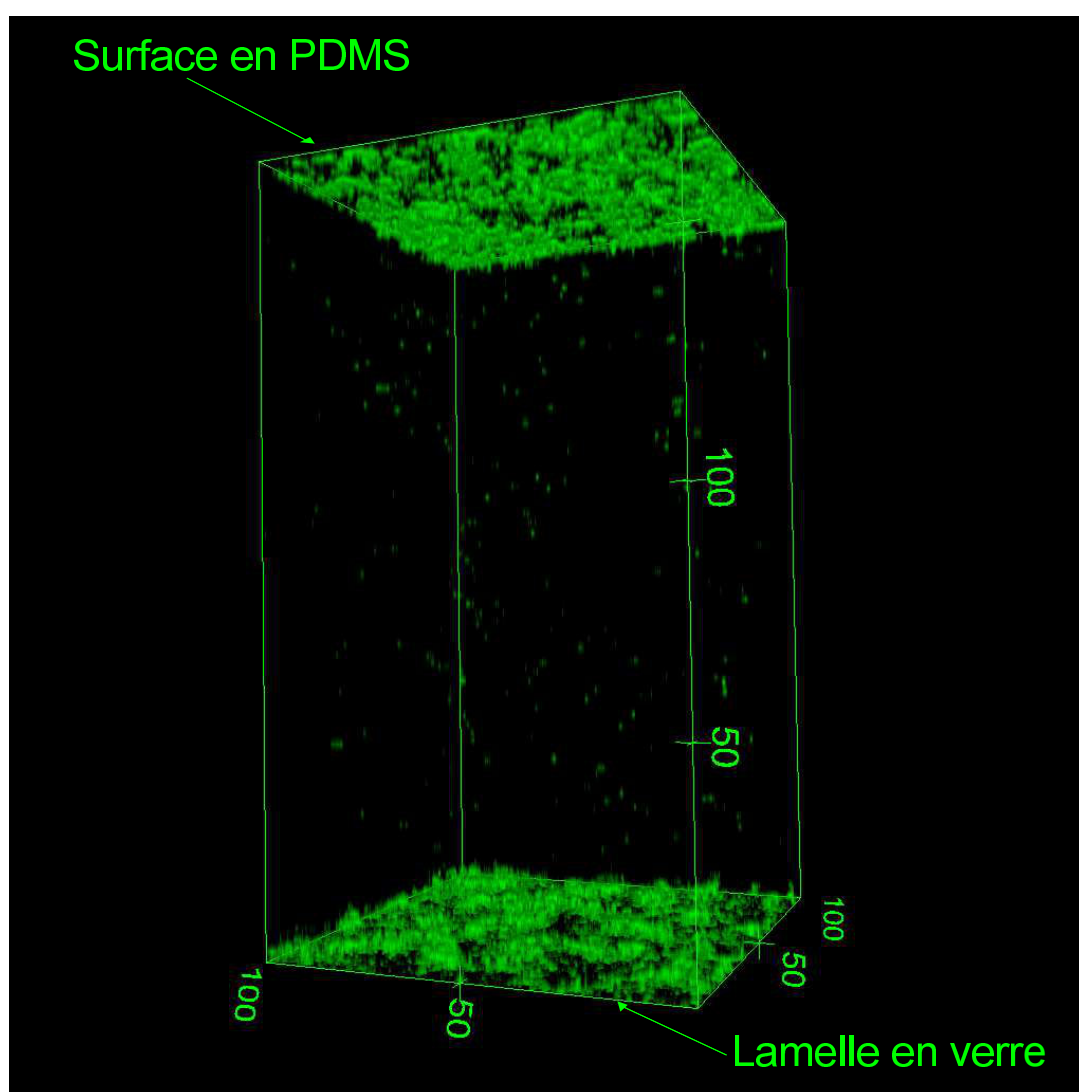
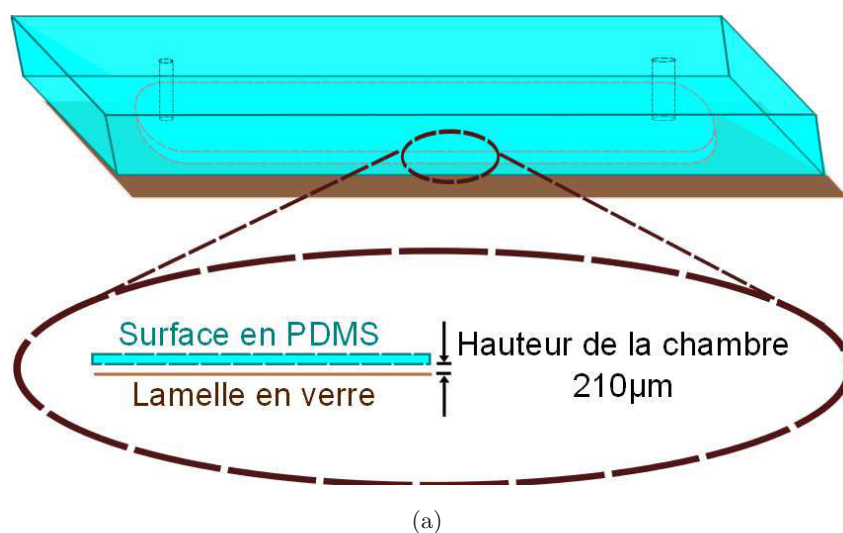
**Figure 6.9** – Diffusion du soluté jusqu'à la base du biofilm avec 90% de sa concentration présente dans le fluide circulant dans la chambre d'écoulement.

Les biofilms sont composés principalement d'eau, ainsi, le coefficient de diffusion  $De$  dans un biofilm est déterminé à partir de la valeur du coefficient de diffusion dans l'eau pure ( $D_{aq}$ ) :  $De/D_{aq} = 0.6$  pour les composants gazeux et  $De/D_{aq} = 0.25$  pour la plupart des composants organiques (Stewart, 2003).

Afin d'avoir une estimation de la diffusion dans le biofilm, nous allons considérer ici la diffusion de l'oxygène et du glucose (un des composants de l'extrait de levure, principal composant du milieu LB modifié) dans le biofilm.

En prenant comme longueur caractéristique l'épaisseur de la partie dense du biofilm (soit environ  $10 \mu m$ . Voir les résultats présentés plus tard dans ce chapitre), et considérant le coefficient de diffusion  $D_{aq}$  de l'oxygène égal à  $20 \times 10^{-6} cm^2/s$  et celui du glucose égal à  $6.7 \times 10^{-6} cm^2/s$  (Stewart, 2003), nous obtenons un  $\tau_{diff}$  de  $8.6 \times 10^{-2} s$  et de  $6.1 \times 10^{-2} s$  pour ces deux composants, respectivement. On observe donc que la valeur du temps diffusion est supérieure au temps de convection, quelles que soient les configurations (un facteur 4 pour les expériences à  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3} Pa$  et un facteur supérieur à 100 pour les expériences à  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2} Pa$ ). Ainsi, dans notre cas, on peut considérer que le facteur limitant dans le transport des nutriment est le transfert par diffusion dans le biofilm.

Dans notre travail, les expériences présentent ainsi un renouvellement rapide du milieu à l'échelle locale par rapport à l'échelle caractéristique de sa diffusion (puis sa consommation) dans le biofilm. Ainsi, on peut considérer que même avec une présence non négligeable de bactéries adhérees sur la surface du PDMS, le milieu nutritif reste saturé en nutriment. Ainsi, si du biofilm se développe sur la partie supérieure de la chambre, ce développement ne perturbe pas les conditions de croissance du biofilm sur la partie inférieure, en verre, car il y a suffisamment de nutriment. De ce fait, dans la suite du travail, nous avons continué à étudier le biofilm développé sur la lamelle de verre, en ne considérant qu'une partie de la hauteur de la chambre en PDMS. Cette hauteur a été fixée à  $112 \mu m$ , soit un peu plus que la moitié de la hauteur de la chambre ( $210 \mu m$ ).



**Figure 6.10** – Observation de l’adhésion du biofilm sur la surface inférieure (lamelle en verre) et également sur la surface supérieure en PDMS : (a) Image illustrative de la disposition de la lamelle en verre et de la surface en PDMS (opposée) et (b) Image du biofilm développé dans la chambre d’écoulement en PDMS :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa, 72 h.



## 6.4 Profils moyennés des fractions volumique en z

Après le traitement des images (voir section précédente), les données ont été traduites en terme de fraction volumique à une hauteur  $z$ . On définit :

- $\phi_{i,j}$  la valeur de la fraction volumique mesurée dans la couche  $j$  à la position  $i$  dans la chambre d'écoulement ;
- La moyenne statistique est calculée en utilisant toutes les positions disponibles dans la chambre d'écoulement pour lesquelles nous avons pris des images :

$$\langle \phi_j \rangle = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \phi_{i,j} \quad (6.8)$$

où  $\langle \phi_j \rangle$  représente ainsi la moyenne statistique des fractions volumiques sur toutes les positions ( $1 \leq i \leq N$ ) dans la couche  $j$  ( $j = 1$  correspond à la position de la plaque inférieure (lamelle en verre)).

L'écart-type ( $\sigma_j$ ) peut ensuite être calculé à partir de la racine carrée de la variance, selon l'équation suivante :

$$\sigma_j = \sqrt{Var} = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (\phi_{i,j} - \langle \phi_j \rangle)^2} \quad (6.9)$$

où  $Var$  est la variance et  $N$  est le nombre de positions analysées (selon le tableau 6.2).

Cette variance est représentative de la variabilité spatiale des profils en fonction de la coordonné (x,y) du point de mesure dans la chambre d'écoulement. Cette variabilité spatiale sera étudiée dans un paragraphe ultérieur. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons uniquement aux profils moyennés sur toutes les positions de mesures dans la chambre.

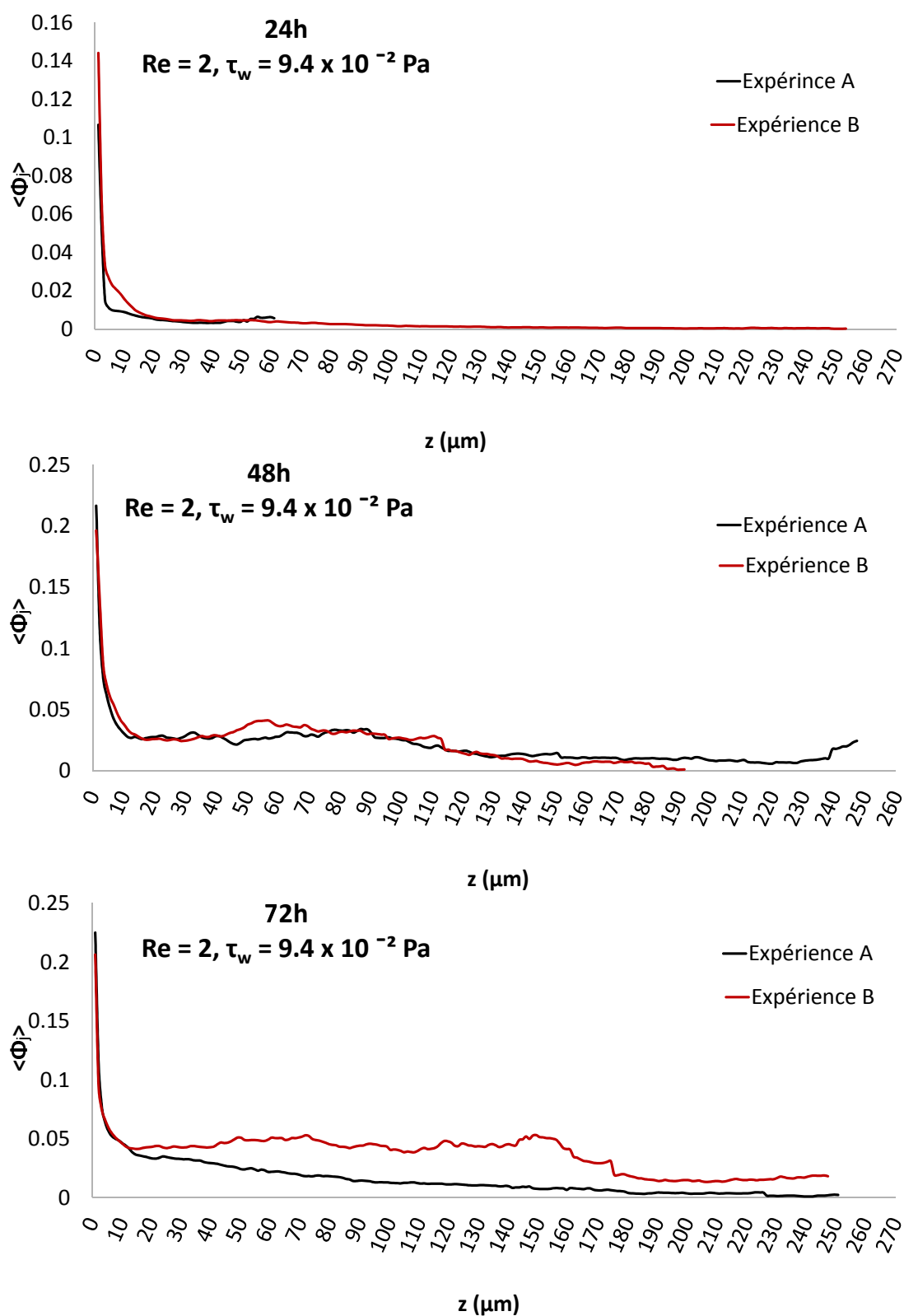
### 6.4.1 Expériences à plus fort cisaillement : $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$ Pa

#### 6.4.1.1 Représentativité des profils et Sensibilité aux conditions initiales

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'analyse de l'évolution temporelle de la croissance du biofilm ne peut pas être réalisée à partir d'expériences menées en continu et nécessitent plusieurs expériences sur des chambres préparées spécifiquement à chaque fois. Dans le cas des biofilms formés à plus fort cisaillement, les expériences ont été en outre répétées deux fois pour chaque durée de croissance (voir tableau 6.2). Pour chaque temps d'observation, les deux jeux de données disponibles correspondant seront à chaque fois identifiés par les lettres A et B.

Pour étudier la variabilité des résultats, pour chaque durée de développement du biofilm, nous avons tracé la moyenne statistique de la fraction volumique des bactéries vivantes dans une couche de biofilm  $\langle \phi_j \rangle$  en fonction de la hauteur dans le biofilm. Comme nous le verrons dans la prochaine section (6.4.1.2), les profils des fractions volumiques des bactéries vivantes sont en effet plus représentatives de l'ensemble du biofilm.

Les courbes de la figure 6.11 présentent les profils  $\langle \phi_j \rangle$  pour les bactéries vivantes à 24 h, 48 h et 72 h, respectivement.



**Figure 6.11** – Profil de la fraction volumique des bactéries vivantes pour les temps de développement de 24 h, 48 h et 72 h :  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2} \text{ Pa}$ .

En considérant la figure 6.11, pour les courbes à 24 h de croissance, le plus grand écart observé entre les valeurs moyennes des expériences A et B est de 58% pour la hauteur  $z = 4.56\mu\text{m}$ . Pour les courbes à 48 h de croissance, le plus grand écart observé est de 37% à la hauteur  $z = 53.58\mu\text{m}$ . On constate que le plus grand écart entre les courbes se produit au temps  $t = 72\text{ h}$ , avec un écart de 86% à la hauteur  $z = 53.58\mu\text{m}$ .

Malgré le soin particulier apporté afin d'avoir un mode de préparation le plus rigoureux et plus reproductible possible entre les expériences, le chapitre 5 a déjà montré que d'une expérience à une autre les conditions initiales, en termes de nombres de bactéries adhérees, ne sont pas identiques. Dans le tableau 6.3 on peut constater cette variation de la colonisation initiale pour les expériences à plus fort cisaillement (à travers la fraction surfacique des bactéries initialement adhérees :  $\phi_{init}$ ).

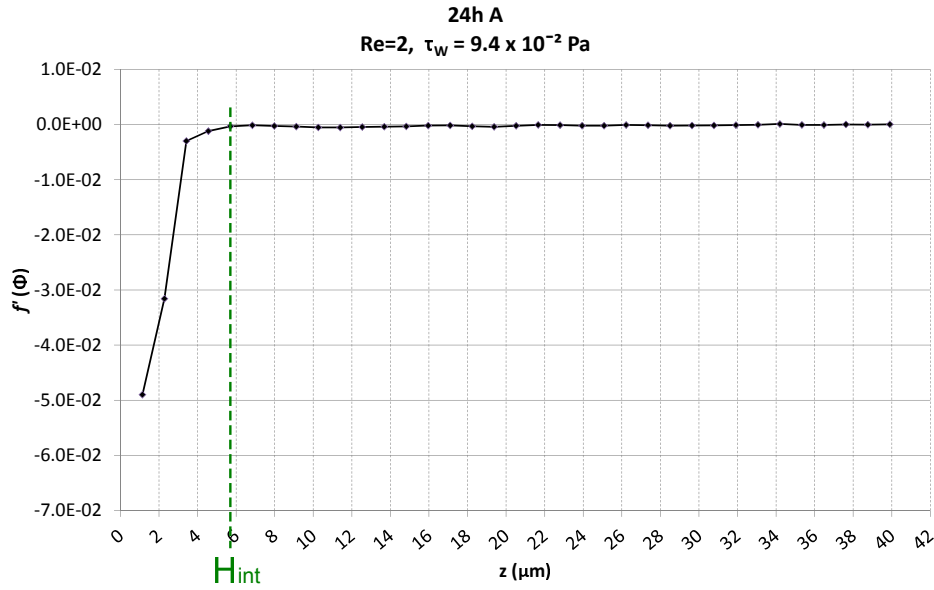
En observant les courbes des figures 6.11, nous constatons que, quelle que soit la courbe, une chute rapide de la fraction volumique se produit après les premières couches du biofilm. Ainsi, pour délimiter une épaisseur sur laquelle le biofilm présente une concentration significative nous avons estimé la hauteur où s'effectue cette chute rapide de concentration. Pour cela, nous avons calculé le point d'inflexion en dérivant numériquement les profils expérimentaux de fraction volumique des bactéries vivantes pour chaque profil de fraction volumique aux différentes positions de mesure (P1 à P17). La zone inférieure ( $h < H_{int}$ ) est associée à la fraction volumique moyenne  $\phi_{int}$  calculée sur l'épaisseur  $H_{int}$  (point d'inflexion).  $\langle\phi_{int}\rangle$  et  $H_{int}$  sont la moyenne entre toutes les positions (i) de la chambre d'écoulement. La figure 6.12 présente un exemple d'une telle courbe dérivée. Afin d'avoir une comparaison entre les différentes conditions hydrodynamiques imposées, une deuxième zone correspondant à une hauteur fixe  $H_{ext}$  est définie, soit la moitié de la chambre d'écoulement ( $H_{ext} = 112\mu\text{m}$ ). Il ne s'agit pas d'avoir une épaisseur exacte du biofilm car elle est difficile à déterminer étant donnée l'allure des courbes sur la figure 6.16, mais de pouvoir comparer les caractéristiques de ces deux zones : interne et externe. A la zone externe est associée la fraction volumique  $\langle\bar{\phi}_{ext}\rangle$ .

Le tableau 6.3 regroupe la valeur de la hauteur du point d'inflexion  $H_{int}$ , la fraction volumique moyenne de la zone interne  $\langle\bar{\phi}_{int}\rangle$ , ainsi que la fraction volumique moyenne de la zone externe  $\langle\bar{\phi}_{ext}\rangle$ .

| Expériences :<br>$9.4 \times 10^{-2}$ Pa | $H_{int}$<br>[ $\mu\text{m}$ ] |              | Bactérie initiale<br>$\langle\bar{\phi}_{init}\rangle$ |               | Zone interne<br>$\langle\bar{\phi}_{int}\rangle$ |              | Zone externe<br>$\langle\bar{\phi}_{ext}\rangle$ |               |
|--|--------------------------------|--------------|--|---------------|--|--------------|--|---------------|
|  | 24hA                           | 5.30         | $\pm 11.37\%$  | 0.0193        | $\pm 30.19\%$                                    | 0.0416       | $\pm 13.10\%$                                    | 0.0050        |
| 24hB                                     | 6.64                           |              | 0.0342   |               | 0.0539   |              | 0.0039   |               |
| 48hA                                     | 11.40                          | $\pm 5.72\%$ | 0.0189   | $\pm 8.08\%$  | 0.0716   | $\pm 6.56\%$ | 0.0275   | $\pm 6.50\%$  |
| 48hB                                     | 10.17                          |              | 0.0222   |               | 0.0816   |              | 0.0313   |               |
| 72hA                                     | 8.71                           | $\pm 5.01\%$ | 0.0241   | $\pm 19.08\%$ | 0.0914   | $\pm 1.61\%$ | 0.0227   | $\pm 37.50\%$ |
| 72hB                                     | 7.88                           |              | 0.0166   |               | 0.0885   |              | 0.0454   |               |

**Table 6.3** – Hauteur du point d'inflexion des courbes, fraction surfacique des bactéries initiales et les fractions volumiques moyennes  $\langle\bar{\phi}_{int}\rangle$  (zone interne) et  $\langle\bar{\phi}_{ext}\rangle$  (zone externe) des bactéries vivantes dans le biofilm formé sous cisaillement à  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa.

Dans nos expériences, pour chaque temps donné, nous observons que l'épaisseur  $H_{int}$  cor-



**Figure 6.12** – Dérivée numérique de la fraction volumique des bactéries vivantes à la position P1 après 24 h sous un écoulement cisailé ( $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa).

respondant à la partie dense du biofilm est assez reproductible entre les jeux de données A et B. L'écart entre la fraction surfacique de bactéries initialement adhérees pour les expériences à 72h (19.08% entre les états initiaux) ne se traduit pas par une forte variabilité de la fraction volumique sur l'épaisseur  $H_{int}$  (1.61% pour l'état final observé). L'écart est plus significatif à  $t = 24h$ . Cependant le fort écart entre les conditions initiales (plus de 30.19% sur le paramètre  $\phi_{init}$ ) ne se traduit que par un écart de 13.10% sur la fraction volumique dans la zone dense.

Les valeurs  $\langle \phi_{ext} \rangle$  montrent par contre une forte variabilité entre les jeux de données A et B à  $t = 72 h$ . Ces valeurs ne montrent pas une corrélation très forte avec la densité surfacique initiale des bactéries adhérees ( $\langle \phi_{int} \rangle$ ).

En conclusion, dans nos expériences, lorsque l'on s'intéresse aux valeurs moyennes statistiques, on peut séparer le biofilm en 2 zones. Une première partie comprend une couche dense d'une épaisseur de quelques microns. La fraction volumique moyenne sur cette épaisseur semble aussi perdre la mémoire des conditions initiales. Cette perte de mémoire de la condition initiale, combiné au protocole d'inoculation de la chambre d'écoulement mis en place, permet d'affirmer que nous sommes dans des conditions expérimentales peu sensibles aux conditions d'ensemencement de la chambre. On peut ainsi comparer les expériences les unes avec les autres, même si elles ne correspondent pas à un même biofilm, dont la croissance a été réalisée en continu

La partie supérieure du biofilm quant à elle, beaucoup moins dense, présente une variabilité beaucoup plus importante d'un jeu de donnée à l'autre pour une durée de croissance fixée à 72 h. Cependant, cette variabilité ne semble pas être corrélée aux conditions initiales mais plutôt à des effets hydrodynamiques sur la partie supérieure du biofilm entraînant par exemple, un possible détachement du biofilm.

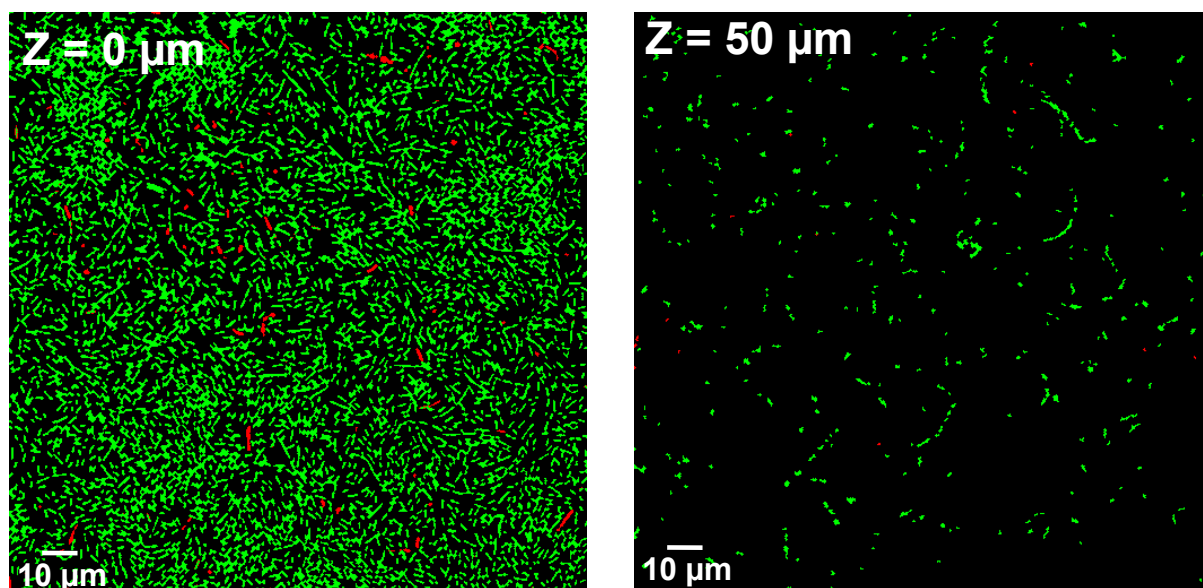
Pour la suite de travail, pour l'évaluation du développement du biofilm dans le temps, nous avons considéré la moyenne de la fraction volumique des deux jeux disponibles (expériences A et B) bien qu'en toute rigueur les moyennes devraient faites sur un nombre plus important de

répliquâts.

#### 6.4.1.2 Comparaison des profil de fraction volumique moyennés pour les bactéries vivantes et mortes

Nous avons ensuite tracé les profils moyennés des fractions volumiques des bactéries vivantes et mortes en fonction de la hauteur (direction  $z$ ) (Fig. 6.14). On essaie déjà d'identifier si, sur les profils moyennés, une structuration du biofilm selon la hauteur peut être mise en évidence, à travers la répartition de la fraction de la biomasse active et inactive.

Les profils moyennés ne montrent pas de stratification flagrante du biofilm en terme d'importance relative entre les bactéries vivantes et mortes, quel que soit le temps analysé. Même si la fraction volumique des bactéries mortes est plus importante dans la couche intérieure (plus dense) près de la paroi, la fraction volumique des bactéries vivantes est de loin toujours très supérieure à la fraction de bactéries mortes (Fig. 6.13). On n'assiste pas - sur la durée d'observation qui est ici relativement courte (72h, biofilm jeune) - à une ségrégation entre des couches actives et inactives, en particulier près du substratum solide. Le faible ratio bactéries mortes/vivantes traduirait ainsi un biofilm plutôt actif.



**Figure 6.13** – Les images des couches du biofilm après traitement d'images : Expérience 72h A ( $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa). En vert : cellules vivantes, en rouge : cellules mortes.

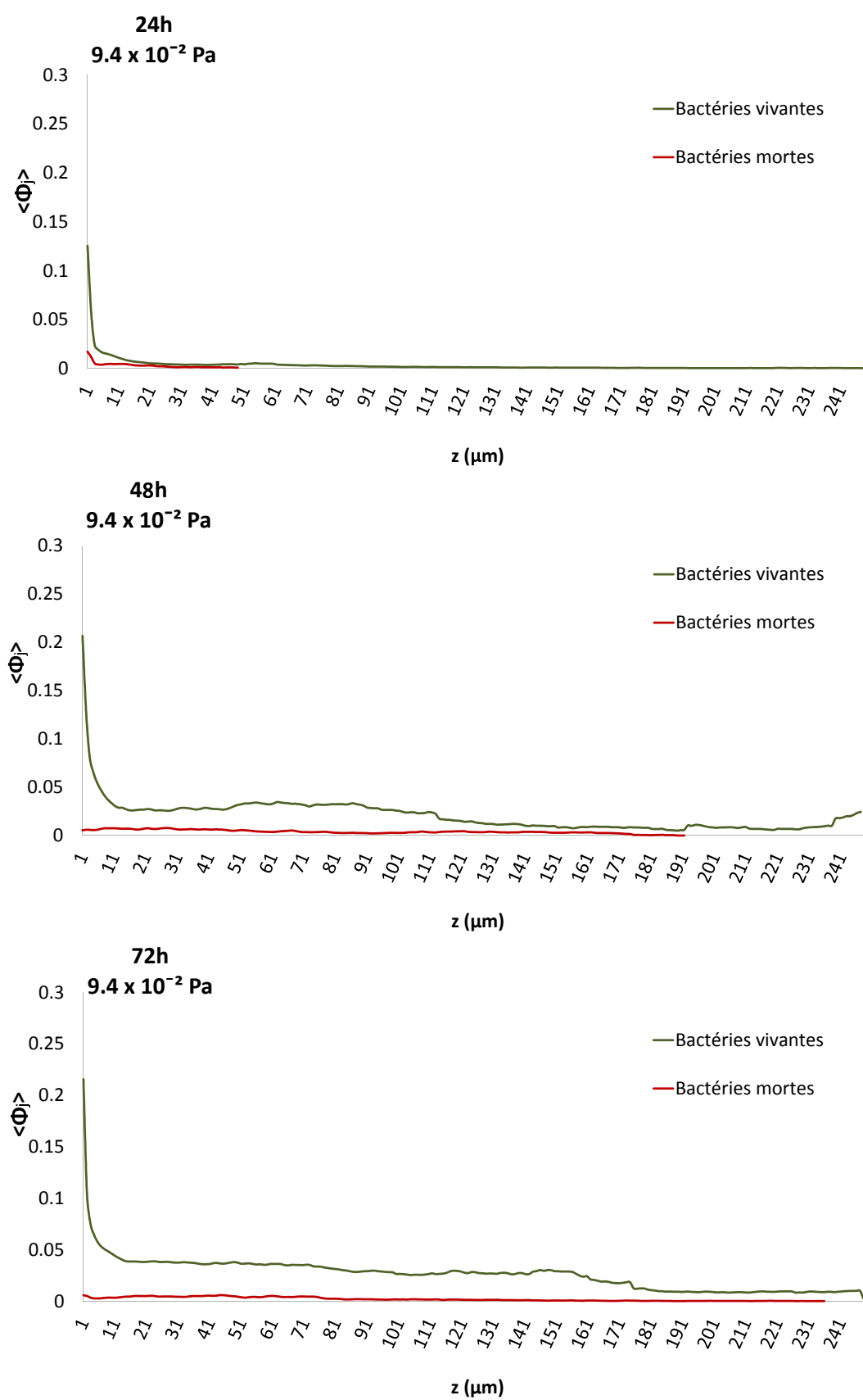


Figure 6.14 – Profil de la fraction volumique du Biofilm :  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa

### 6.4.2 Expériences à plus faible cisaillement : $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$ Pa

Pour ces dernières conditions hydrodynamiques, un seul jeu de données est disponible par temps d'observation. Comme au paragraphe précédent, nous présentons sur la figure 6.15 les profils selon  $z$  de la moyenne statistique de la fraction volumique dans une couche de biofilm (eq 6.8) pour les bactéries vivantes et mortes.

Qualitativement, nous observons le même comportement que pour les expériences à plus fort cisaillement : la fraction volumique décroît de façon monotone en fonction de " $z$ ". On peut séparer le biofilm en une zone dense, de quelques microns, près de la surface, suivie par une zone plus clairesemée. Là aussi, la comparaison qualitative des profils des fractions volumiques mortes et vivantes ne présente pas de stratification évidente du biofilm : la fraction volumique de bactéries mortes est quasiment homogène sur toute l'épaisseur et de loin très inférieure à la fraction volumique des bactéries vivantes. Là encore, cela peut être attribué à la durée maximale d'observation qui est seulement de 72h (biofilm "jeune").



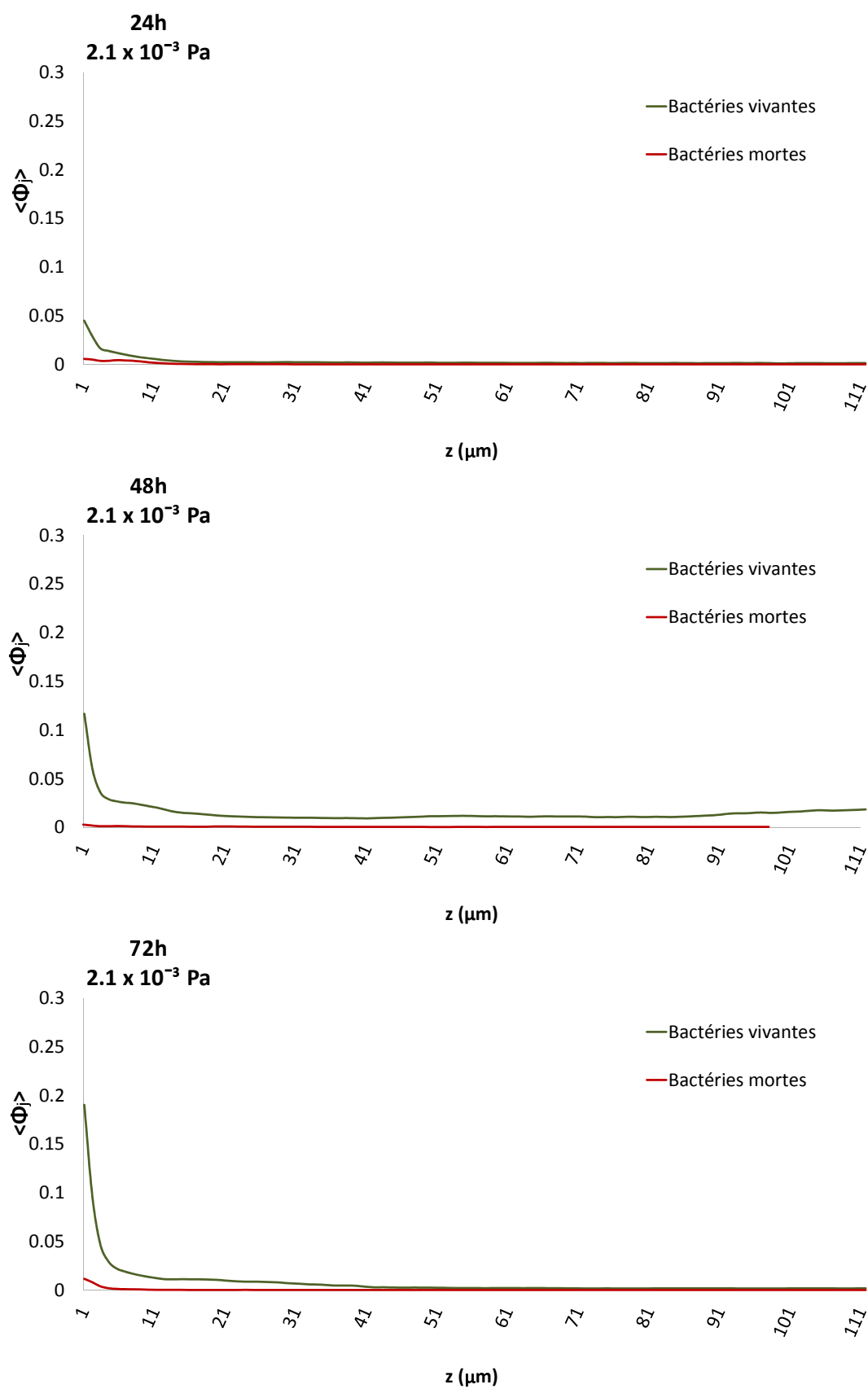
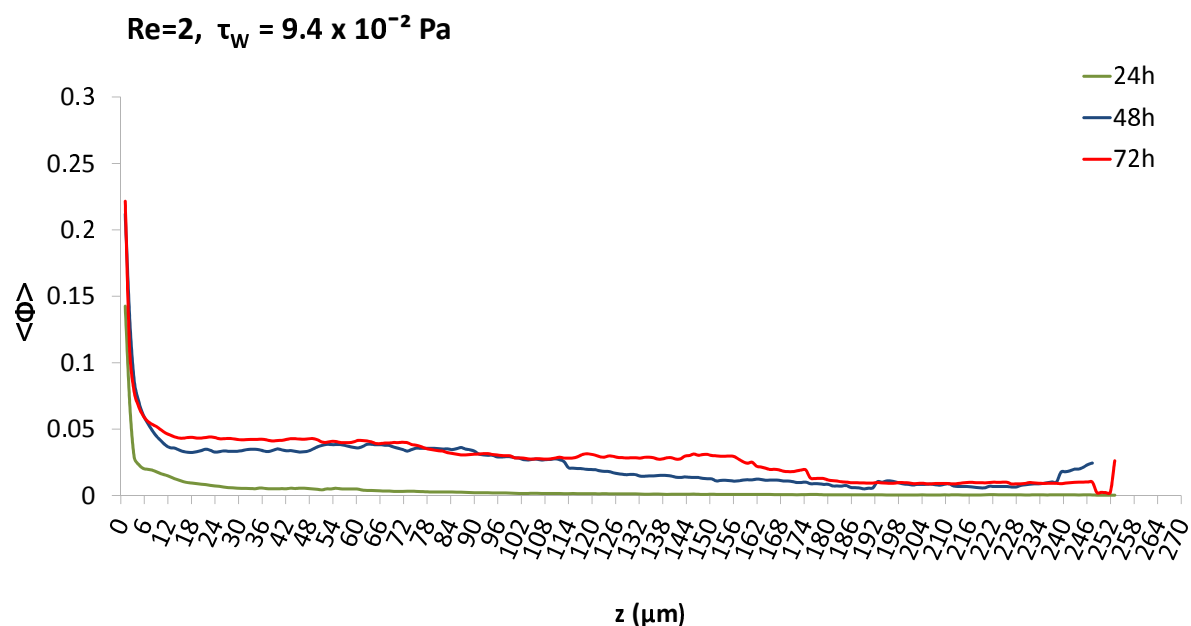
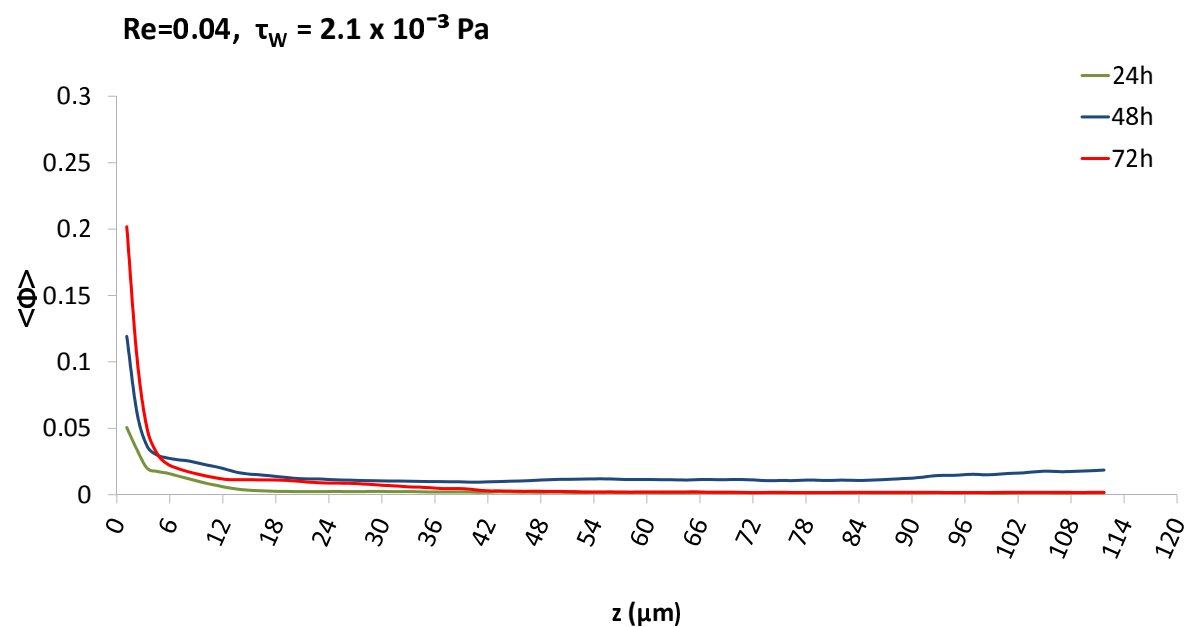


Figure 6.15 – Profil de la fraction volumique du Biofilm :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa

Afin de comparer le comportement du biofilm sous les deux conditions hydrodynamiques étudiées, les figures 6.16.a et 6.16.b ont été tracées afin de présenter conjointement l'évolution temporelle (à 24h, 48h et 72h) des profils en z de la moyenne statistique de la fraction volumique totale (bactéries vivantes et mortes), pour la plus faible et la plus forte contrainte de cisaillement imposée, respectivement.



**Figure 6.16** – Profil de la fraction volumique du biofilm à 24 h, 48 h et 72 h de croissance pour les deux conditions hydrodynamiques imposées : (a)  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa et (b)  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa.

Afin de comparer de manière plus quantitative les deux biofilms (bactéries vivantes), nous avons également comparé les deux zones du biofilm : zone interne ( $0 \leq h \leq H_{int}$ ) et zone externe ( $H_{int} \leq h \leq H_{ext}$ ).

Le tableau 6.4 compare les valeurs obtenues pour zone interne et la zone externe, ainsi que la fraction volumique moyenne correspondante ( $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$  et  $\langle \bar{\phi}_{ext} \rangle$ ), pour les deux conditions hydrodynamiques et les différents stades de croissance du biofilm. Rappelons que pour le cas où  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa, les résultats sont présentés après avoir pris la moyenne des jeux de données A et B.

| Expérience                              | Temps de développement du biofilm [h] | $H_{int}$ [ $\mu m$ ] | $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$ | $\langle \bar{\phi}_{ext} \rangle$ |
|---|---------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Min<br>$\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$ Pa | 24                                    | 5.84                  | 0.0221                             | 0.0018                             |
|   | 48                                    | 6.64                  | 0.0512                             | 0.0119                             |
|   | 72                                    | 8.18                  | 0.0598                             | 0.0030                             |
| Max<br>$\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$ Pa | 24                                    | 5.97                  | 0.0477                             | 0.0045                             |
|   | 48                                    | 10.79                 | 0.0766                             | 0.0294                             |
|   | 72                                    | 8.29                  | 0.0899                             | 0.0341                             |

**Table 6.4** – Indication des caractéristiques des points d’inflexion des courbes.

En comparant les deux expériences pour chaque temps donné, du point de vue qualitatif et quantitatif, les figures 6.16.a et 6.16.b ainsi que la table 6.4 montrent que les épaisseurs caractéristiques de la zone dense, aux incertitudes de mesures près, ne sont pas drastiquement différentes. On a observé un plus grand écart pour le temps  $t = 48$  h. Les deux expériences présentent un facteur 50 à la paroi pour la contrainte de cisaillement. Le développement du biofilm dans la zone pariétale, à la vue des valeurs de  $H_{int}$  et des fractions volumiques associées, semble correspondre à une densification de cette zone, par une multiplication des bactéries sur une zone de quelques microns. Les valeurs de fraction volumique montrent que le biofilm est en outre plus compact pour le cas où le cisaillement est le plus fort, dans les couches internes et externes, ce qui est conforme aux observations rapportées dans la littérature (Lemos *et al.*, 2015; Vrouwenvelder *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2008; Liu & Tay, 2002; Pereira *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 1993).

Nous vérifierons également dans la section 6.6 si la compacité plus importante peut s’expliquer via une influence du cisaillement sur la cinétique de croissance bactérienne.

Au delà de la zone pariétale, dans les deux cas, le biofilm présente aussi un certain développement. Qualitativement, à la vue des figures 6.16.a et 6.16.b, le biofilm cultivé sous les conditions de plus fort cisaillement possède une fraction volumique bien plus forte dans cette zone que celui cultivé pour des conditions de cisaillement moins élevé. Dans les deux cas, l’évolution de la fraction volumique ne semble pas présenter une évolution monotone avec le temps : pour le biofilm cultivé à plus faible cisaillement en particulier, la fraction volumique dans cette zone chute assez nettement après  $t = 48$ h, alors que le biofilm cultivé sous plus fort cisaillement semble présenter encore une légère phase de croissance.

La forte différence de fraction volumique entre la zone pariétale et la zone extérieure (environ 80%) laisse aussi entrevoir un biofilm plus "filamenteux" dans la zone externe (ce que

confirment les images brutes du microscope confocal, Fig. 6.28). L'influence des contraintes hydrodynamiques, en particulier des forces de détachement, peut expliquer la variabilité des profils au cours du temps dans cette zone externe. Cependant, on constate que c'est paradoxalement le biofilm soumis au champ de vitesse le plus élevé qui maintient la fraction volumique la plus forte dans cette zone externe, de la même façon que la zone pariétale est plus compacte pour ces conditions.

De l'évolution temporelle des fractions volumiques dans la zone pariétale dense ou la zone externe (dont l'accroissement semble s'infléchir avec le temps), il est difficile de juger si l'on s'approche d'un état stationnaire : les temps d'observations sont en effet trop courts pour l'affirmer de manière sûre. Les données brutes ne permettent pas d'expliquer simplement ces observations, en particulier pour la zone externe dont l'état résulte d'une compétition entre la cinétique nette de croissance, la quantité éventuelle de biofilm détaché sous l'action de l'écoulement et la tenue mécanique du biofilm.

## 6.5 Distribution Spatiale

Le paragraphe précédent s'était attaché à l'analyse de la structure et du développement du biofilm en s'intéressant aux courbes moyennées sur toutes les positions d'observation des profils de fraction volumique. Nous nous attachons maintenant à une analyse de la distribution spatiale du biofilm. Avec cette analyse nous allons porter un premier regard à une échelle supérieure (par un passage de l'échelle locale à la macro-échelle), en n'analysant plus la structure à l'échelle de quelques microns, mais sur quelques millimètres (taille de la matrice solide).

Une différence dans la structuration spatiale des biofilms obtenus pour les deux conditions hydrodynamiques étudiées peut déjà être observée à partir des écart-types par rapport aux profils moyennés. La figure 6.17 reprend ainsi les profils moyennés déjà présentés au paragraphe précédent auxquels on a superposé la valeur des écart-types à chaque hauteur  $z$ . En comparant ces écarts-types pour les deux conditions hydrodynamiques étudiées, on constate déjà ainsi une répartition spatiale plus hétérogène pour le biofilm cultivé sous des conditions de plus fort cisaillement par rapport à celui cultivé à plus faible cisaillement.

Pour mieux comprendre cette structuration spatiale, à chaque point de mesure nous avons également associé deux zones, une zone interne plus dense et une zone externe. Comme présenté dans l'annexe C, le traitement des images a été réalisé sur un grand nombre de positions pour les cas où on visualise uniquement des bactéries vivantes. De ce fait, dans cette section, nous avons pris en compte uniquement ces configurations.

La fraction volumique dans la zone interne ( $\bar{\phi}_{int}$ ) est calculée entre les hauteurs  $0 \leq h \leq H_{int}$  pour chaque position analysée. Pour une chambre donnée, on note  $H_{int.max}$  l'épaisseur maximale de la zone interne sur ces différentes positions. Par convention, les fractions volumiques de la zone externe du biofilm ( $\bar{\phi}_{ext}$ ) sont calculées entre  $H_{int.max}$  et la hauteur  $h = 112\mu m$  ( $H_{ext}$ ). Ainsi la zone externe sera analysée sur la même épaisseur, quelle que soit la position dans la chambre d'écoulement.

Nous avons ensuite calculé la densité surfacique de la biomasse contenue dans le biofilm :

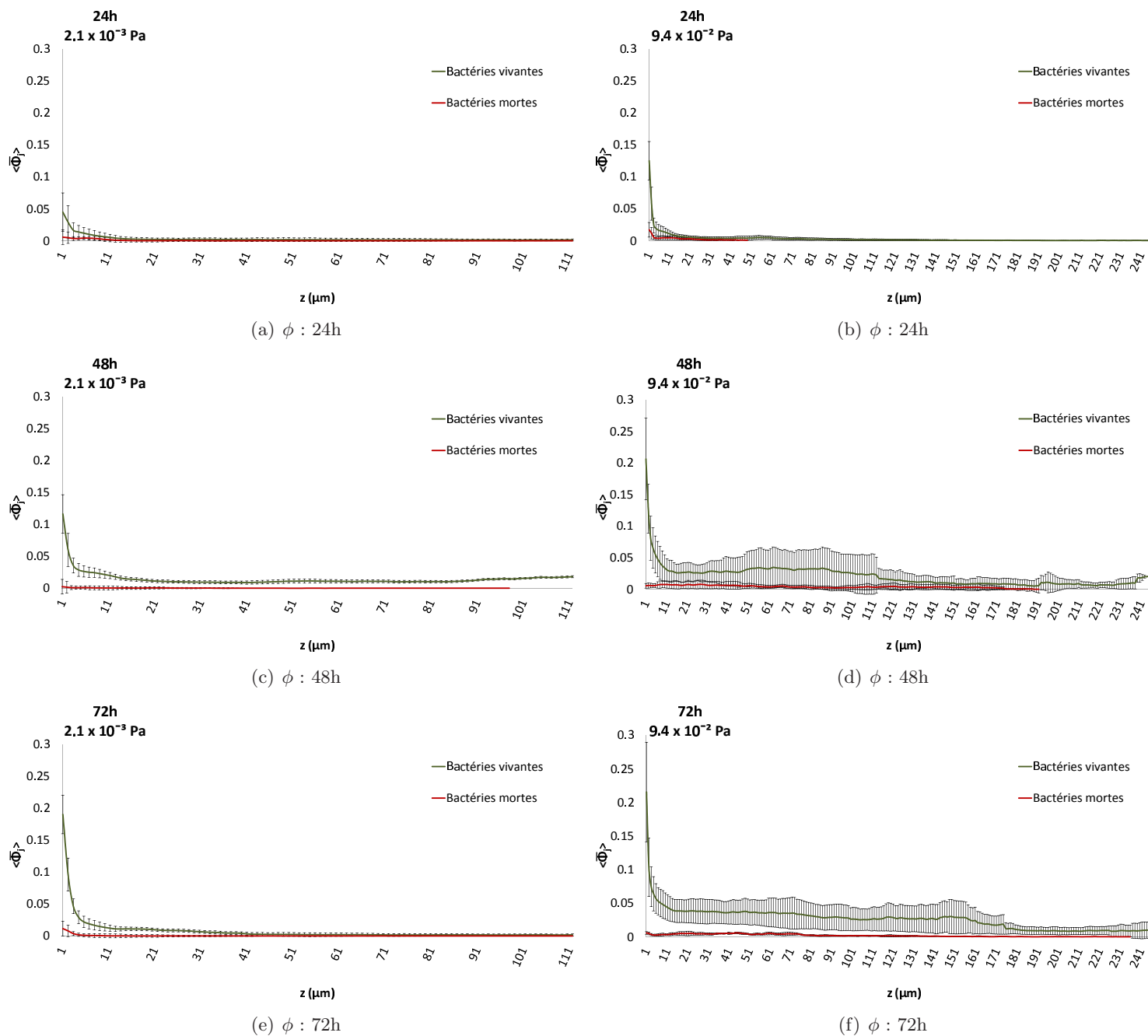


Figure 6.17 – Profil des fractions volumiques moyennées avec les écart-types :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3} \text{ Pa}$  (gauche) et  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2} \text{ Pa}$  (droite).

$D = H \times \phi$ , exprimée en  $m^3$  de biomasse par  $m^2$  de surface colonisée.  $D_{int}$  et  $D_{ext}$  représentent donc respectivement la densité surfacique de la zone interne et celle de la zone externe en une position donnée. La distribution spatiale dans le plan (x,y) de la densité surfacique  $D_{int}$  est tracée sur les figures 6.18, 6.19, 6.20 et 6.21 pour les différents temps de formation. Les données disponibles sont représentées par le symbole  $\circ$ . Comme les données (les valeurs de “D”) ne sont pas disponibles sur toutes les positions d’échantillonnage, la surface qui représente la fonction  $D(x, y)$  est modélisée en utilisant la triangulation de Delaunay. La triangulation de Delaunay est l’ensemble des triangles construit en reliant chacun des points d’un ensemble de données irrégulièrement espacées où les sommets des triangles sont les points de données. La densité surfacique est ensuite interpolée entre les isovaleurs de la densité surfacique (les sommets) en utilisant l’interpolation par spline cubique dans les figures 6.18, 6.19, 6.20 et 6.21 (sur la droite des figures). Les figures 6.23, 6.24, 6.25 et 6.26 montrent la distribution  $D(x, y)$  et les isovaleurs pour la zone externe.

Afin d’estimer un paramètre représentatif de la variation de la distribution  $D$ , nous avons calculé l’aire de la surface formée par la fonction  $D(x, y)$ . Cette surface  $A$  correspond à l’intégration de la variation de  $D$  sur la surface colonisée, selon l’équation 6.10 :

$$A = \int \int \left( \left( \frac{\partial D}{\partial x} \right)^2 + \left( \frac{\partial D}{\partial y} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} dx.dy \quad (6.10)$$

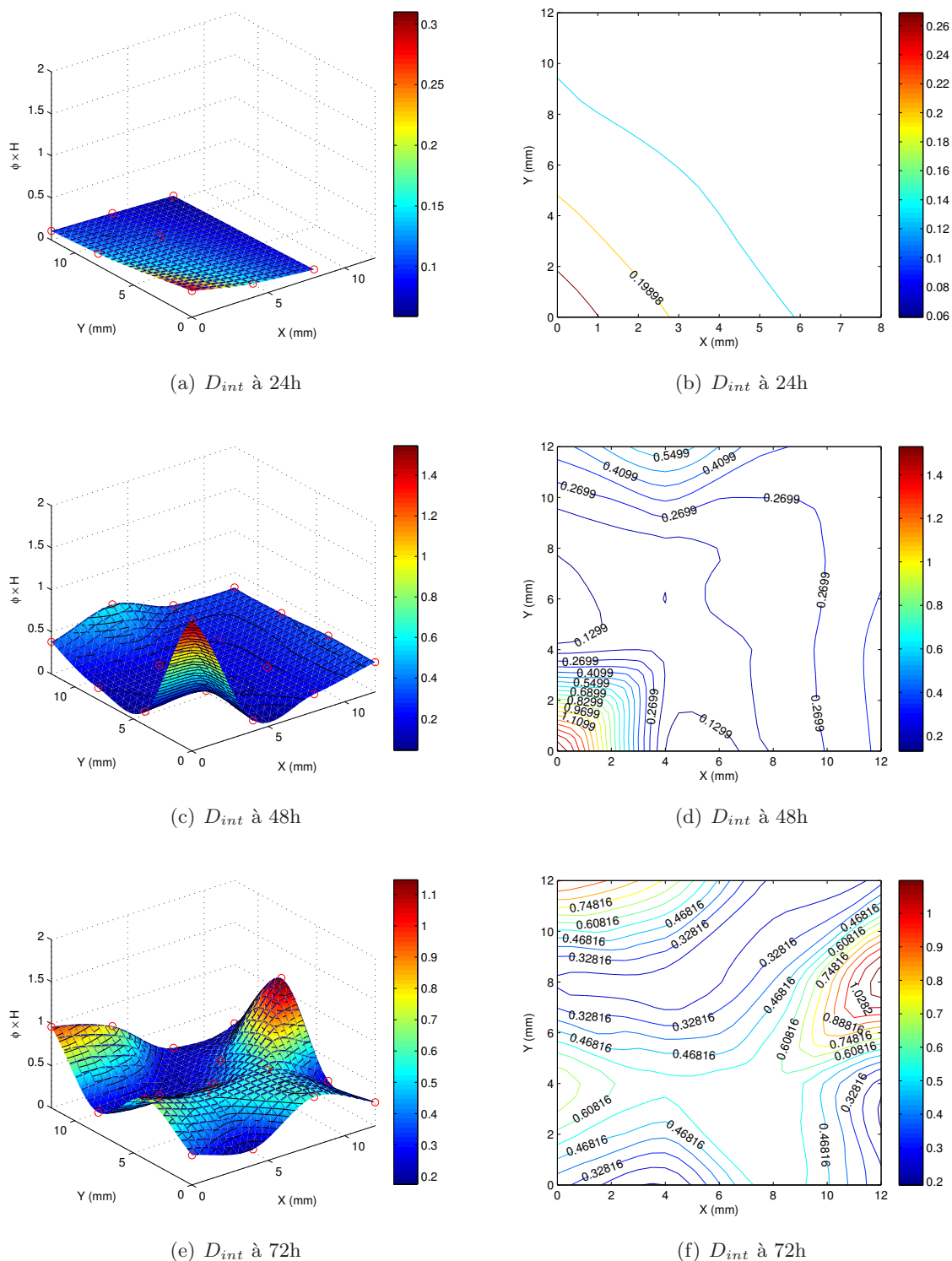
Le facteur de variation ( $\alpha$ ) est alors défini comme le rapport entre  $A$  et l’aire de la surface colonisée (eq. 6.11). Il représente l’hétérogénéité spatiale de la densité surfacique.

$$\alpha = \frac{A}{\Delta x \cdot \Delta y} \quad (6.11)$$

Sur la figure 6.22, nous avons tracé l’évolution de la fraction volumique  $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$ , la densité surfacique  $\langle \bar{D}_{int} \rangle$  et le facteur de variation  $\alpha_{int}$  de la zone interne en fonction l’âge du biofilm. Les mêmes courbes pour la zone externe sont présentées sur la figure 6.27.

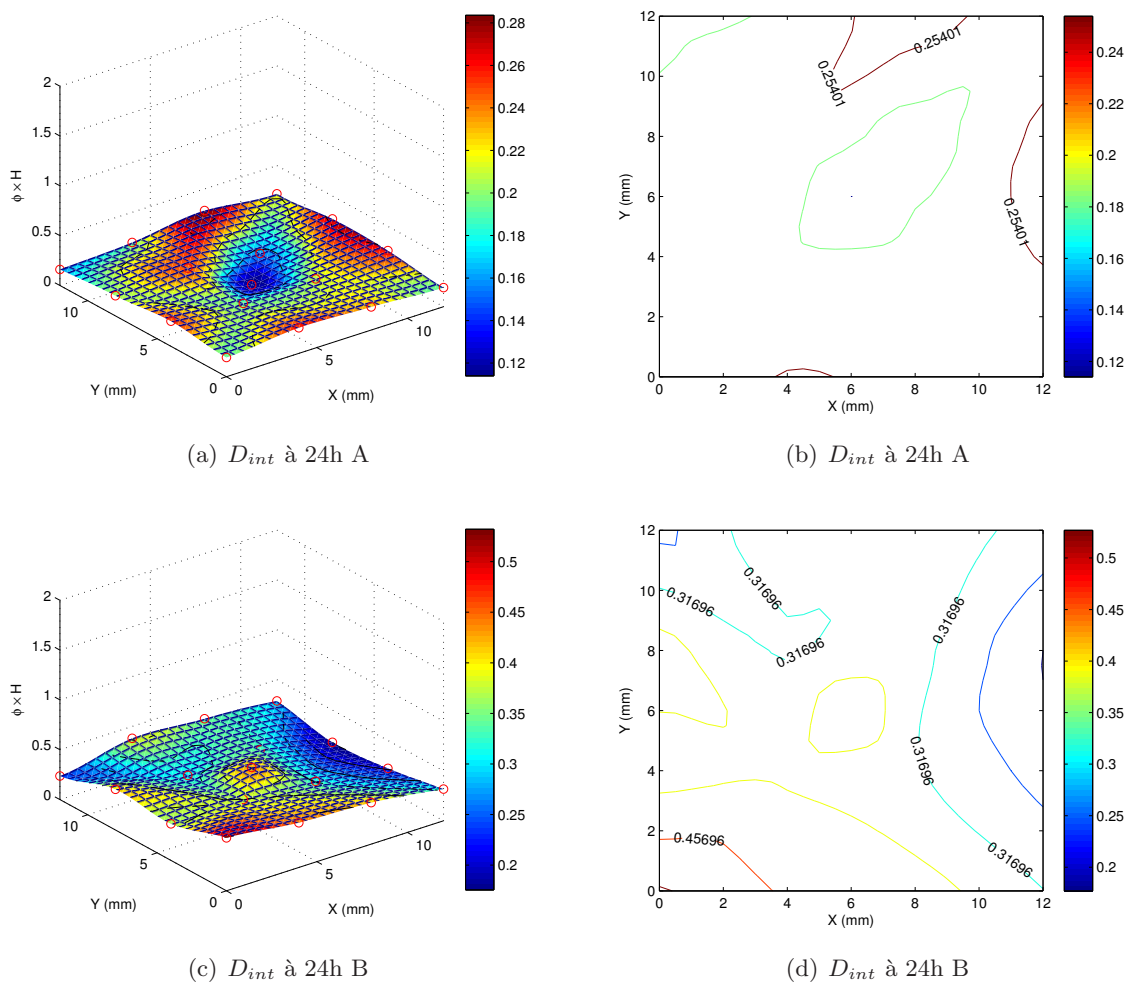
L’annexe F présente les valeurs des épaisseur  $H_{int}$ ,  $\phi_{int}$ ,  $\phi_{ext}$  et  $\phi_{total}$  pour chaque position et pour chaque expérience.

Nous rappelons enfin que, dans les analyses qui suivent, les expériences réalisées doivent être considérées comme 9 réalisations indépendantes du développement du biofilm, pour certaines dans les mêmes conditions hydrodynamiques.

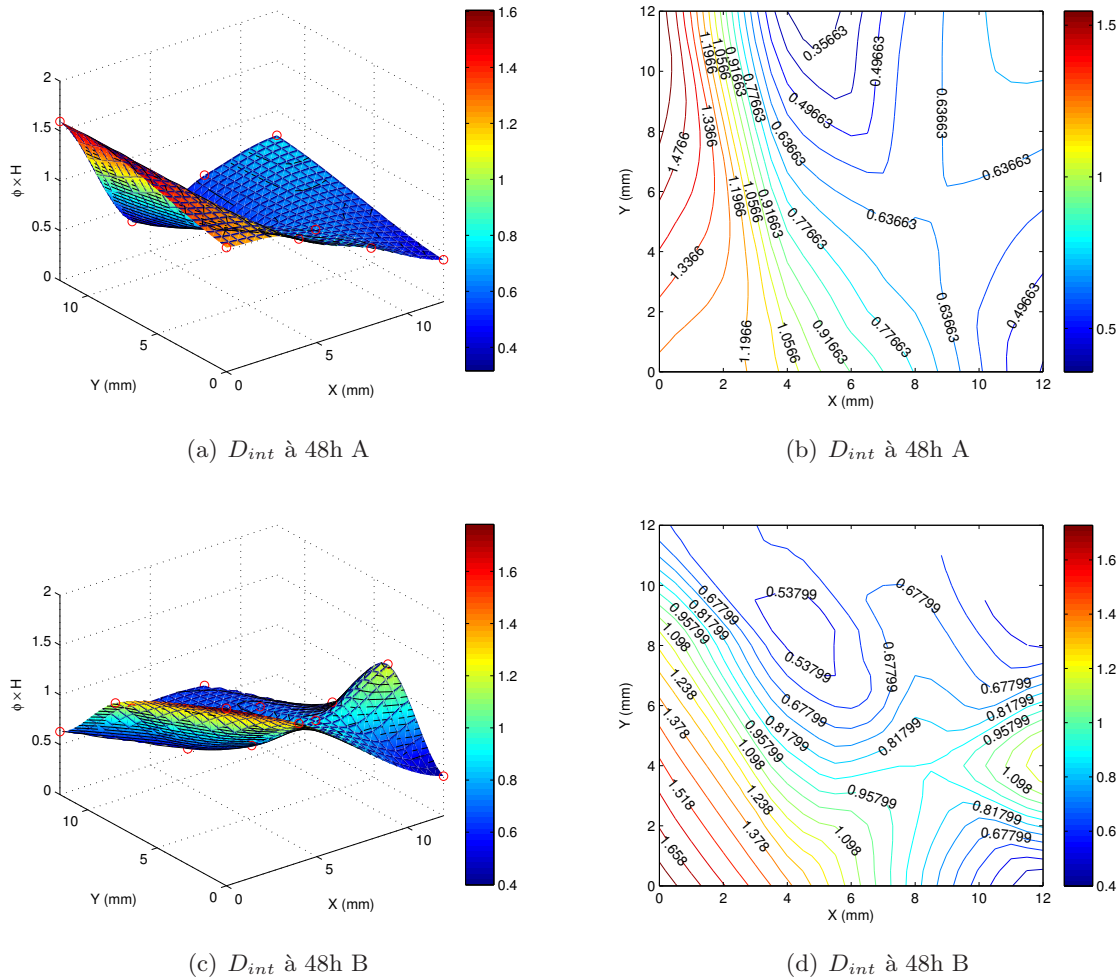


**Figure 6.18** – Distribution spatiale  $(x,y)$  de la densité surfacique  $D_{int}$  ( $m^3$  de biomasse/  $m^2$ ) des biofilms formés sous l'écoulement cisailé ( $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa) après 24 h, 48 h et 72 h de formation/développement. La direction de l'écoulement :  $\vec{e}_x$ . Le symbole  $\circ$  correspond aux données disponibles.

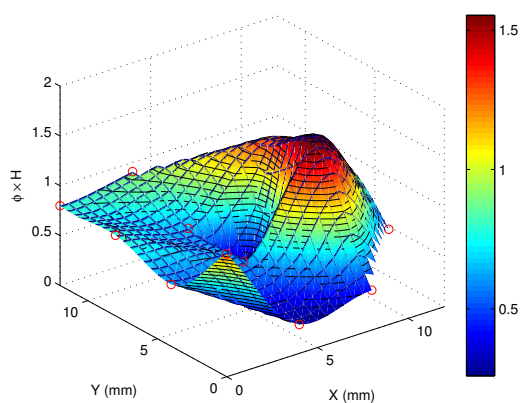
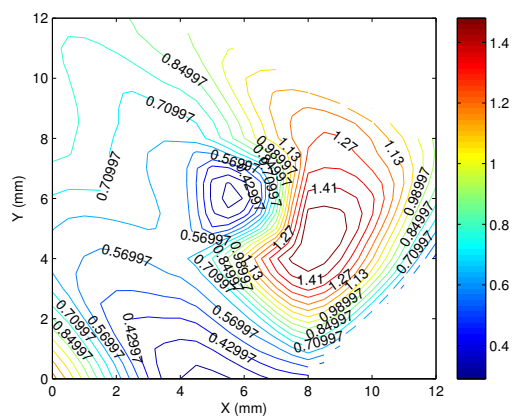
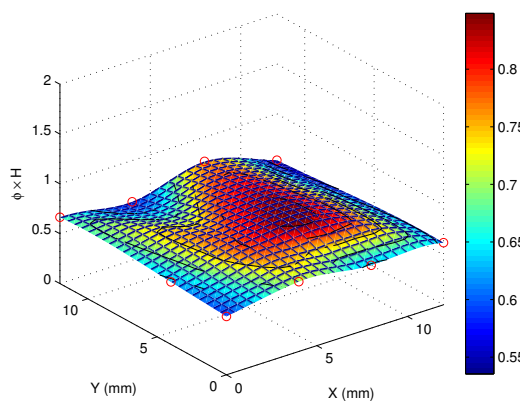
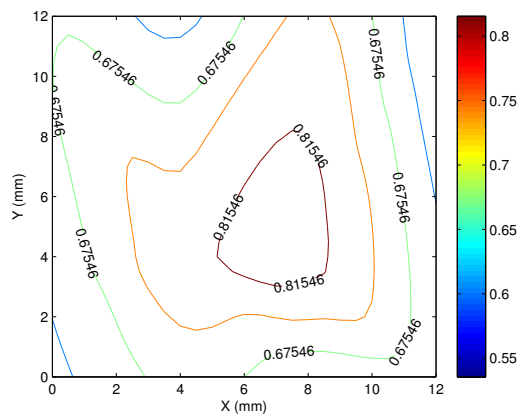




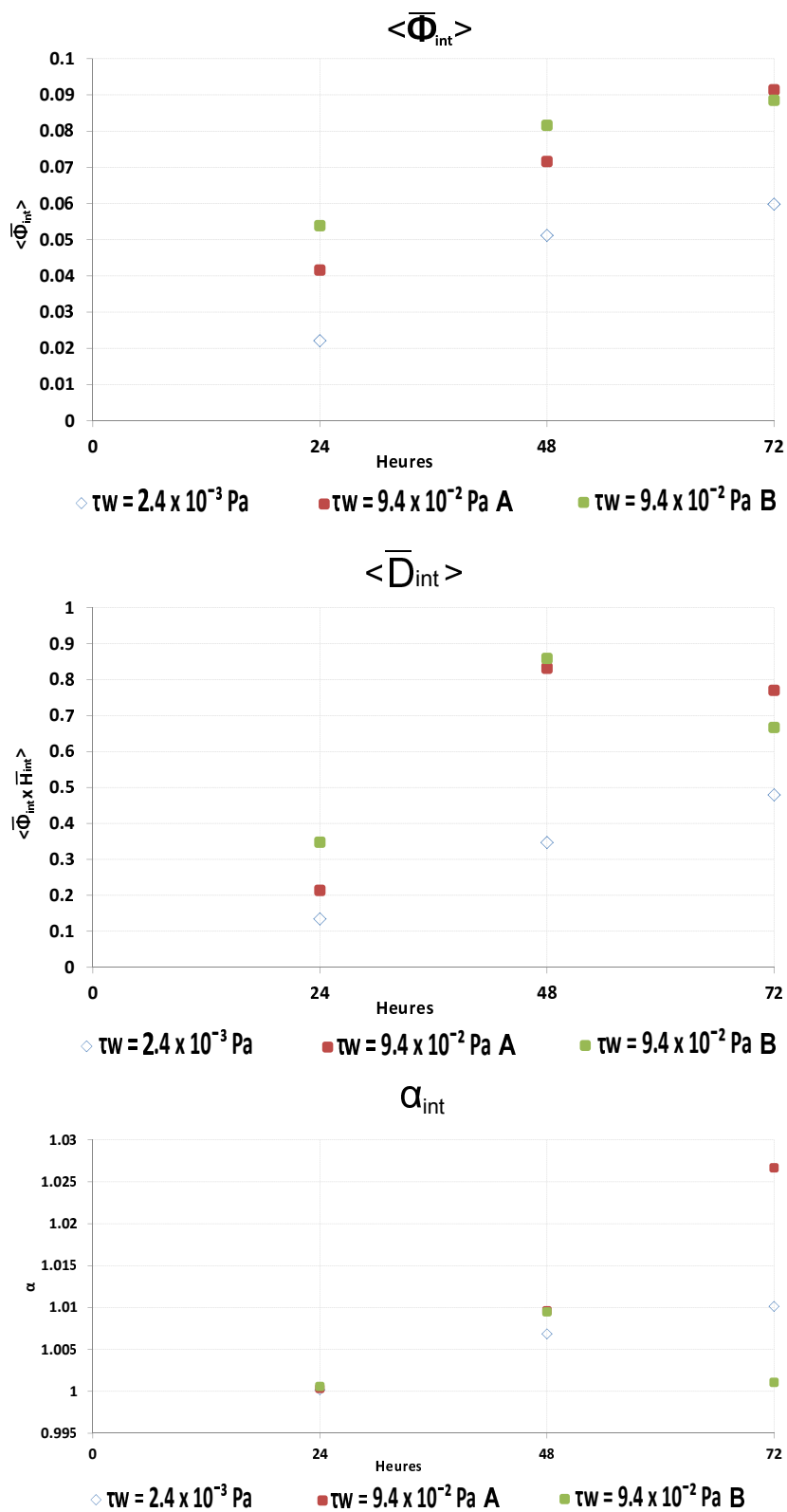
**Figure 6.19** – Distribution spatiale  $(x,y)$  de la densité surfacique  $D_{int}$  ( $m^3$  de biomasse/ $m^2$ ) des biofilms formés sous l'écoulement cisailé ( $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa) après 24 h de formation/développement (les expériences A et B). La direction de l'écoulement :  $\vec{e}_x$ . Le symbole  $\circ$  correspond aux données disponibles.



**Figure 6.20** –  $D_{int}$  (Distribution spatiale (x,y) de la densité surfacique  $D_{int}$  ( $m^3$  de biomasse/ $m^2$ ) des biofilms formés sous l'écoulement cisailé ( $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa) après 48 h de formation/développement (les expériences A et B). La direction de l'écoulement :  $\vec{e}_x$ . Le symbole  $\circ$  correspond aux données disponibles.

(a)  $D_{int}$  à 72h A(b)  $D_{int}$  à 72h A(c)  $D_{int}$  à 72h B(d)  $D_{int}$  à 72h B

**Figure 6.21** – Distribution spatiale (x,y) de la densité surfacique  $D_{int}$  ( $m^3$  de biomasse/ $m^2$ ) des biofilms formés sous l'écoulement cisailé ( $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa) après 72 h de formation/développement (les expériences A et B). La direction de l'écoulement :  $\vec{e}_x$ . Le symbole  $\circ$  correspond aux données disponibles.



**Figure 6.22** – Evolution des paramètres  $\phi_{int}$ ,  $D_{int}$  ( $H_{int} \times \phi_{int}$ ) et  $\alpha_{int}$  en fonction du temps de formation pour les deux conditions hydrodynamique étudiées.

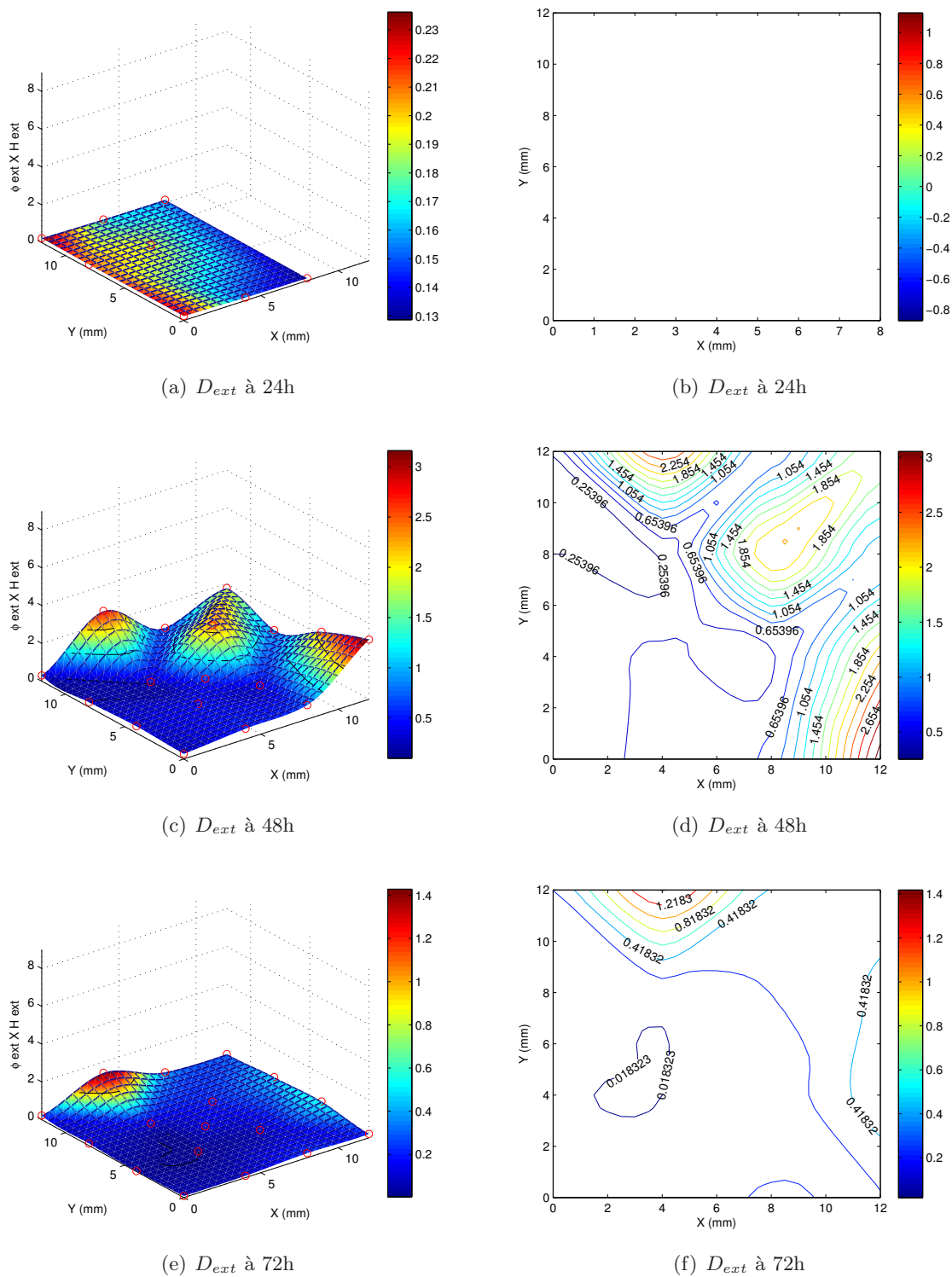
### 6.5.1 Zone interne

Quelles que soient les conditions hydrodynamiques, les différentes réalisations montrent que la fraction volumique moyenne (Fig. 6.22.a) augmente au fur et à mesure que le temps de formation s'allonge ( $t = 24 h, 48 h, 72 h$ ).

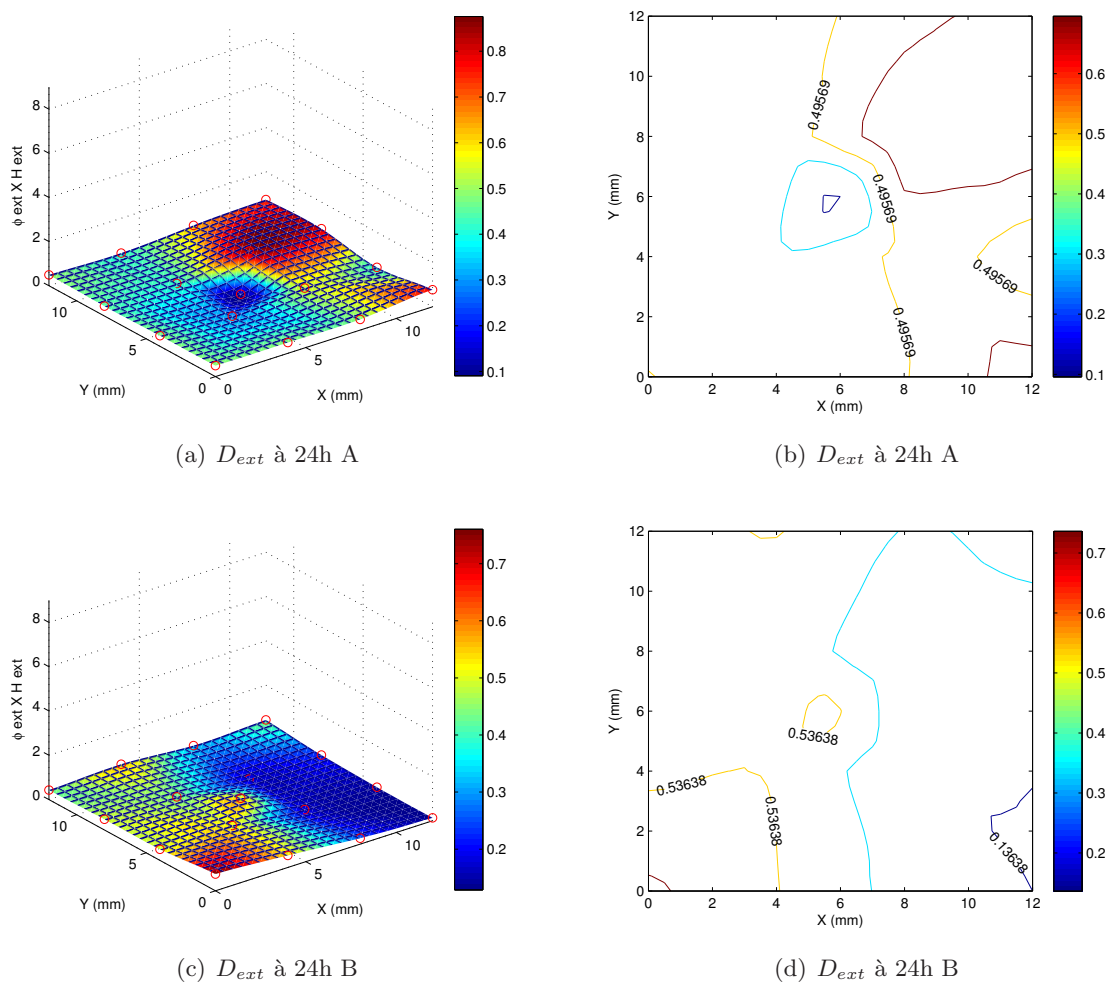
Pour le plus faible cisaillement, en observant les isovaleurs de la densité surfacique dans la figure 6.18 on observe une augmentation de l'hétérogénéité du biofilm avec le temps de formation. D'ailleurs, on constate une augmentation monotone du facteur de variation de la densité surfacique de la biomasse ( $\alpha_{int}$ ) en fonction du temps (Fig. 6.22.c). Ceci confirme l'augmentation de l'hétérogénéité avec l'âge du biofilm pour cette condition hydrodynamique.

Dans le cas des biofilms développés sous le plus fort cisaillement, comme nous l'avons déjà dit, on constate sur les courbes des profils moyennés de la fraction volumique avec leurs écarts-types respectifs (Fig. 6.17), que le biofilm semble avoir une hétérogénéité plus forte pour la condition à plus fort cisaillement par rapport à la condition à plus faible cisaillement, déjà dans sa partie interne. On observe également sur la figure 6.22 que lorsque  $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$  augmente,  $\langle \bar{D}_{int} \rangle$  diminue au temps de formation  $t = 72h$ . Par conséquent  $\langle \bar{H}_{int} \rangle$  diminue également. Ceci implique une densification du biofilm à  $72 h$  de formation pour les deux conditions. De plus, certaines réalisations (A) montrent une augmentation de l'hétérogénéité de la densité en fonction de l'âge du biofilm jusqu'au temps de formation  $t = 72h$ . Cela s'observe sur l'évolution du facteur de variation  $\alpha_{int}$  et sur l'allure des courbes de niveaux des densités surfaciques. La réalisation A en particulier présente un champ de la densité surfacique D plus vallonné avec une zone de déficit en biomasse bien marqué à  $t = 72h$ .

Pour la réalisation B, les courbes de la fraction volumique moyenne, de la densité surfacique moyenne et du facteur de variation (Fig. 6.22) semblent indiquer une évolution différente de la structure du biofilm. Si on constate une valeur légèrement plus importante de la fraction volumique à  $t = 72h$ , cela s'accompagne d'une diminution de la densité surfacique et du coefficient de variation. Ajouté à la comparaison des figures 6.20.c et 6.21.c, pour lesquelles on observe également des changements du profil  $D(x,y)$ , ceci semblerait accréditer l'existence des processus de détachement/érosion dans la zone interne.

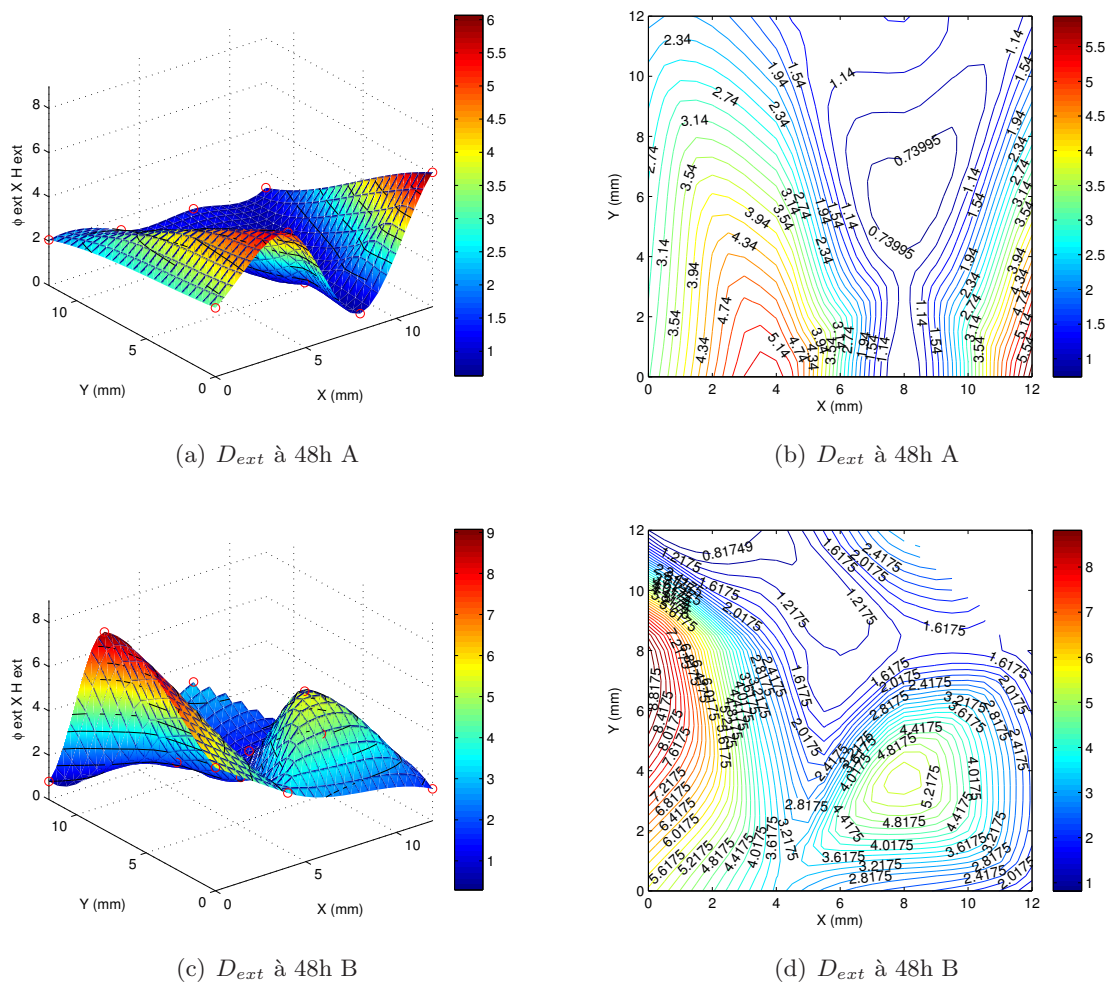


**Figure 6.23** – Distribution spatiale  $(x,y)$  de la densité surfacique  $D_{ext}$  ( $m^3$  de biomasse/  $m^2$ ) des biofilms formés sous l'écoulement cisailé ( $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa) après 24 h, 48 h et 72 h de formation/développement. La direction de l'écoulement :  $\vec{e}_x$ . Le symbole  $\circ$  correspond aux données disponibles.

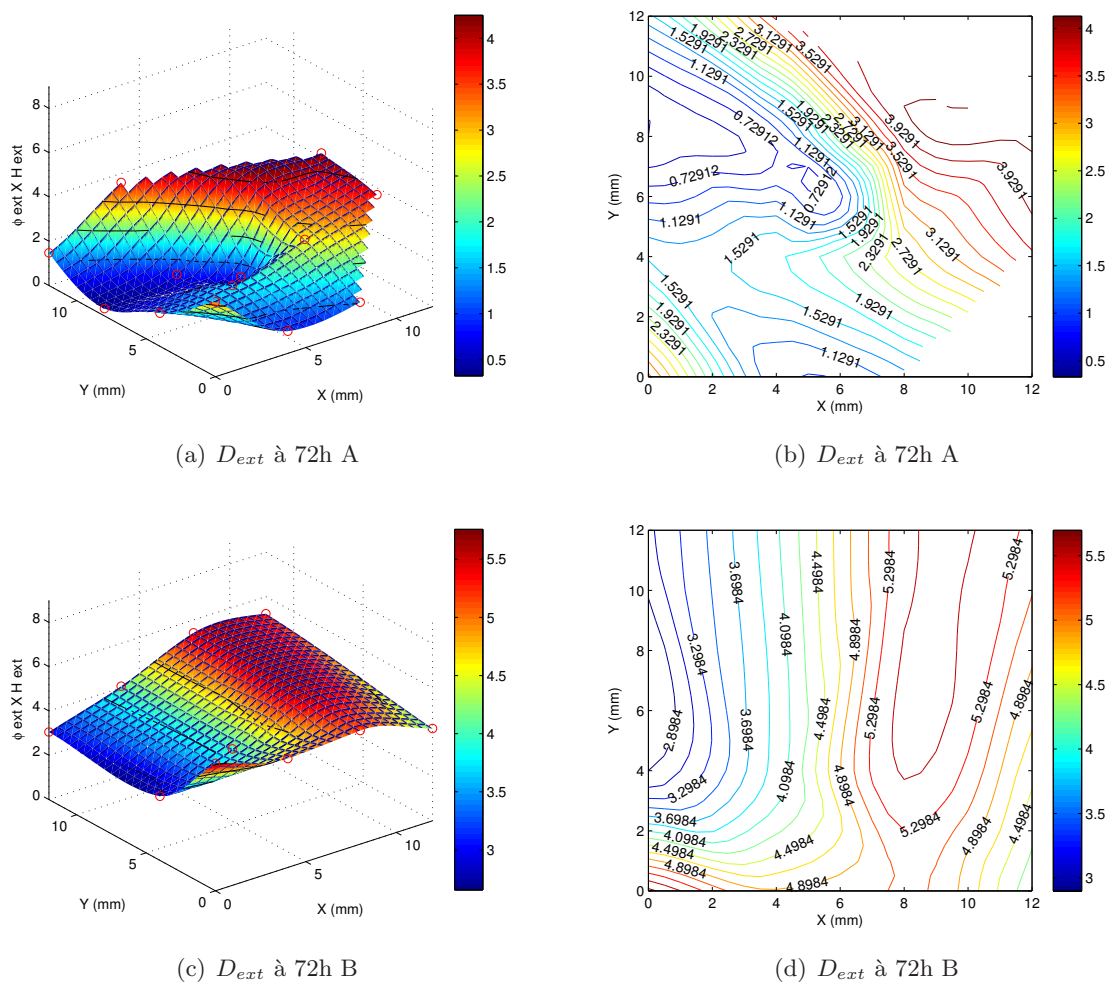


**Figure 6.24** – Distribution spatiale  $(x,y)$  de la densité surfacique  $D_{ext}$  ( $m^3$  de biomasse/ $m^2$ ) des biofilms formés sous l'écoulement cisailé ( $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa) après 24 h de formation/développement (les expériences A et B). La direction de l'écoulement :  $\vec{e}_x$ . Le symbole  $\circ$  correspond aux données disponibles.

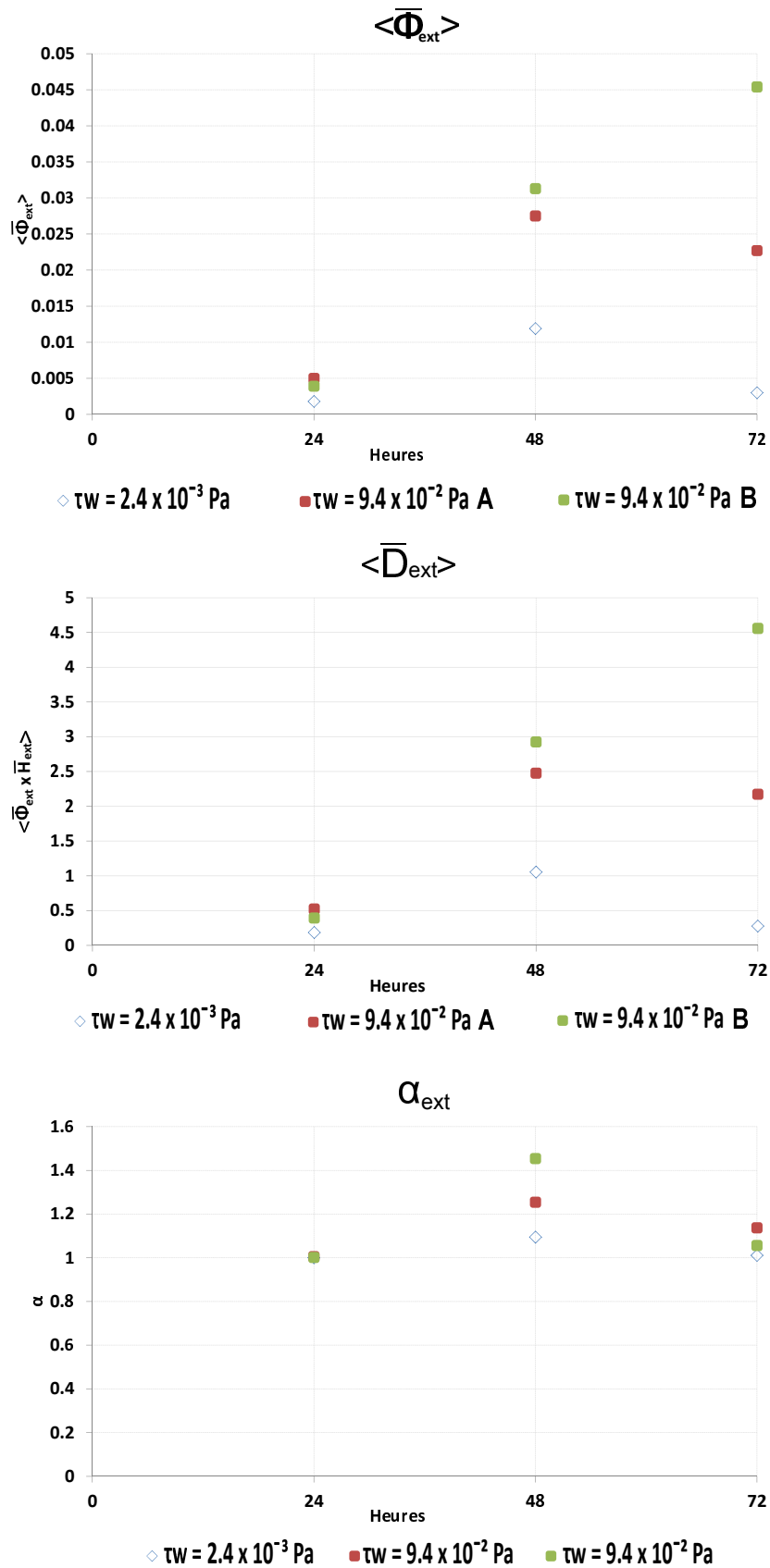




**Figure 6.25** – Distribution spatiale (x,y) de la densité surfacique  $D_{ext}$  ( $m^3$  de biomasse/ $m^2$ ) des biofilms formés sous l'écoulement cisailé ( $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa) après 48 h de formation/développement (les expériences A et B). La direction de l'écoulement :  $\vec{e}_x$ . Le symbole  $\circ$  correspond aux données disponibles.



**Figure 6.26** – Distribution spatiale (x,y) de la densité surfacique  $D_{ext}$  ( $m^3$  de biomasse/ $m^2$ ) des biofilms formés sous l'écoulement cisailé ( $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa) après 72 h de formation/développement (les expériences A et B). La direction de l'écoulement :  $\vec{e}_x$ . Le symbole  $\circ$  correspond aux données disponibles.



**Figure 6.27** – Evolution des paramètres  $\phi_{ext}$ ,  $D_{ext}$  ( $H_{ext} \times \phi_{ext}$ ) et  $\alpha_{ext}$  en fonction du temps de formation pour les deux conditions hydrodynamique étudiées.

### 6.5.2 Zone externe

En observant les courbes  $\phi_{ext}$  et  $D_{ext}$  (Fig. 6.27), le biofilm apparaît moins dense à plus faible cisaillement.

Pour les deux conditions hydrodynamiques, de manière générale, en observant les courbes  $\alpha_{ext}$  (Fig. 6.27), on constate que les expériences à  $t = 24h$  présentent la même homogénéité ( $\alpha_{ext} = 1$ ) dans la zone externe. A  $t = 48h$ , on observe une augmentation de l'hétérogénéité. Les réalisations observées après un temps de croissance de  $72 h$  présentent à nouveau un biofilm plus homogène spatialement. Pour ces deux conditions hydrodynamiques, l'analyse croisée des courbes de distribution spatiale de la densité surfacique et de l'évolution de  $\alpha_{ext}$  indique un possible phénomène de détachement/érosion entre les temps  $48 h$  et  $72 h$ . La considération de ce phénomène de détachement entre ces deux temps, peut ainsi permettre d'expliquer un certain "lissage" des surfaces représentant la distribution spatiale de la densité surfacique. Par ailleurs, la variation de  $\alpha_{ext}$  selon l'âge du biofilm pour le cas avec le plus faible taux de cisaillement est très faible ( $\pm 0.05$ ) par rapport à celle du cas avec plus fort taux de cisaillement.

En observant les variations de  $\phi_{ext}$  et  $D_{ext}$  (Fig. 6.27), on constate que pour les observations entre  $t = 24h$  et  $t = 48h$ , la zone externe s'est densifiée. Cela s'accompagne d'une valeur plus importante de  $\alpha_{ext}$ , ce qui serait la marque d'un biofilm plus hétérogène spatialement : en effet, ce comportement se retrouve visuellement sur les distribution spatiale de  $D$  et les lignes isovaleurs correspondantes (Fig. 6.24 et 6.25). Les réalisations observées à  $t = 72h$  montrent ensuite un comportement différent pour les paramètres  $\phi_{ext}$  et  $\alpha_{ext}$  entre les 2 réalisations correspondant aux expériences A et B. Cependant, les deux biofilms présentent des valeurs de  $\alpha_{ext}$  assez proches.

En résumé les biofilms formés pour le plus fort cisaillement imposé dans cette étude présentent une plus grande densité surfacique.

En comparant les distribution spatiale de la densité surfacique et le facteur de variation  $\alpha$  entre la zone interne et externe, on observe que la zone externe présente une structure beaucoup plus hétérogène ( $\alpha = 1.1 \sim 1.4$ ) que celle de la zone interne ( $\alpha < 1.025$ ) quelle que soit la condition hydrodynamique imposée.

Pour les deux conditions hydrodynamiques imposées, la zone externe semble plus hétérogène dans le cas du cisaillement le plus fort. Cela est plus difficile à affirmer pour la zone interne dont les coefficients  $\alpha$  sont très proches de 1 ( $< 1,03$ ) quel que soit l'instant d'observation.

Les deux conditions hydrodynamiques imposées montrent en outre un gain net de la quantité de biomasse selon l'âge du biofilm pour la zone interne. Pour la zone externe, selon les conditions ou les réalisations observées, on constate soit une réduction de la biomasse (faible cisaillement et expérience A à plus fort cisaillement) soit encore un gain net de biomasse (expérience B à plus fort cisaillement) au temps  $t = 72 h$ . Dans tous les cas, cela s'accompagne d'une diminution du coefficient  $\alpha_{ext}$  (ce qui indique une certaine baisse d'hétérogénéité).

Cela peut indiquer un possible processus de détachement/érosion qui apparaît entre  $t = 48 h$  et  $t = 72 h$  (principalement pour la partie externe), pour une valeur critique de la fraction volumique non quantifiable mais à priori supérieure aux valeurs mesurées à  $t = 48 h$ . Après ces processus de "détachement" on observe un "lissage" du biofilm et ainsi une réduction de son hétérogénéité spatiale.

## 6.6 Cinétique de croissance du biofilm

Dans cette section nous avons comparé les courbes des cinétiques de croissance du biofilm pour les deux contraintes de cisaillement imposées. Comme mentionné dans les textes précédents, nous avons seulement quatre temps d'analyse pour chaque conditions hydrodynamique étudiée (à  $t=0, 24 h, 48 h$  et  $72 h$ ), ainsi cette analyse n'a pas pour but démontrer parfaitement le développement du biofilm dans le temps, mais elle permet néanmoins de tirer des enseignements très intéressants concernant la tendance de la croissance.

Pour illustrer le biofilm formé sous les conditions hydrodynamiques étudiée, les figures 6.28.a et .b montrent des images des biofilms développés pendant  $72 h$  sous le plus faible et fort cisaillement imposé. On observe que le biofilm développé sous un plus fort cisaillement présente un volume d'occupation plus élevé que celui sous plus faible cisaillement.

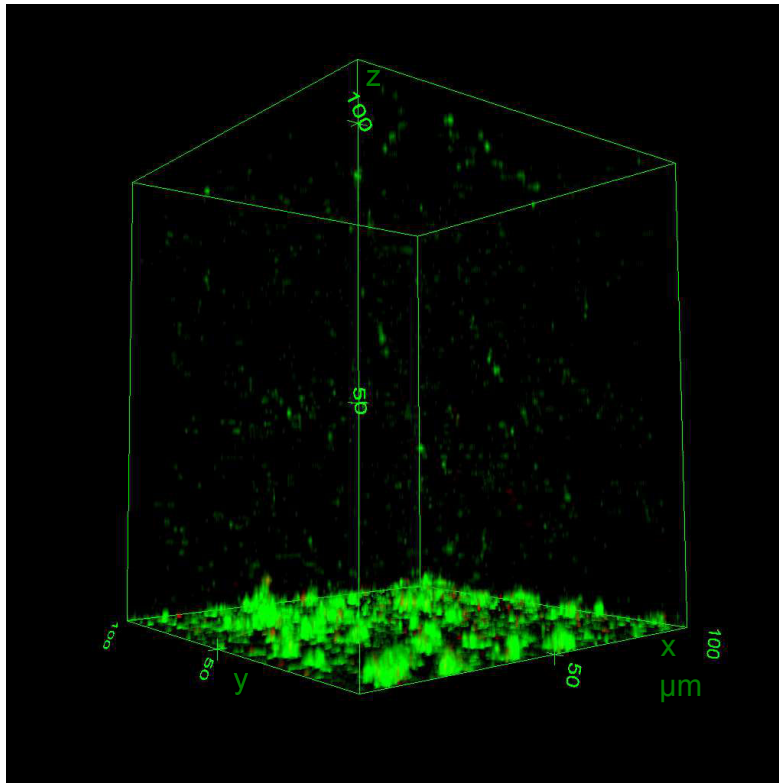
Comme déjà présenté dans les sections précédentes, la zone externe du biofilm est plutôt contrôlée par des actions hydrodynamiques (érosion et "sloughing"). Cette zone est également fortement influencée par la croissance de la partie interne. Ainsi, dans cette première analyse de la cinétique de croissance nous considérons uniquement la zone interne.

Dans cette section nous avons pris en compte les bactéries vivantes et mortes. Pour cela, nous avons d'abord calculé la moyenne statistique de la fraction volumique sur toutes les positions analysées et ensuite nous avons tracé le profil de la moyenne selon la hauteur ( $z$ ). La valeur de  $H_{int}$  a été calculé sur le profil  $\langle \bar{\phi} \rangle$ . Cette valeur est légèrement différente que ce qui est montré dans la tableau 6.4 mais reste du même ordre de grandeur. Pour l'expérience à plus fort cisaillement nous avons considéré la moyenne de la fraction volumique des deux jeux disponibles (expériences A et B).

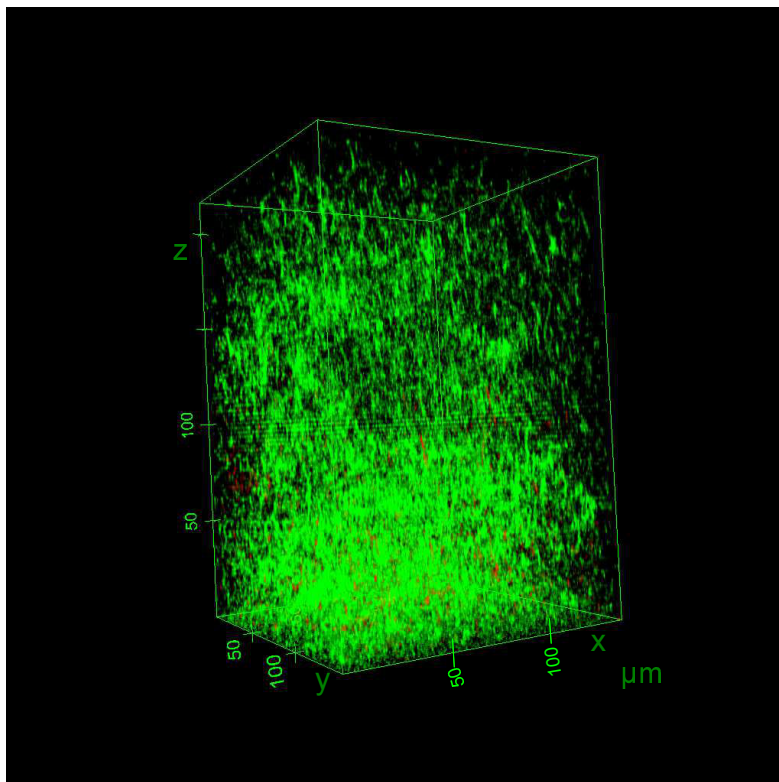
Nous avons tracé dans la figure 6.29.a la variation de  $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$  en fonction du temps de développement pour les deux conditions hydrodynamiques.

Nous observons que pour la partie plus dense du biofilm, les courbes présentent la même allure pour les deux cisaillements imposés.  $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$  augmente avec le temps, le profil est presque linéaire, sauf pour le biofilm développé avant  $24 h$ . L'augmentation de  $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$  apparaît plus vite pour le cas de fort cisaillement que le cas de faible cisaillement. Comme observé dans la section 6.4, la différence peut être expliquée par le fait que les états initiaux (colonisation), autrement dit le nombre de bactéries attachées, ne sont pas tous identiques d'une expérience à autre. Cela peut indiquer une possible influence de l'état initial sur le biofilm développé jusqu'à  $t = 24 h$ . Après  $24 h$  de développement, le biofilm semble perdre la mémoire des conditions initiales. Ainsi, nous pouvons comparer les expériences les unes avec les autres, même si elles n'ont pas été réalisées en continu. Nous n'avons pas les informations à propos du développement jusqu'à  $24 h$ , donc on ne peut pas juger de la perte de mémoire des conditions initiales dans cette phase de croissance. Ainsi, pour vérifier l'évolution du taux de croissance, nous avons considéré les temps entre  $24 h$  et  $72 h$  (Fig. 6.29.b).

Si on cherche à décrire l'évolution de  $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$  par un polynôme d'ordre deux, on peut constater que les coefficients devant le terme au carré sont très petits : on peut considérer que l'évolution de  $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$  est bien linéaire (Fig. 6.29.b).

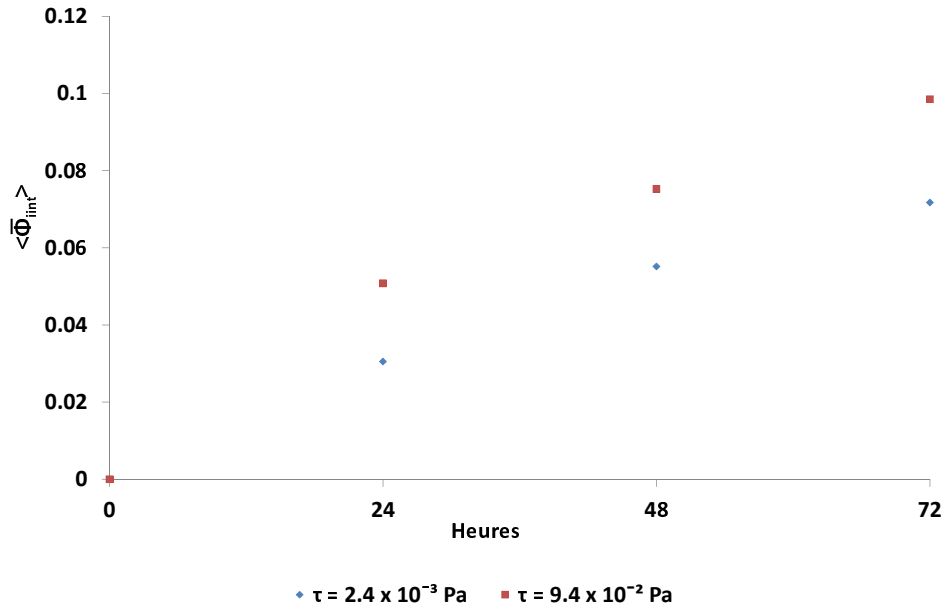


(a)

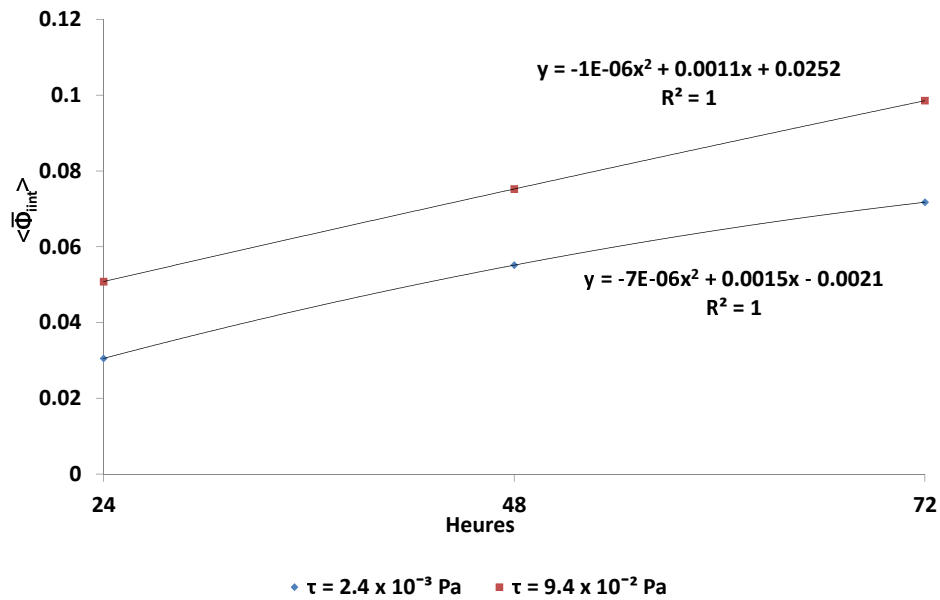


(b)

**Figure 6.28** – Biofilm âgé de 72 h : (a) Biofilm soumis à une contrainte de cisaillement de  $2.1 \times 10^{-3}$  Pa (b) Biofilm soumis à une contrainte de cisaillement de  $9.4 \times 10^{-2}$  Pa.

Cinétique de Croissance - Bactéries Vivantes et Mortes ( $\Phi_{int}$ )

(a)

Cinétique de Croissance - Bactéries Vivantes et Mortes ( $\Phi_{int}$ )

(b)

**Figure 6.29** – Courbes de cinétique de croissance pour la zone interne du biofilm ( $\phi_{int}$ ) pour les deux conditions hydrodynamiques employées :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa et  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa.



En considérant le modèle de cinétique de croissance présenté dans l'état d'art, l'équation (6.12) permet décrire la dynamique de la croissance bactérienne :

$$\frac{d\langle\bar{\phi}_{int}\rangle}{dt} = (\mu - b) \langle\bar{\phi}_{int}\rangle \quad (6.12)$$

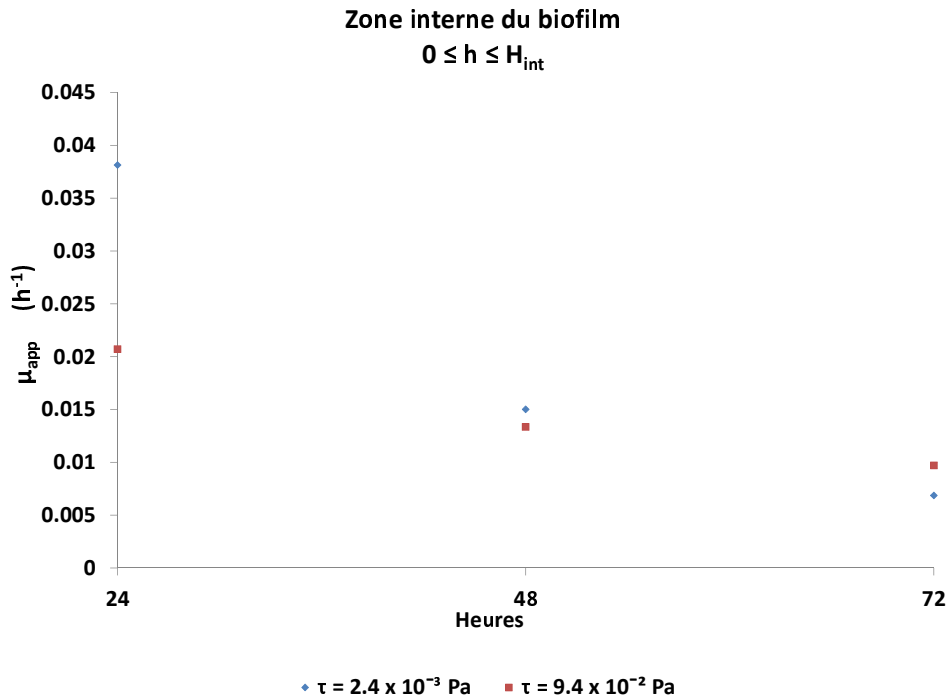
Où  $\langle\bar{\phi}_{int}\rangle$  est la fraction volumique en biomasse supposée proportionnelle au nombre de cellules;  $\mu$  le taux de croissance bactérienne [ $h^{-1}$ ],  $b$  le coefficient de mortalité [ $h^{-1}$ ] et  $t$  est le temps [ $h$ ].

Comme décrit auparavant, les analyses réalisées précédemment indiquent un possible processus de compétition entre la croissance bactérienne et une éventuelle quantité de biofilm détaché sous l'action de l'écoulement pour les deux zones du biofilm analysées (interne et externe).

Pour cela, nous considérons qu'un terme se référant au taux de détachement ( $K_d$ ) [ $h^{-1}$ ] intervient avec le taux de croissance pour le modèle de cinétique de croissance. Pour la suite, l'ensemble des termes " $\mu - b - K_d$ " sera appelé de  $\mu_{app}$  (taux de croissance apparent) :

$$\mu_{app} = \mu - b - K_d = \frac{d\langle\bar{\phi}_{int}\rangle}{dt} \frac{1}{\langle\bar{\phi}_{int}\rangle} \quad (6.13)$$

En calculant la dérivée temporelle de  $\langle\bar{\phi}_{int}\rangle$  à partir de l'équation de régression obtenue précédemment, il est possible d'obtenir le taux de croissance spécifique apparent. Ainsi, la figure 6.30 et le tableau 6.5 présentent des valeurs de ( $\mu_{app}$ ) pour la partie interne du biofilm pour les deux conditions hydrodynamiques employées.



**Figure 6.30** – Evolution  $\mu_{app}$  dans le temps pour la partie interne du biofilm développé dans les deux conditions hydrodynamiques employées :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa et  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa.

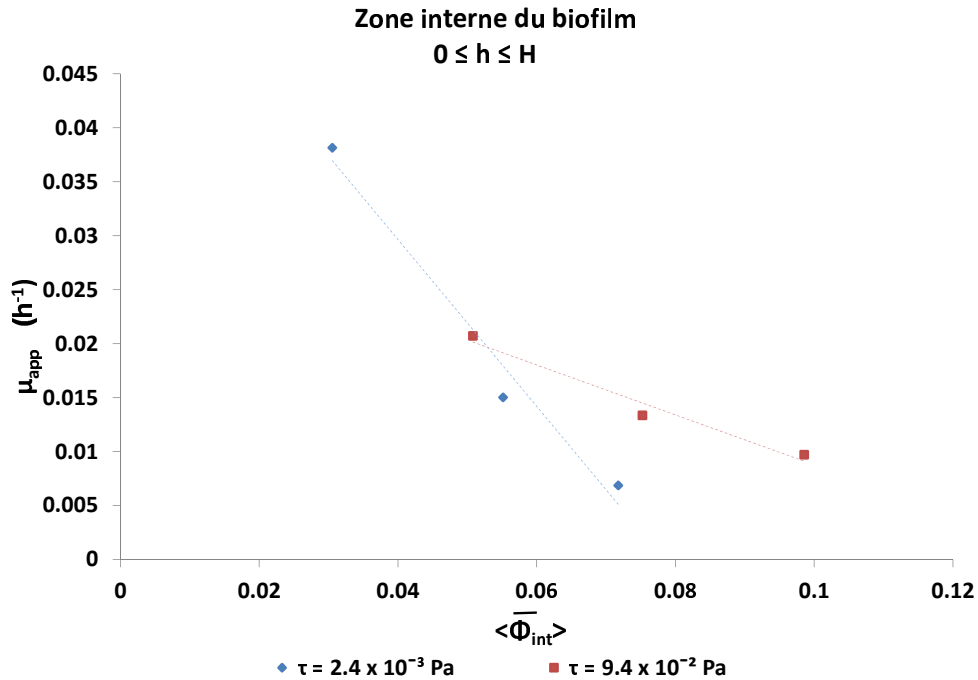
| Temps de développement<br>du biofilm<br>[h] | Partie interne $\mu_{app}$ [ $h^{-1}$ ] |                                     |
|---|---|-------------------------------------|
|   | $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$<br>Pa     | $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$<br>Pa |
| 24  | 0.038                                   | 0.021                               |
| 48  | 0.015                                   | 0.013                               |
| 72  | 0.007                                   | 0.010                               |

**Table 6.5** –  $\mu_{app}$  dans la partie interne du biofilm pour les deux conditions hydrodynamiques employées :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa et  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa.

On constate que la valeur du taux de croissance apparent  $\mu_{app}$  pour la zone interne du biofilm est largement inférieure à celle obtenue dans la culture libre ( $0.85 h^{-1}$ , tab. 3.1 du chapitre 3). Cet écart peut provenir des deux termes de la croissance  $\mu_{app}$  : le coefficient de mortalité et le taux de détachement. Comme indiqué dans la section 6.4, la fraction volumique des bactéries mortes est très inférieure à celle des bactéries vivantes (Fig. 6.14 et 6.15). De ce fait, nous pouvons ainsi considérer le terme  $b$  de l'équation comme négligeable.

Ceci suggère que le taux de croissance apparent est plutôt influencé par le détachement, qui lui-même est lié au taux de cisaillement local.

Des auteurs tels que Melo & Bott (1997); Peyton & Characklis (1993); Bryers (1987); Bakke *et al.* (1984); Rittman (1982) ont considéré des expressions mathématiques qui décrivent une influence de l'épaisseur du biofilm sur le taux de détachement. Ainsi, en supposant que  $\mu_{app}$  prend en compte également le taux de détachement, nous avons également tracé les courbes de la fraction volumique en fonction de  $\mu_{app}$  pour les deux conditions hydrodynamiques imposées (Fig. 6.31)



**Figure 6.31** – Evolution de  $\mu_{app}$  avec  $\phi_{int}$  pour les deux conditions hydrodynamiques employées :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa et  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa.

On perçoit que les deux cas étudiés suivent un comportement linéaire en  $\langle \bar{\phi}_{int} \rangle$  dans les in-

tervalles observés. Cependant, on remarque sur la figure 6.31 que pour les différentes conditions hydrodynamiques, les coefficients directeurs de la tendance linéaire des taux de croissance apparent sont très différents. Les expériences à plus faible cisaillement présentent une décroissance plus rapide de  $\mu_{app}$  avec la fraction volumique par rapport à l'expérience à plus fort cisaillement. Comme montré dans le chapitre l'état d'art (section 2.1.4), le milieu nutritif ou l'oxygène peuvent éventuellement devenir un facteur limitant de la vitesse spécifique de croissance. Le modèle le plus classiquement utilisé qui prend en compte cet effet est le modèle de Monod :

$$\mu = \mu_{max} \prod_{i=1}^i \frac{S_i}{K_{S_i} + S_i} \quad (6.14)$$

où  $S_i$  est la concentration du substrat  $i$  dans le milieu de culture,  $K_{S_i}$ , la constante de saturation pour le substrat  $i$ ,  $\mu_{max}$  le taux de croissance maximum et  $\mu$  le taux de croissance effectif.

Ainsi, la pente de la courbe plus prononcée pour les expériences à plus faible cisaillement peut indiquer une baisse de la disponibilité de milieu nutritif et d'oxygène dans le biofilm, en engendrant une réduction de la diffusion et des réactions à l'intérieur du biofilm.

## 6.7 Conclusion

Grâce à la mise en œuvre de méthodologies d'observation par microscopie confocale à l'aide de marquage fluorescent et de protocoles d'analyses adaptés aux différentes échelles explorées depuis les tailles micrométriques des bactéries jusqu'aux échelles millimétriques représentatives de la matrice solide continue du biofilm, des informations nouvelles ont été apportées sur les mécanismes spatio-temporels de croissance de biofilms.

Pour cela il a été dans un premier temps nécessaire de définir la valeur du coefficient de variation pour identifier l'aire élémentaire représentative des images permettant de caractériser correctement les propriétés de croissance du biofilm dans son ensemble. Les analyses ont mis en évidence qu'une surface correspondant à  $0.084 \text{ mm}^2$  est représentative du biofilm pour le paramètre fraction volumique, soit quatre images de taille de  $145.31 \mu\text{m} \times 145.31 \mu\text{m}$  prises à quatre positions différentes. Ce résultat montre que le nombre d'images acquises au cours des expériences présentées, sont significatives de la structure du biofilm. Ainsi, la fraction volumique moyenne peut être considérée comme représentative du biofilm.

Concernant l'éventuelle influence des bactéries adhérees à la partie supérieure de la chambre (en PDMS) sur les bactéries adhérees à la lamelle en verre, nous constatons que les possibles développements d'un biofilm sur le PDMS ne perturbent pas les conditions de croissance du biofilm sur la partie inférieure. Le milieu nutritif reste saturé en nutriment à cause du renouvellement rapide du milieu à l'échelle locale par rapport à l'échelle caractéristique de consommation par les bactéries.

En analysant les profils de fraction volumique, nous observons que, quelles que soient les expériences, une chute rapide de la fraction volumique se produit après les premiers

développements des couches du biofilm. Ainsi, nous avons décidé d'analyser le biofilm en discriminant deux zones différentes : une zone interne plus dense et une zone externe moins dense constituée d'une organisation filamenteuse.

Nous constatons que pour la partie dense du biofilm, les jeux de données A et B sont assez reproductibles. Pour la partie externe du biofilm, un plus grand écart de la fraction volumique à  $t = 72 h$  est observé. Cette variation semble être corrélée à des effets hydrodynamiques sur la partie supérieure du biofilm (détachement).

Nous avons vérifié la sensibilité de la formation du biofilm aux conditions initiales de colonisation en comparant la moyenne statistique de la fraction volumique des bactéries vivantes pour les deux jeux de données à plus fort cisaillement (les expériences A et B). Les deux zones analysées semblent perdre la mémoire des conditions initiales. Ainsi, cette perte de mémoire des conditions initiales, conjointement au protocole rigoureux d'inoculations initiales des bactéries, semble indiquer que les conditions d'ensemencement des chambres d'écoulement n'influencent pas la formation du biofilm.

En comparant les profils moyennés de la fraction volumique des bactéries vivantes et mortes, une quantité largement plus importante des bactéries vivantes est observée, et ce quelle que soit l'expérience analysée.

En comparant les deux conditions hydrodynamiques imposées, nous percevons que les biofilms soumis à un plus fort cisaillement présentent un biofilm plus compact dans la zone interne. Nous observons également une densification de la zone interne du biofilm avec le temps pour les deux cisaillements imposés.

En analysant la répartition spatiale du biofilm, nous constatons que d'une manière générale, les biofilms formés à un plus fort cisaillement présentent une plus grande hétérogénéité (partie interne et externe). Pour les deux conditions hydrodynamiques, une augmentation globale de la biomasse est perçue selon le temps d'observation pour la zone interne du biofilm, tandis qu'une réduction de la biomasse est constatée pour la zone externe à  $t = 72 h$  (expérience à plus faible cisaillement et expérience A à plus forte cisaillement). Ces expériences indiquent qu'un possible processus de détachement/érosion apparaît entre  $t = 48 h$  et  $t = 72 h$  avec une valeur critique de la fraction volumique supérieure aux valeurs mesurées à  $t = 48 h$ . Nous observons également que la zone externe présente une structure beaucoup plus hétérogène que celle de la zone interne, et ce quelle que soit la condition hydrodynamique imposée.

Nous nous sommes également intéressés à la cinétique de croissance du biofilm. Cependant, nous n'avons uniquement que quatre temps d'analyse. Ainsi, cette étude n'a pas pour but d'explorer précisément le développement complet du biofilm. Néanmoins, il permet d'apporter des tendances sur la croissance du biofilm. Pour cette étude, nous analysons uniquement la zone interne du biofilm.

Les courbes de l'évolution de la fraction volumique dans le temps pour les deux conditions hydrodynamiques imposées présentent la même allure. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer de manière précise la phase de développement du biofilm puisque les temps d'observation sont très courts. Ainsi, nous avons uniquement trois points de mesure du biofilm formé.

Nous avons calculé un taux de croissance apparent pour chaque expérience. Ce taux de croissance apparent ( $\mu_{app}$ ) comprend le taux de détachement, le taux de croissance et la mortalité du

biofilm. Nous percevons que les expériences à plus faible cisaillement présentent une décroissance plus rapide de  $\mu_{app}$  avec le temps et avec la fraction volumique par rapport à l'expérience à plus fort cisaillement. Nous observons également une pente de la courbe plus prononcée pour l'expérience à plus faible cisaillement.

En analysant la loi de Monod, les travaux montrent que cette pente peut indiquer une baisse de la disponibilité de milieu nutritif et d'oxygène dans le biofilm, en engendrant une réduction de la diffusion et réactions à l'intérieur du biofilm.



# Chapitre 7

## Conclusion

La motivation initiale de ce travail de recherche concerne l'optimisation de la biofiltration pour l'épuration biologique d'effluents liquides car elle dispose de nombreux avantages par rapport aux traitements à culture libre, comme par exemple sa géométrie plus compacte et la réduction sur la production des sous-produits.

Afin d'optimiser le fonctionnement de ces systèmes, il faut éviter un des obstacles majeurs à leur bon fonctionnement : leur colmatage rapide. Pour cela, il est nécessaire de maîtriser la croissance des biofilms, notamment par le biais de l'influence de l'hydrodynamique sur leur formation et leur structure. Ainsi, il est essentiel de comprendre les effets de l'hydrodynamique sur les propriétés de croissance à l'échelle bactérienne (échelle locale).

Notre travail s'est ainsi focalisé sur le développement d'une méthodologie complète afin d'étudier à l'échelle locale la croissance bactérienne de *Pseudomonas Putida* sous l'effet d'écoulements cisailés.

Les conditions hydrodynamiques choisies correspondaient à un nombre de Reynolds de l'ordre de 2 au maximum, ce qui correspond à l'ordre de grandeur des Reynolds de pore typiquement rencontrés dans les applications visées (Karrabi, 2009).

Notre apport principal a été le développement d'un protocole expérimental rigoureux et d'une méthodologie d'analyse permettant d'assurer le développement du biofilm, la reproductibilité des essais effectués et une interprétation non biaisée des résultats.

Pour cela, certaines démarches ont été mises en place en vue d'obtenir un protocole complet et systématique à chaque étape du déroulement des expériences : (i) préparation des cultures bactériennes et des systèmes d'écoulement, (ii) croissance du biofilm sous hydrodynamique contrôlée, (iii) observation du biofilm sous microscope confocal au moyen de fluorochromes et (iv) traitement d'images.

### **(i) Préparation des cultures bactériennes et systèmes d'écoulement**

Pour assurer que l'état métabolique des bactéries utilisées dans les expériences soit le plus stable possible, nous avons modifié le protocole standard utilisé jusque-là.

En particulier, (i) nous évitons la décongélation de la culture stock pour effectuer le prélèvement bactérien permettant la préparation de la culture bactérienne solide (en milieu LA) qui servira à l'inoculation des pré-cultures, et (ii) cette culture bactérienne solide n'est pas conservée pour être réutilisée, mais une nouvelle culture est préparée systématiquement à



chaque fois qu'une pré-culture est nécessaire. Cette dernière procédure minimise aussi certains risques de contamination. De même, pour éviter des effets de shift-down (passage d'un milieu riche à un milieu pauvre) et un stress bactérien, le milieu LB modifié sans peptone a été utilisé quelles que soient les étapes au cours des expériences (pré-culture, croissance du biofilm).

### **(ii) Croissance du biofilm sous hydrodynamique contrôlée**

Des développements spécifiques ont été réalisés pour la formation et l'observation du biofilm : système d'alimentation gravitaire à pression constante et chambres d'écoulement (Chambre en PMMA modifié et PDMS).

Des chambres d'écoulement ont été conçues afin de pouvoir développer un biofilm sous conditions hydrodynamiques contrôlées et permettre son observation sous microscope confocal. Ce nouveau design permet d'avoir une chambre plus stable sur la platine du microscope et ainsi d'obtenir des images sans décalage du plan focal. Les chambres en PDMS ont été aussi conçues pour pallier l'existence de contaminations sur la chambre PMMA (chambre non jetable). Une autre caractéristique de ces chambres est leur taille, avec une surface suffisamment grande pour garantir l'observation de la structure du biofilm sur une surface représentative, avec l'existence d'une zone d'observation à cisaillement contrôlé et uniforme. La validation des champs de vitesse dans ces deux chambres d'écoulement a été réalisée en comparant le résultat théorique avec les résultats de simulations numériques. Cette analyse montre que sur la zone d'observation (zone maximale :  $18 \times 12 \text{ mm}^2$  situé au milieu de chambre) de l'écoulement est bien de type laminaire 2D, avec un profil de vitesse parabolique (poiseuille), invariant selon le plan (x ; y).

### **(iii) Observation du biofilm sous microscope au moyen de fluorochromes**

Des tests ont été effectués afin de déterminer les marqueurs fluorescents à mettre en œuvre et leurs conditions d'utilisation pour l'observation du biofilm développé. Deux marqueurs des EPS ont été testés : ConcTetra et Conc647. Nous avons rencontré 3 difficultés majeures pour l'observation des EPS avec ces marqueurs : (1) la formation d'agrégats fluorescents, (2) l'identification du marquage des fluorochromes (sans repère comparatif sous lumière transmise) et (3) l'ajustement de la puissance du laser.

De ce fait, dans la suite du travail nous n'avons pas pu poursuivre l'objectif de l'observation des EPS. Les essais expérimentaux de ce travail de thèse se sont focalisés sur l'observation des bactéries vivantes (fluorochrome Syto9) et mortes (fluorochrome PI) à une concentration de  $2.0 \text{ ml}(\text{Syto9 ou PI})/L$ .

### **(iv) Traitement d'images**

Des outils de traitement et d'analyse d'image ont été mis en place en utilisant des bibliothèques de fonctions existantes (boîte à outil de Matlab dédiée au traitement d'images numériques), avec une attention particulière sur le choix des traitements réalisés et leur séquençement. Les étapes du traitement des images sont : formation et numérisation de l'image (sur microscope confocal), pré-traitement (Filtres "imbothat" et "imtophat"), segmentation (calcul du gradient : Filtre Sigma ; calcul du seuil : Méthode d'Otsu), post-traitement (ouverture morphologique) et analyse de l'image (surface occupée et nombre de bactéries).

Cependant la procédure de traitement présentée n'est que semi-automatique. Selon la structure et le degré de développement du biofilm, les conditions d'illumination varient d'une image à l'autre. Malgré les précautions prises au niveau du prétraitement (homogénéisation) et l'utilisation d'une procédure d'ajustement de la lumière sur le microscope confocal (système de compensation), il est difficile de trouver un seuil applicable à tout un jeu d'images de manière automatique. C'est pourquoi, après un premier traitement automatique, on a procédé systématiquement à un contrôle visuel, en comparant les images traitées aux images originales. Si l'opérateur juge que les images ne sont pas traitées correctement par l'algorithme, celles-ci ont été alors traitées à nouveau de façon "manuelle", en ajustant le seuil jusqu'à ce que l'on juge le traitement correct.

### **Résultat : L'état initial de colonisation**

La structure du biofilm, sur les temps courts, peut être dépendante des conditions initiales. Ainsi, afin de vérifier cette influence, nous avons analysé l'état initial de colonisation pour chaque expérience réalisée de développement du biofilm.

De ce fait, des essais préliminaires ont été réalisés au préalable pour analyser l'état initial de la colonisation de la lamelle inférieure des chambres d'écoulement (en terme de concentration surfacique, distribution spatiale ...) et vérifier sa reproductibilité.

En ce qui concerne la reproductibilité de la colonisation initiale nous constatons que les concentrations surfaciques initiales sont reproductibles pour les différents chambres analysées d'une même expérience, avec un écart relatif inférieur à 4%. La distribution initiale des bactéries sur la chambre d'écoulement quant à elle présente une tendance vers une hétérogénéité de l'ordre de 17 à 25%.

L'analyse précédente a aussi permis d'identifier certains facteurs importants à respecter pour obtenir une caractérisation non biaisée de la distribution initiale des bactéries sur la lamelle en verre. L'un d'entre eux est la qualité intrinsèque des images, qui dépend du réglage de le microscope confocal (exemple : planéité de la platine du microscope confocal). L'autre facteur est la durée pendant laquelle les bactéries sont en conditions statiques dans la mesure où, à la longue, on peut observer une remise en suspension des bactéries. Cela entraîne des contraintes sur le protocole expérimental lui-même dans la mesure où cela impose une limitation de temps entre la procédure d'inoculation des chambres d'écoulements en milieu stérile, leur analyse sous microscope confocal, puis le réglage et la mise en oeuvre d'un écoulement stabilisé pour effectuer la croissance du biofilm . Pour pallier cette difficulté, pour la suite du travail nous avons utilisé une seule chambre témoin pour chaque expérience pour l'analyse de l'état initial de colonisation.

### **Résultat : Développement du Biofilm**

Dans un premier temps, nous avons identifié l'aire élémentaire qui représente le comportement moyen de l'ensemble du biofilm en utilisant la valeur du coefficient de variation.

En moyennant les profils moyens de fraction volumique, nous avons constaté qu'une surface correspondant à  $0.084mm^2$  (quatre images de taille de  $145,31\mu m \times 145,31\mu m$ ) est représentative de l'ensemble du biofilm. On constate ainsi que le nombre d'images prises dans les expériences est représentatif de la structure du biofilm et que la fraction volumique moyenne peut être considérée comme représentative du biofilm.

Pour les expériences en chambre en PDMS, nous avons analysé aussi une éventuelle influence des bactéries adhérentes sur le PDMS (côté opposé à la lamelle en verre) sur les bactéries adhérentes sur la lamelle en verre. Nous constatons ainsi que la croissance du biofilm sur la partie inférieure (lamelle de verre) n'est pas perturbée par un possible développement de biofilms sur le PDMS : en effet le milieu nutritif reste saturé en nutriment à cause du renouvellement rapide du milieu à l'échelle locale (consommation des nutriments par les bactéries plus lente que le renouvellement du milieu).

Dans un second temps, nous avons ensuite analysé la structure du biofilm en nous intéressant aux courbes des profils de fraction volumique sur toutes les positions d'observation. On perçoit ainsi qu'une chute rapide de la fraction volumique se produit après les premières couches du biofilm. De ce fait, nous avons défini deux zones d'analyse du biofilm : une zone avec une concentration plus représentative du biofilm (zone interne) et une zone moins dense (zone externe).

La sensibilité de la formation du biofilm aux conditions initiales de colonisation a été vérifiée en comparant la moyenne statistique de la fraction volumique des bactéries vivantes pour les deux jeux de données à plus fort cisaillement (les expériences A et B). Nous constatons ainsi que pour la partie dense du biofilm, les jeux de données A et B sont assez reproductibles. Pour la partie externe du biofilm, on observe un plus grand écart, principalement au temps de formation du biofilm  $t = 72h$ . Cette variation semble être corrélée à des effets hydrodynamiques sur la partie supérieure du biofilm (processus possible de détachement). A la vue des données disponibles pour la caractérisation de la colonisation initiale du support de verre, nous constatons une possible perte de mémoire des conditions initiales pour la zone interne et externe du biofilm lorsque le temps de formation du biofilm augmente. Ce résultat semble indiquer que les conditions d'ensemencement des chambres d'écoulement n'influencent pas la formation du biofilm. Au niveau de la répartition des bactéries vivantes et mortes dans le biofilm, quelle que soit l'expérience analysée, les profils moyennés de la fraction volumique montrent une quantité largement plus importante de bactéries vivantes.

En analysant les moyennes des fractions volumiques (bactéries vivantes et mortes), nous constatons que les biofilms soumis au cisaillement le plus fort imposé dans cette étude présentent un biofilm plus compact dans la zone interne ainsi qu'une plus forte fraction volumique que dans la zone externe, et ceci même sur la faible gamme de Reynolds étudiée. Nous observons également une densification de la zone interne du biofilm avec le temps pour les deux cisaillements imposés.

Une analyse a également porté sur la répartition spatiale du biofilm. D'une manière générale, même sur la gamme relativement restreinte de niveau de cisaillement imposé, on constate déjà que, les biofilms formés à un plus fort cisaillement présentent une plus grande hétérogénéité (partie interne et externe). Pour les deux conditions hydrodynamiques, une augmentation globale de la biomasse est perçue selon le temps d'observation pour la zone interne du biofilm, tandis qu'une réduction de la biomasse à  $t = 72h$  est constatée pour la zone externe. En comparant les deux zones analysées, on perçoit que la zone externe présente une structure beaucoup plus hétérogène que celle de la zone interne. Ces résultats peuvent laisser penser qu'un processus de détachement/érosion apparaît entre  $t = 48 h$  et  $t = 72 h$  pour une valeur critique de la fraction volumique supérieure aux valeurs mesurées à  $t = 48 h$ , même si celle-ci n'a pas été quantifiée.

Nous avons porté également un premier regard sur la cinétique de croissance du biofilm afin

d'identifier une tendance du développement du biofilm en analysant les données disponibles (quatre temps d'analyse) sur la zone interne du biofilm. Nous constatons une évolution de la fraction volumique dans le temps, avec des courbes présentant la même allure pour les deux conditions hydrodynamiques. En tenant compte d'un possible processus de détachement présent sur les analyses de distribution spatiale, nous considérons que le taux de croissance calculé sur les courbes de l'évolution de la fraction volumique est un taux de croissance apparent ( $\mu_{app}$ ). Ainsi, ce taux de croissance apparent ( $\mu_{app}$ ) comprend le taux de détachement, le taux de croissance et la mortalité du biofilm. En observant les courbes de l'évolution du taux de croissance  $\mu_{app}$  avec le temps et avec la fraction volumique, on perçoit que les expériences à plus faible cisaillement présentent une décroissance plus prononcée que pour l'expérience à plus fort cisaillement. Cette pente peut indiquer une baisse de la disponibilité de milieu nutritif et d'oxygène dans le biofilm, en engendrant une réduction de la diffusion et des réactions à l'intérieur du biofilm.



## Chapitre 8

# Perspectives

Au final, ce travail a posé une première pierre permettant de mener à bien toutes les étapes menant de la culture d'un biofilm sous conditions contrôlées et reproductibles, de son analyse à l'échelle de la bactérie, jusqu'à la démarche permettant l'extraction de données quantitatives à une échelle supérieure (de l'ordre de quelques millimètres). Par exemple, nous avons pu quantifier la distribution spatiale de certains composants du biofilm, discuter son degré d'hétérogénéité et extraire une estimation du taux de croissance moyen apparent du biofilm aux échelles d'intérêt pour les applications visées.

Pour que ces quantités puissent être exploitées dans un modèle opérationnel à travers l'établissement de lois de fermeture (par exemple pour le taux de croissance apparent), les protocoles et méthodes mis au point dans ce travail doivent être exploités afin d'établir une base de donnée exhaustive.

En ce qui concerne le taux de croissance, si on travaille sur les valeurs moyennées spatialement dans la chambre d'écoulement, une partie de cet objectif est déjà réalisable à l'issue de notre travail si des données sont acquises sur un pas de temps plus court (inférieur à 24 h) et des temps de formation plus long du biofilm (supérieur à 72 h). Il s'agira de capturer de manière relativement fine les évolutions de la fraction volumique moyenne de certains composants du biofilm au cours du temps. La procédure adoptée dans la thèse (moyenne sur plusieurs positions d'observations dans la chambre) permet en effet déjà d'assurer la convergence statistique et une représentativité spatiale sur les valeurs moyennes (du moins pour la gamme de nombre de Reynolds et cisaillement ciblée).

Une investigation poussée du taux de croissance moyen apparent passe aussi par une procédure permettant de séparer le taux de croissance net des bactéries des processus d'érosion et de détachement. Si la procédure mise au point dans la thèse peut permettre d'estimer le gain ou la perte nette de matière en fonction des conditions opératoires entre deux instants d'observations (via l'évolution des profils moyens), la séparation des différents processus nécessite des mesures complémentaires. Une quantification de l'érosion continue du biofilm peut se mesurer par cytométrie de flux par exemple et est directement adaptable sur les chambres d'écoulements développées dans la thèse. Le détachement de "patch" entier de biofilm peut être plus difficile à capturer expérimentalement. Mais on peut imaginer que si la "résolution temporelle" est suffisante, la connaissance de la fraction volumique avant et après un détachement "brusque", ajoutée à une estimation du taux de croissance basé sur les résultats obtenus juste avant le processus

de détachement, permettent d'effectuer un bilan autorisant une telle quantification.

Relier le taux de croissance et de détachement aux conditions hydrodynamiques mais aussi à certains paramètres structurels (comme l'hétérogénéité spatiale du biofilm en termes de densité surfacique) est a priori possible aussi à la suite de notre travail. Cependant, dans ce cas-ci, il faut aussi s'assurer d'avoir suffisamment de réalisations à un temps d'observation fixé (ce qui n'a pas pu être réalisé, faute de temps, au cours de cette thèse) pour obtenir une estimation plus fiable de la variabilité de la distribution et de l'hétérogénéité spatiale du biofilm.

Dans tous les cas, un paramètre très limitant a été le temps nécessaire pour analyser les images. Un travail de développement devra être entrepris pour limiter les biais provenant d'un calcul automatique du seuil pour la binarisation des images (développement incluant peut être des procédures d'apprentissages) et accélérer les analyses.

Enfin, nous n'avons pas pu observer tous les composants du biofilm, l'utilisation de la Concaline n'ayant pas permis d'obtenir des résultats concluants. Une solution alternative, adaptée d'une méthode déjà utilisée en tomographie-X (Ittis *et al.* (2011)), pourrait être d'utiliser des micro-billes, qui puissent être observables sous microscope confocal. Cela permettrait de marquer les interfaces du biofilm et d'obtenir une visualisation discrète, même partielle, de la frontière exacte du biofilm, et d'aller plus loin dans sa description quantitative et la description de son évolution.

La thèse a aussi permis de développer une nouvelle technique pour fabriquer des systèmes micro-fluidiques adaptés aux problématiques faisant intervenir des bactéries mais qui n'avait jamais été appliquée sur des systèmes de "grande taille" (ce qui impliquait certaines contraintes à résoudre que l'on ne rencontre pas sur des canaux beaucoup plus petit, pour lesquels cette technique est traditionnellement employée). Des améliorations devront cependant être apportées au niveau de la fabrication de la chambre. Ainsi, si nous avons réussi à développer une chambre moulée en PDMS pour un système de taille importante, dans notre cas, la bactérie utilisée possède aussi une certaine affinité avec le polymère utilisé. Une amélioration doit donc être apportée afin de limiter l'adhésion à la zone de mesure (par un traitement de la surface après polymérisation par exemple).

Quoiqu'il en soit, ces systèmes de grande taille sont intéressants car, outre le fait de s'affranchir des effets de bords, ils autorisent à long terme des mesures complémentaires en plus de la quantification de propriétés du biofilms à partir d'images : mesure de vitesses par  $\mu$ -PIV dans la chambre d'écoulement colonisée par le biofilm, manipulation du biofilm par pince optique ( $\mu$ -rhéologie), mesures quantitatives (ADN, polysaccharides, ...). C'est à travers l'utilisation conjointe de ces différents types de mesures qu'il sera possible de mieux appréhender les couplages hydrodynamique-structuration du biofilm.

# Bibliographie

- AN, YUEHUEI. H., & FRIEDMAN, RICHARD J. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, **43**(3), 338–348.
- ANTHONY, P., GEINDREAU, CHRISTIAN, SÉCHET, PHILIPPE, & MARTINS, JEAN M.F. 2005. Biofilm growth in porous media : derivation of a macroscopic model from the physics at the pore scale via homogenization. *Pages 171–179 ISBN : 84–9749–163–7 of : Proceedings of the international Congress Biotechniques for air pollution control.*
- AUTY, M.A.E., GARDINER, G.E., MCBREARTY, S.J., & O’SULLIVAN, E.O. 2001. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(1), 420–425.
- BAHAR, OFIR, FUENTE, LEONARDO DE LA, & BURDMAN, SAUL. 2010. Assessing adhesion, biofilm formation and motility of *Acidovorax citrulli* using microfluidic flow chambers. *FEMS Microbiology Letters*, **312**(1), 33–39.
- BAKKE, R., TRULEAR, M. G., ROBINSON, J. A., & CHARACKLIS, W. G. 1984. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms : Steady state. *Biotechnology and Bioengineering*, **26**(12), 1418–1424.
- BAKKER, D. P., PLAATS, A. VAN DER, VERKERKE, G. J., BUSSCHER, H. J., & MEI, H. C. VAN DER. 2003. Comparison of Velocity Profiles for Different Flow Chamber Designs Used in Studies of Microbial Adhesion to Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(10), 6280–6287.
- BASSLER, BONNIE L. 1999. How bacteria talk to each other : regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, **2**(6), 582–587.
- BEAR, JACOB. 1972. *Dynamics of Fluids In Porous Media*. American Elsevier Publishing Company.
- BECKER, HOLGER, & GARTNER, CLAUDIA. 2000. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications. *Electrophoresis*, **21**(1), 12–26.
- BENOIT, MICHAEL R., CONANT, CAROLYN G., IONESCU-ZANETTI, CRISTIAN, SCHWARTZ, MICHAEL, & MATIN, A. 2010. New Device for High-Throughput Viability Screening of Flow Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(13), 4136–4142.



- BEYENAL, HALUK, LEWANDOWSKI, ZBIGNIEW, & HARKIN, GARY. 2004a. Quantifying biofilm structure : facts and fiction. *Biofouling*, **20**(1), 1–23.
- BEYENAL, HALUK, DONOVAN, CONRAD, LEWANDOWSKI, ZBIGNIEW, & HARKIN, GARY. 2004b. Three-dimensional biofilm structure quantification. *Journal of Microbiological Methods*, **59**(3), 395–413.
- BRIANDET, ROMAIN, FECHNER, LISE, NAITALI, MURIELLE, & DREANNO, CATHERINE. 2012. *Biofilms, quand les microbes s'organisent*. Editions Quae.
- BROVELLI, A., MALAGUERRA, F., & BARRY, D. A. 2009. Bioclogging in porous media : Model development and sensitivity to initial conditions. *Environmental Modelling & Software*, **24**(5), 611–626.
- BRYERS, JAMES D. 1987. Biologically Active Surfaces : Processes Governing the Formation and Persistence of Biofilms. *Biotechnology Progress*, **3**(2), 57–68.
- BUNTHOF, C.J., BLOEMEN, K., BREEUWER, P., ROMBOUTS, F.M., & ABEE, T. 2001. Flow cytometric assessment of viability of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(2326–2335).
- CALVET, RAOUL. 2003. *Le sol : propriétés et fonctions*. France Agricole Editions.
- CARRÉ, ALAIN, & MITTAL, KASH L. 2011. *Surface and Interfacial Aspects of Cell Adhesion*. CRC Press.
- CARVALHO, CARLA C. C. R., & FONSECA, M. MANUELA R. 2007. Assessment of three-dimensional biofilm structure using an optical microscope. *BioTechniques*, **42**(5), 616, 618–620.
- CERI, HOWARD, OLSON, MERLE, MORCK, DOUGLAS, STOREY, DOUGLAS, READ, RONALD, BURET, ANDRE, & OLSON, BARBARA. 2001. [25] The MBEC assay system : Multiple equivalent biofilms for antibiotic and biocide susceptibility testing. *Pages 377–385 of : DOYLE, RON J. (ed), Methods in Enzymology. Microbial Growth in Biofilms - Part B : Special Environments and Physicochemical Aspects*, vol. 337. Academic Press.
- CHARACKLIS, WILLIAM G. 1973. Attached microbial growth I. Attachment and growth. *Water Research*, **7**(8), 1113 – 1127.
- CHOPP, D. L., KIRISITS, M. J., MORAN, B., & PARSEK, M. R. 2002. A mathematical model of quorum sensing in a growing bacterial biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **29**(6), 339–346.
- CHOPP, D. L., KIRISITS, M. J., MORAN, B., & PARSEK, M. R. 2003. The dependence of quorum sensing on the depth of a growing biofilm. *Bulletin of Mathematical Biology*, **65**(6), 1053–1079.
- COSTERTON, J W, GEESEY, G G, & CHENG, K J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, **238**(1), 86–95.

- 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. *Annual Review of Microbiology*, **41**(1), 435–464.
- COSTERTON, J W, LEWANDOWSKI, Z, CALDWELL, D E, KORBER, D R, & LAPPIN-SCOTT, H M. 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review of Microbiology*, **49**(1), 711–745.
- DAS, THEERTHANKAR, SEHAR, SHAMA, & MANEFIELD, MIKE. 2013. The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, **5**(6), 778–786.
- DAVIT, Y., ILTIS, G., DEBENEST, G., VERAN-TISSOIRES, S., WILDENSCHILD, D., GERINO, M., & QUINTARD, M. 2011. Imaging biofilm in porous media using X-ray computed microtomography. *Journal of Microscopy*, **242**(1), 15–25.
- DONLAN, RODNEY M. 2002. Biofilms : Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, **8**(9), 881–890.
- DUDDU, RAVINDRA, CHOPP, DAVID L., & MORAN, BRIAN. 2009. A two-dimensional continuum model of biofilm growth incorporating fluid flow and shear stress based detachment. *Biotechnology and Bioengineering*, **103**(1), 92–104.
- EVANS, L. V. 2003. *Biofilms : Recent Advances in their Study and Control*. CRC Press.
- FLEMMING, HANS-CURT, NEU, THOMAS R., & WOZNIAK, DANIEL J. 2007. The EPS Matrix : The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology*, **189**(22), 7945–7947.
- GIVSKOV, MICHAEL, HENTZER, MORTEN, ERSBOLL, BJARNE KJAER, HEYDORN, ARNE, STERNBERG, CLAUS, NIELSEN, ALEX TOFTGAARD, & MOLIN, SOREN. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology*, **146**(10), 2395–2407.
- GOLFIER, FABRICE, WOOD, BRIAN D., ORGOGOZO, LAURENT, QUINTARD, MICHEL, & BUÈS, MICHEL. 2009. Biofilms in porous media : Development of macroscopic transport equations via volume averaging with closure for local mass equilibrium conditions. *Advances in Water Resources*, **32**(3), 463–485.
- GONZALEZ, RAFAEL C., WOODS, RICHARD E., & EDDINS, STEVEN L. 2003. *Digital Image Processing Using MATLAB*. Upper Saddle River, NJ : Pearson Prentice Hall.
- HAPPEL, JOHN, & BRENNER, HOWARD. 1965. *Low Reynolds number hydrodynamics : with special applications to particulate media*. Prentice-Hall.
- ILTIS, GABRIEL C., ARMSTRONG, RYAN T., JANSIK, DANIELLE P., WOOD, BRIAN D., & WILDENSCHILD, DORTHE. 2011. Imaging biofilm architecture within porous media using synchrotron-based X-ray computed microtomography. *Water Resources Research*, **47**(2), W02601.

- IVANKOVIC, T., DU ROSCOAT, S. ROLLAND, GEINDREAU, C., MARTINS, J.M.F., HUANG, Z., & SECHET, P. 2015. 3D Visualization and quantification of biofilm in porous media by x-ray tomography. *Page 2977 of : Congress of European Microbiologists*.
- JANAKIRAMAN, VIJAY, ENGLERT, DEREK, JAYARAMAN, ARUL, & BASKARAN, HARIHARA. 2009. Modeling Growth and Quorum Sensing in Biofilms Grown in Microfluidic Chambers. *Annals of Biomedical Engineering*, **37**(6), 1206–1216.
- JONES, HC, ROTH, IL, & SANDERS, WM. 1973. Electron Microscopic Study of a Slime Layer. *Journal of Bacteriology*, **99**, 316–325.
- KARRABI, SEYED MOHSEN. 2009. *Couplage hydrodynamique - biofilm en milieu poreux : application aux biofiltres*. Ph.D. thesis, Université de Grenoble.
- KATSIKOIANNI, M., & MISSIRLIS, Y. F. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells & Materials*, **8**, 37–57.
- KILDGAARD, JESPER, & ENGESGAARD, PETER. 2001. Numerical analysis of biological clogging in two-dimensional sand box experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*, **50**(3), 261–285.
- KUEHN, MARTIN, HAUSNER, MARTINA, BUNGARTZ, HANS-JOACHIM, WAGNER, MICHAEL, WILDERER, PETER A., & WUERTZ, STEFAN. 1998. Automated Confocal Laser Scanning Microscopy and Semiautomated Image Processing for Analysis of Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(11), 4115–4127.
- LECUYER, SIGOLENE, RUSCONI, ROBERTO, SHEN, YI, FORSYTH, ALISON, VLAMAKIS, HERA, KOLTER, ROBERTO, & STONE, HOWARD A. 2011. Shear Stress Increases the Residence Time of Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal*, **100**(2), 341–350.
- LEMONS, MADALENA, MERGULHÃO, FILIPE, MELO, LUÍS, & SIMÕES, MANUEL. 2015. The effect of shear stress on the formation and removal of *Bacillus cereus* biofilms. *Food and Bioproducts Processing*, **93**, 242–248.
- LERICHE, V., SIBILLE, P., & CARPENTIER, B. 2000. Use of an Enzyme-Linked Lectinsorbent Assay To Monitor the Shift in Polysaccharide Composition in Bacterial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(5), 1851–1856.
- LIU, YU, & TAY, JOO-HWA. 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, **36**(7), 1653–1665.
- LOPEZ, GARCIA, A, L., VEIGA, M. C., NOGUEIRA, R., APARICIO, A., & MELO, L. F. 2003. A technique using a membrane flow cell to determine average mass transfer coefficients and tortuosity factors in biofilms. *Water Science and Technology*, **47**(5), 61–67.
- MANN, ETHAN E., & WOZNIAC, DANIEL J. 2012. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiology Reviews*, **36**(4), 893–916.

- MARMOTTANT, PHILIPPE. 2001. *Atomisation d'un jet liquide par un courant gazeux*. Thèse, Institut National Polytechnique de Grenoble - INPG.
- MBAYE, SERIGNE. 2011. *Couplage hydrodynamique-biomasse dans les procédés de dépollution. Approche locale des mécanismes de croissance et d'adhésion/détachement de micro-organismes sur substrats solides*. Thèse, Université de Grenoble.
- MCDONALD, J. C., DUFFY, D. C., ANDERSON, J. R., CHIU, D. T., WU, H., SCHUELLER, O. J., & WHITESIDES, G. M. 2000. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, **21**(1), 27–40.
- MELO, L. F., & BOTT, T. R. 1997. Biofouling in water systems. *Experimental Thermal and Fluid Science*, **14**(4), 375–381.
- MEYER, ALPHONSE, DEIANA, JOSÉ, & BERNARD, ALAIN. 2004. *Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés*. Wolters Kluwer France.
- MEYER, MARIANA T., ROY, VARNIKA, BENTLEY, WILLIAM E., & GHODSSI, REZA. 2011. Development and validation of a microfluidic reactor for biofilm monitoring via optical methods. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **21**(5), 054023.
- MILLER, MELISSA B., & BASSLER, BONNIE L. 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **55**(1), 165–199.
- MITIK-DINEVA, NATASA, WANG, JAMES, TRUONG, VI KHANH, STODDART, PAUL, MALHERBE, FRANCOIS, CRAWFORD, RUSSELL J., & IVANOVA, ELENA P. 2009. Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Staphylococcus aureus attachment patterns on glass surfaces with nanoscale roughness. *Current Microbiology*, **58**(3), 268–273.
- MONROE, DON. 2007. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biol*, **5**(11), e307.
- ORGOGOZO, LAURENT, GOLFIER, FABRICE, BUÈS, MICHEL, & QUINTARD, MICHEL. 2010. Upscaling of transport processes in porous media with biofilms in non-equilibrium conditions. *Advances in Water Resources*, **33**(5), 585–600.
- OTSU, NOBUYUKI. 1979. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics*, **9**(1), 62–66.
- PALLERONI, N. J. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins.
- PAOLOZZI, LUCIANO. 2015. *Microbiologie*. Dunod.
- PARDO, M.T., & GUADALIX, M.E. 1996. Zinc sorption-desorption by two anepts : effect of pH and support medium. *European Journal of Soil Science*, **47**(June), 257–263.
- PARK, AERI, JEONG, HEON-HO, LEE, JINTAE, KIM, KEUN PIL, & LEE, CHANG-SOO. 2011. Effect of shear stress on the formation of bacterial biofilm in a microfluidic channel. *Biochip Journal*, **5**(3), 236–241.

- PEREIRA, M. O., KUEHN, MARTIN, WUERTZ, STEFAN, NEU, THOMAS, & MELO, L. F. 2002. Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Lett. Appl. Microbiol.*, **78**(2), 164–171.
- PEYTON, BRENT M., & CHARACKLIS, W. G. 1993. A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear stress on the kinetics of biofilm detachment. *Biotechnology and Bioengineering*, **41**(7), 728–735.
- PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M. C., & HEIJNEN, J. J. 2000a. Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation : a two-dimensional modeling study. *Biotechnology and Bioengineering*, **69**(5), 504–515.
- PICIOREANU, C., VAN LOOSDRECHT, M. C., & HEIJNEN, J. J. 2000b. Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation : a two-dimensional modeling study. *Biotechnology and Bioengineering*, **69**(5), 504–515.
- PICIOREANU, CRISTIAN, VAN LOOSDRECHT, MARK C. M., & HEIJNEN, JOSEPH J. 2000c. A theoretical study on the effect of surface roughness on mass transport and transformation in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, **68**(4), 355–369.
- PICIOREANU, CRISTIAN, VAN LOOSDRECHT, MARK C. M., & HEIJNEN, JOSEPH J. 2001. Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnology and Bioengineering*, **72**(2), 205–218.
- POWER, LAURA, ITIER, SOPHIE, HAWTON, MARGARET, & SCHRAFT, HEIDI. 2007. Time lapse confocal microscopy studies of bacterial adhesion to self-assembled monolayers and confirmation of a novel approach to the thermodynamic model. *Langmuir*, **23**(10), 5622–5629.
- QI, PEI-SHI, WANG, WEN-BIN, & QI, ZHENG. 2008. Effect of Shear Stress on Biofilm Morphological Characteristics and the Secretion of Extracellular Polymeric Substances. *Pages 3438–3441 of : The 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2008. ICBBE 2008.*
- RICHTER, LUKAS, STEPPER, CHRISTOPH, MAK, ANDY, REINTHALER, ALESSA, HEER, RUDOLF, KAST, MICHAEL, BRUCKL, HUBERT, & ERTL, PETER. 2007. Development of a microfluidic biochip for online monitoring of fungal biofilm dynamics. *Lab on a Chip*, **7**(12), 1723–1731.
- RITTMAN, BRUCE E. 1982. The effect of shear stress on biofilm loss rate. *Biotechnology and Bioengineering*, **24**(2), 501–506.
- ROCHEX, A, LECOUTURIER, D, PEZRON, I, & LEBEAULT, J-M. 2004. Adhesion of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine to cellulose fibres. *Applied microbiology and biotechnology*, **65**(6), 727–733. PMID : 15095025.
- ROLLAND DU ROSCOAT, S., MARTINS, J.M.F., SECHET, P., VINCE, E., LATIL, P., & GEINDREAU, C. 2014. Application of synchrotron X-ray microtomography for visualizing bacterial

- biofilms 3D microstructure in porous media. *Biotechnology and Bioengineering*, **111**(6), 1265–1271.
- RUPPRECHT, PETER, GOLÉ, LAURENT, RIEU, JEAN-PAUL, VEZY, CYRILLE, FERRIGNO, ROSARIA, MERTANI, HICHEM C., & RIVIÈRE, CHARLOTTE. 2012. A tapered channel microfluidic device for comprehensive cell adhesion analysis, using measurements of detachment kinetics and shear stress-dependent motion. *Biomicrofluidics*, **6**(1), 014107.
- RUSCONI, ROBERTO, LECUYER, SIGOLENE, GUGLIELMINI, LAURA, & STONE, HOWARD A. 2010. Laminar flow around corners triggers the formation of biofilm streamers. *Journal of The Royal Society Interface*, **7**(50), 1293–1299.
- RUSCONI, ROBERTO, LECUYER, SIGOLENE, AUTRUSSON, NICOLAS, GUGLIELMINI, LAURA, & STONE, HOWARD A. 2011. Secondary Flow as a Mechanism for the Formation of Biofilm Streamers. *Biophysical Journal*, **100**(6), 1392–1399.
- RUSS, JOHN C. 2011. *The Image Processing Handbook, Sixth Edition*. 6 edition edn. Boca Raton, Fla. : CRC Press.
- SHERWOOD, LINDA M., WILLEY, JOANNE M., & WOOLVERTON, CHRISTOPHER J. 2010. *Microbiologie*. De Boeck.
- SIMÕES, MANUEL, PEREIRA, MARIA O., SILLANKORVA, SANNA, AZEREDO, JOANA, & VIEIRA, MARIA J. 2007. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. *Biofouling*, **23**(4), 249–258.
- SOILLE, PIERRE. 1999. *Morphological Image Analysis : Principles and Applications*. Springer.
- STEWART, PHILIP S. 2003. Diffusion in Biofilms. *Journal of Bacteriology*, **185**(5), 1485–1491.
- STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D. G., & COSTERTON, J. W. 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, **56**(1), 187–209.
- STOODLEY, PAUL, LEWANDOWSKI, ZBIGNIEW, BOYLE, JOHN D., & LAPPIN-SCOTT, HILARY M. 1999. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear : An in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnology and Bioengineering*, **65**(1), 83–92.
- TABELING, P. 2003. *Introduction à la microfluidique*. Belin.
- TAYLOR, STEWART W., & JAFFÉ, PETER R. 1990. Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium : 3. Dispersivity and model verification. *Water Resources Research*, **26**(9), 2171–2180.
- TAYLOR, STEWART W., MILLY, P. C. D., & JAFFÉ, PETER R. 1990. Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium : 2. Permeability. *Water Resources Research*, **26**(9), 2161–2169.



- TEITZEL, GAIL M., & PARSEK, MATTHEW R. 2003. Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(4), 2313–2320.
- TSAI, YUNG-PIN. 2005. Impact of flow velocity on the dynamic behaviour of biofilm bacteria. *Biofouling*, **21**(5), 267–277.
- VEYSSEYRE, RENEE. 2006. *Aide-mémoire de statistique et probabilités pour l'ingénieur - 2ème édition*. Dunod.
- VIEIRA, MARIA JOÃO, MELO, LUIS F., & PINHEIRO, MARIA MANUELA. 1993. Biofilm formation : Hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling*, **7**(1), 67–80.
- VROUWENVELDER, J. S., BUITER, J., RIVIERE, M., VAN DER MEER, W. G. J., VAN LOOSDRECHT, M. C. M., & KRUIHOF, J. C. 2010. Impact of flow regime on pressure drop increase and biomass accumulation and morphology in membrane systems. *Water Research*, **44**(3), 689–702.
- WAGNER, MICHAEL, MANZ, BERTRAM, VOLKE, FRANK, NEU, THOMAS R., & HORN, HARALD. 2010. Online assessment of biofilm development, sloughing and forced detachment in tube reactor by means of magnetic resonance microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, **107**(1), 172–181.
- WHITESIDES, GEORGE M. 2006. The origins and the future of microfluidics. *Nature*, **442**, 368–373.
- WINGENDER, JOST, NEU, THOMAS R., & FLEMMING, HANS-CURT. 1999. *Microbial extracellular polymeric substances : characterization, structure, and function*. Springer.
- XAVIER, J. B., WHITE, D. C., & ALMEIDA, J. S. 2003. Automated biofilm morphology quantification from confocal laser scanning microscopy imaging. *Water Science and Technology : A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, **47**(5), 31–37.
- YANG, X., BEYENAL, H., HARKIN, G., & LEWANDOWSKI, Z. 1999. Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, **39**(2), 109–119.
- YANG, XINMIN, BEYENAL, HALUK, HARKIN, GARY, & LEWANDOWSKI, ZBIGNIEW. 2001. Evaluation of biofilm image thresholding methods. *Water Research*, **35**(5), 1149–1158.
- ZOBELL, C. E. 1943. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*, **46**, 39–56.

# Annexes





# Annexe A

## Protocole : Chambre d'écoulement en PDMS

### Fabrication du moule

#### Principales Matériels

- Wafer de silicium
- Masque optique (dessin du système microfluidique)
- Solvant PGMEA (2-methoxy-1-methylethylacetate)
- Résine photosensible : *SU8* (*GM1075*, Gersteltec Sarl)

#### Protocole (méthode : Photolithographie)

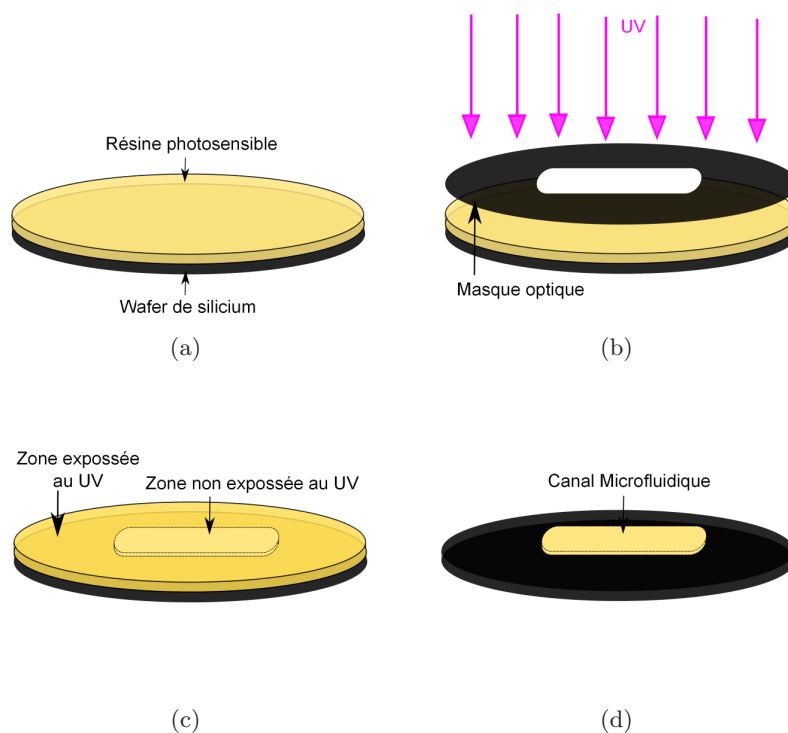
Les étapes pour la préparation du moule pour la chambre en PDMS ont été réalisées en salle blanche.

La résine est étalée sur un support plat (wafer de silicium) par la méthode dite de “l'enduction centrifuge” (spin coating), avec la déposition d'une couche mince et uniforme de résine. A cette étape la hauteur des canaux est établie.

Après l'étalement de la résine sur le support et quelques étapes de chauffage, la résine se durcit (figure [A.1.a](#)).

Le masque optique avec les motifs du canal microfluidique est posé sur la résine. L'ensemble est exposé aux rayonnements UV (l'insolation). Seules les parties représentant les canaux sont exposées aux UV, les autres parties du moule sont protégées par le masque (figure [A.1.b](#)). La résine *SU8* est une résine négative, ainsi le rayonnement ultraviolet entraîne une polymérisation des zones exposées, conférant ainsi à ces zones une résistance particulière au solvant (figure [A.1.c](#)). Ensuite le moule est plongé dans un solvant qui détruit toutes les zones de résine qui n'ont pas été exposées aux UV (solvant PGME). Ainsi, on obtient une image négative du canal microfluidique qui constitue un moule (figure [A.1.d](#)).

Ce moule est placé dans le four à 140°C pendant 2 heures.



**Figure A.1** – Etapes de la fabrication du moule pour la chambre d’écoulement en PDMS

## Fabrication du système microfluidique en PDMS

### Principales Matériels

- L’élastomère PDMS Sylgard 184 (Dow Corning) avec 2 composantes : PDMS et l’agent réticulant (Corning 184)
- Scalpel
- Tube pour perçage (aiguille meulée)
- Lamelle en verre

### Protocole

Après la fabrication du moule du canal microfluidique, la seconde étape consiste à étaler le PDMS sur le moule. Ce polymère va adopter parfaitement la forme du canal et puis durcir avec l’augmentation de la température. La manipulation du PDMS se fera sous hotte à flux laminaire.

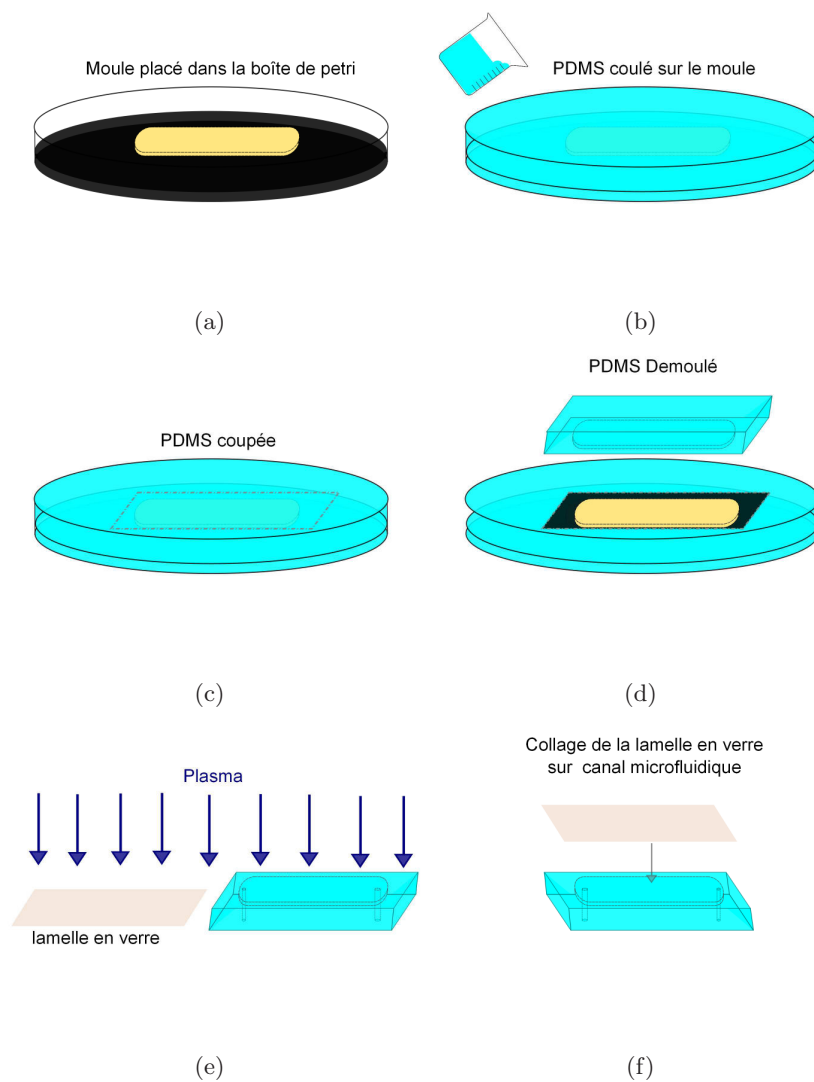
Le moule est placé dans une boîte de pétri afin que le PDMS coulé puisse être enfermé sur le moule (figure A.2.a). Dans un béccher le PDMS est mélangé avec l’agent réticulant dans une proportion en masse de l’ordre 10 : 1. La solution doit être bien mélangée, dégazée, et puis coulée sur le moule. (figure A.2.b). Le tout est placé au four pour au moins deux heures pour permettre la réticulation. Après le durcissement du PDMS celui est coupé et démoulé à l’aide d’un scalpel (figure A.2.c et .d).

Par la suite, des canaux d’injection des fluides seront créés par perçage.

Le PDMS avec les empreintes du canal doit être collé sur un support. Ce support est cou-

ramment une surface de verre, ou le PDMS lui même. Dans notre cas nous avons utilisé une lamelle en verre (hydrophile, d'angle de contact de  $37^\circ$ ).

Les deux surfaces (PDMS et lamelle en verre) sont collées à l'aide d'un traitement plasma. L'exposition au plasma est d'environ 30 secondes, ce qui va permettre d'activer les deux surfaces. En effet le plasma permet l'oxydation des deux surfaces, ce qui leurs permet de se coller entre elles facilement de façon irréversible (figure A.2.e et .f).



**Figure A.2** – Étapes de la fabrication de la chambre d'écoulement en PDMS



## Annexe B

# Résultat de l'essai de la reproductibilité de l'état Initial

### Essai 1 Chambre 1.1

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 19117           | 699   |
| $P2$     | 22141           | 744   |
| $P3$     | 17072           | 652   |
| $P4$     | 21349           | 675   |
| $P5$     | 18419           | 630   |
| $P6$     | 22108           | 810   |
| $P7$     | 21758           | 843   |
| $P8$     | 20837           | 868   |
| $P9$     | 20541           | 800   |
| $P10$    | 22040           | 861   |
| $P11$    | 16845           | 669   |
| $P12$    | 26272           | 1084  |
| $P13$    | 23832           | 977   |
| $P14$    | 11279           | 462   |
| $P15$    | 15305           | 609   |
| $P16$    | 20261           | 750   |
| $P17$    | 21483           | 854   |
| $P18$    | 21301           | 802   |
| $P19$    | 21896           | 920   |
| $P20$    | 37345           | 1343  |
| $P21$    | 22213           | 869   |
| $P22$    | 28799           | 1108  |
| $P23$    | 15310           | 662   |
| $P24$    | 15066           | 620   |
| $P25$    | 21719           | 934   |
| $P26$    | 20193           | 868   |
| $P27$    | 19546           | 784   |
| $P28$    | 32161           | 1414  |
| TOTAL    | 596208          | 22509 |
| MOYENNE  | 21293           | 804   |

**Table B.1** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 1 Chambre 1.1. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 1 Chambre 1.2

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 20777           | 816   |
| $P2$     | 22008           | 763   |
| $P3$     | 29369           | 1188  |
| $P4$     | 39685           | 1647  |
| $P5$     | 27051           | 1102  |
| $P6$     | 25050           | 1033  |
| $P7$     | 24069           | 1001  |
| $P8$     | 37319           | 1489  |
| $P9$     | 14916           | 617   |
| $P10$    | 28798           | 1133  |
| $P11$    | 37792           | 1540  |
| $P12$    | 18296           | 719   |
| $P13$    | 33784           | 1429  |
| $P14$    | 19303           | 824   |
| $P15$    | 10916           | 447   |
| $P16$    | 11991           | 507   |
| $P17$    | 28449           | 1189  |
| $P18$    | 24644           | 1032  |
| $P19$    | 16358           | 700   |
| $P20$    | 32286           | 1359  |
| $P21$    | 30382           | 1324  |
| $P22$    | 47974           | 1902  |
| $P23$    | 19505           | 796   |
| $P24$    | 23748           | 954   |
| $P25$    | 23852           | 1040  |
| $P26$    | 6212            | 269   |
| $P27$    | 15330           | 647   |
| $P28$    | 23465           | 1007  |
| TOTAL    | 693329          | 28474 |
| MOYENNE  | 24762           | 10167 |

**Table B.2** – Résultat des traitements des images pour l’essai de la reproductibilité de l’état initial :Essai 1 Chambre 1.2. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 2 Chambre 2.1

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 19105           | 662   |
| $P2$     | 13915           | 473   |
| $P3$     | 16664           | 575   |
| $P4$     | 18646           | 625   |
| $P5$     | 18484           | 625   |
| $P6$     | 17210           | 611   |
| $P7$     | 17985           | 624   |
| $P8$     | 22318           | 721   |
| $P9$     | 16093           | 648   |
| $P10$    | 16393           | 538   |
| $P11$    | 17250           | 615   |
| $P12$    | 14215           | 506   |
| $P13$    | 13184           | 472   |
| $P14$    | 16300           | 593   |
| $P15$    | 14124           | 426   |
| $P16$    | 9683            | 351   |
| $P17$    | 10146           | 378   |
| $P18$    | 10601           | 385   |
| $P19$    | 10817           | 403   |
| $P20$    | 13785           | 494   |
| $P21$    | 14050           | 509   |
| $P22$    | 13566           | 485   |
| $P23$    | 11661           | 411   |
| $P24$    | 9428            | 381   |
| $P25$    | 9993            | 402   |
| $P26$    | 9282            | 354   |
| $P27$    | 9210            | 388   |
| $P28$    | 10915           | 426   |
| TOTAL    | 395023          | 14081 |
| MOYENNE  | 14108           | 503   |

**Table B.3** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 2 Chambre 2.1. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.



## Essai 2 Chambre 2.2

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 27604           | 924   |
| $P2$     | 26516           | 886   |
| $P3$     | 19525           | 633   |
| $P4$     | 20076           | 699   |
| $P5$     | 21039           | 705   |
| $P6$     | 20990           | 725   |
| $P7$     | 16412           | 552   |
| $P8$     | 25872           | 878   |
| $P9$     | 14638           | 525   |
| $P10$    | 11882           | 455   |
| $P11$    | 10525           | 423   |
| $P12$    | 9013            | 350   |
| $P13$    | 10509           | 375   |
| $P14$    | 17334           | 654   |
| $P15$    | 24113           | 865   |
| $P16$    | 14550           | 557   |
| $P17$    | 10905           | 453   |
| $P18$    | 10672           | 439   |
| $P19$    | 8437            | 364   |
| $P20$    | 6256            | 273   |
| $P21$    | 5086            | 197   |
| $P22$    | 11820           | 431   |
| $P23$    | 6883            | 268   |
| $P24$    | 6522            | 273   |
| $P25$    | 10244           | 439   |
| $P26$    | 7233            | 318   |
| $P27$    | 7268            | 300   |
| $P28$    | 8373            | 341   |
| TOTAL    | 390297          | 14302 |
| MOYENNE  | 13939           | 511   |

**Table B.4** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 2 Chambre 2.2. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 2 Chambre 2.3

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 8175            | 360   |
| $P2$     | 7299            | 326   |
| $P3$     | 7407            | 329   |
| $P4$     | 7899            | 343   |
| $P5$     | 6202            | 288   |
| $P6$     | 6748            | 306   |
| $P7$     | 8971            | 384   |
| $P8$     | 9113            | 355   |
| $P9$     | 13809           | 584   |
| $P10$    | 13959           | 589   |
| $P11$    | 14019           | 583   |
| $P12$    | 13652           | 588   |
| $P13$    | 11224           | 496   |
| $P14$    | 11709           | 509   |
| $P15$    | 10198           | 404   |
| $P16$    | 13071           | 558   |
| $P17$    | 12822           | 563   |
| $P18$    | 13703           | 566   |
| $P19$    | 14608           | 613   |
| $P20$    | 14065           | 584   |
| $P21$    | 10369           | 444   |
| $P22$    | 5282            | 240   |
| $P23$    | 14416           | 589   |
| $P24$    | 14689           | 607   |
| $P25$    | 15951           | 641   |
| $P26$    | 14788           | 648   |
| $P27$    | 14596           | 633   |
| $P28$    | 7868            | 378   |
| TOTAL    | 316612          | 13508 |
| MOYENNE  | 11308           | 482   |

**Table B.5** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 2 Chambre 2.3. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 3 Chambre 3.2

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 16762           | 688   |
| $P2$     | 20523           | 761   |
| $P3$     | 21866           | 815   |
| $P4$     | 19098           | 744   |
| $P5$     | 16856           | 659   |
| $P6$     | 18009           | 736   |
| $P7$     | 19733           | 883   |
| $P8$     | 16646           | 712   |
| $P9$     | 16242           | 635   |
| $P10$    | 16241           | 700   |
| $P11$    | 14981           | 616   |
| $P12$    | 16346           | 668   |
| $P13$    | 16716           | 696   |
| $P14$    | 15418           | 704   |
| $P15$    | 14023           | 608   |
| $P16$    | 13504           | 590   |
| $P17$    | 13344           | 597   |
| $P18$    | 14320           | 632   |
| $P19$    | 10784           | 495   |
| $P20$    | 11240           | 498   |
| $P21$    | 12012           | 484   |
| $P22$    | 12897           | 567   |
| $P23$    | 10485           | 472   |
| $P24$    | 12587           | 588   |
| $P25$    | 10842           | 499   |
| $P26$    | 10838           | 521   |
| $P27$    | 10238           | 481   |
| $P28$    | 10009           | 447   |
| $P29$    | 9124            | 417   |
| $P30$    | 7690            | 410   |
| $P31$    | 6209            | 283   |
| $P32$    | 6055            | 278   |
| $P33$    | 6867            | 301   |
| $P34$    | 7633            | 327   |
| $P35$    | 8112            | 355   |
| TOTAL    | 464250          | 19867 |
| MOYENNE  | 13264           | 568   |

**Table B.6** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 3 Chambre 3.2. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 3 Chambre 3.3

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 10621           | 483   |
| $P2$     | 7840            | 401   |
| $P3$     | 7947            | 377   |
| $P4$     | 7733            | 352   |
| $P5$     | 8166            | 369   |
| $P6$     | 11936           | 490   |
| $P7$     | 9903            | 457   |
| $P8$     | 23180           | 913   |
| $P9$     | 14515           | 693   |
| $P10$    | 14022           | 683   |
| $P11$    | 13058           | 612   |
| $P12$    | 14819           | 729   |
| $P13$    | 15039           | 729   |
| $P14$    | 14044           | 686   |
| $P15$    | 19085           | 719   |
| $P16$    | 11359           | 533   |
| $P17$    | 14616           | 689   |
| $P18$    | 12775           | 616   |
| $P19$    | 15144           | 729   |
| $P20$    | 14297           | 707   |
| $P21$    | 11034           | 563   |
| $P22$    | 8156            | 330   |
| $P23$    | 12025           | 582   |
| $P24$    | 14877           | 733   |
| $P25$    | 15344           | 758   |
| $P26$    | 13332           | 626   |
| $P27$    | 13710           | 637   |
| $P28$    | 11401           | 550   |
| $P29$    | 5683            | 279   |
| $P30$    | 12060           | 600   |
| $P31$    | 13509           | 659   |
| $P32$    | 13660           | 656   |
| $P33$    | 10938           | 539   |
| $P34$    | 10069           | 505   |
| $P35$    | 7669            | 362   |
| TOTAL    | 433566          | 20346 |
| MOYENNE  | 12388           | 581   |

**Table B.7** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 3 Chambre 3.3. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 3 Chambre 3.4

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 5703            | 346   |
| $P2$     | 12500           | 598   |
| $P3$     | 10637           | 555   |
| $P4$     | 8223            | 427   |
| $P5$     | 8854            | 463   |
| $P6$     | 9074            | 481   |
| $P7$     | 11404           | 614   |
| $P8$     | 9218            | 525   |
| $P9$     | 25272           | 1002  |
| $P10$    | 16539           | 946   |
| $P11$    | 12098           | 759   |
| $P12$    | 10756           | 728   |
| $P13$    | 14263           | 804   |
| $P14$    | 14790           | 794   |
| $P15$    | 11384           | 642   |
| $P16$    | 12552           | 667   |
| $P17$    | 10196           | 634   |
| $P18$    | 12133           | 733   |
| $P19$    | 13630           | 835   |
| $P20$    | 14355           | 730   |
| $P21$    | 14318           | 743   |
| $P22$    | 10644           | 580   |
| $P23$    | 6543            | 355   |
| $P24$    | 10695           | 673   |
| $P25$    | 12367           | 698   |
| $P26$    | 12727           | 741   |
| $P27$    | 14195           | 751   |
| $P28$    | 12337           | 632   |
| $P29$    | 12627           | 729   |
| $P30$    | 8511            | 466   |
| $P31$    | 10686           | 519   |
| $P32$    | 10978           | 554   |
| $P33$    | 11400           | 553   |
| $P34$    | 9870            | 479   |
| $P35$    | 10226           | 577   |
| TOTAL    | 411705          | 22333 |
| MOYENNE  | 11763           | 638   |

**Table B.8** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 3 Chambre 3.4. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 4 Chambre 4.1

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 20948           | 867   |
| $P2$     | 17013           | 703   |
| $P3$     | 23176           | 1013  |
| $P4$     | 20532           | 819   |
| $P5$     | 17723           | 827   |
| $P6$     | 16810           | 781   |
| $P7$     | 16579           | 714   |
| $P8$     | 25416           | 943   |
| $P9$     | 17542           | 739   |
| $P10$    | 23794           | 833   |
| $P11$    | 17830           | 774   |
| $P12$    | 17098           | 727   |
| $P13$    | 19041           | 861   |
| $P14$    | 19497           | 810   |
| $P15$    | 22495           | 903   |
| $P16$    | 21380           | 840   |
| $P17$    | 18647           | 712   |
| $P18$    | 22125           | 847   |
| $P19$    | 18766           | 730   |
| $P20$    | 21551           | 816   |
| $P21$    | 21927           | 816   |
| $P22$    | 25816           | 998   |
| $P23$    | 21301           | 841   |
| $P24$    | 20041           | 975   |
| $P25$    | 23733           | 906   |
| $P26$    | 20454           | 803   |
| $P27$    | 18105           | 675   |
| $P28$    | 18074           | 827   |
| $P29$    | 19654           | 900   |
| $P30$    | 14967           | 749   |
| $P31$    | 18486           | 747   |
| $P32$    | 28295           | 967   |
| $P33$    | 21035           | 811   |
| $P34$    | 24686           | 868   |
| $P35$    | 21694           | 950   |
| TOTAL    | 716231          | 29092 |
| MOYENNE  | 20464           | 831   |

**Table B.9** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 4 Chambre 4.1. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 4 Chambre 4.2

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 27505           | 965   |
| $P2$     | 23389           | 828   |
| $P3$     | 20997           | 812   |
| $P4$     | 24217           | 870   |
| $P5$     | 25307           | 891   |
| $P6$     | 21474           | 796   |
| $P7$     | 21973           | 843   |
| $P8$     | 22335           | 896   |
| $P9$     | 20537           | 850   |
| $P10$    | 21276           | 854   |
| $P11$    | 19491           | 727   |
| $P12$    | 19498           | 761   |
| $P13$    | 19431           | 757   |
| $P14$    | 23109           | 847   |
| $P15$    | 28304           | 994   |
| $P16$    | 21444           | 860   |
| $P17$    | 18025           | 693   |
| $P18$    | 20467           | 792   |
| $P19$    | 18190           | 715   |
| $P20$    | 17405           | 697   |
| $P21$    | 24034           | 938   |
| $P22$    | 23500           | 939   |
| $P23$    | 19470           | 791   |
| $P24$    | 14657           | 605   |
| $P25$    | 17286           | 722   |
| $P26$    | 16974           | 702   |
| $P27$    | 16397           | 704   |
| $P28$    | 28313           | 1007  |
| $P29$    | 24033           | 899   |
| $P30$    | 18115           | 724   |
| $P31$    | 20613           | 795   |
| $P32$    | 19373           | 752   |
| $P33$    | 15198           | 629   |
| $P34$    | 21254           | 759   |
| $P35$    | 25864           | 851   |
| TOTAL    | 739455          | 28265 |
| MOYENNE  | 21127           | 808   |

**Table B.10** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 4 Chambre 4.2. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 4 Chambre 4.3

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 33277           | 1261  |
| $P2$     | 26912           | 998   |
| $P3$     | 22570           | 860   |
| $P4$     | 25312           | 964   |
| $P5$     | 23442           | 866   |
| $P6$     | 25533           | 956   |
| $P7$     | 20625           | 872   |
| $P8$     | 25913           | 973   |
| $P9$     | 13701           | 539   |
| $P10$    | 17047           | 695   |
| $P11$    | 19825           | 781   |
| $P12$    | 17094           | 664   |
| $P13$    | 20609           | 771   |
| $P14$    | 26406           | 961   |
| $P15$    | 27181           | 1053  |
| $P16$    | 13817           | 549   |
| $P17$    | 14056           | 592   |
| $P18$    | 12078           | 505   |
| $P19$    | 14902           | 593   |
| $P20$    | 16992           | 658   |
| $P21$    | 24103           | 806   |
| $P22$    | 33750           | 1252  |
| $P23$    | 20400           | 746   |
| $P24$    | 11836           | 475   |
| $P25$    | 9131            | 392   |
| $P26$    | 7629            | 312   |
| $P27$    | 9615            | 353   |
| $P28$    | 23804           | 786   |
| $P29$    | 32969           | 1203  |
| $P30$    | 25029           | 877   |
| $P31$    | 21294           | 782   |
| $P32$    | 17138           | 657   |
| $P33$    | 17584           | 678   |
| $P34$    | 21232           | 749   |
| $P35$    | 22752           | 869   |
| TOTAL    | 715558          | 27048 |
| MOYENNE  | 20445           | 773   |

**Table B.11** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 4 Chambre 4.3. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.



## Essai 4 Chambre 4.4

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 25246           | 1000  |
| $P2$     | 22752           | 927   |
| $P3$     | 28582           | 1079  |
| $P4$     | 24039           | 983   |
| $P5$     | 25006           | 1037  |
| $P6$     | 23024           | 942   |
| $P7$     | 24867           | 965   |
| $P8$     | 23248           | 964   |
| $P9$     | 18992           | 762   |
| $P10$    | 16316           | 652   |
| $P11$    | 10231           | 554   |
| $P12$    | 10912           | 509   |
| $P13$    | 16902           | 714   |
| $P14$    | 27835           | 1138  |
| $P15$    | 26527           | 1001  |
| $P16$    | 12140           | 536   |
| $P17$    | 8017            | 368   |
| $P18$    | 7192            | 334   |
| $P19$    | 9263            | 410   |
| $P20$    | 8083            | 366   |
| $P21$    | 27720           | 1127  |
| $P22$    | 25644           | 892   |
| $P23$    | 11033           | 468   |
| $P24$    | 6897            | 313   |
| $P25$    | 8369            | 387   |
| $P26$    | 7989            | 357   |
| $P27$    | 4862            | 248   |
| $P28$    | 21602           | 913   |
| $P29$    | 24090           | 950   |
| $P30$    | 20415           | 803   |
| $P31$    | 6815            | 298   |
| $P32$    | 13561           | 605   |
| $P33$    | 9332            | 420   |
| $P34$    | 7288            | 338   |
| $P35$    | 23106           | 897   |
| TOTAL    | 587897          | 24257 |
| MOYENNE  | 16797           | 693   |

**Table B.12** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 4 Chambre 4.4. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 5 Chambre 5.1

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 21597           | 967   |
| $P2$     | 24576           | 1159  |
| $P3$     | 22006           | 1118  |
| $P4$     | 25082           | 1182  |
| $P5$     | 25539           | 1282  |
| $P6$     | 25840           | 1333  |
| $P7$     | 27638           | 1357  |
| $P8$     | 22696           | 1112  |
| $P9$     | 16588           | 806   |
| $P10$    | 15740           | 766   |
| $P11$    | 18497           | 931   |
| $P12$    | 18269           | 948   |
| $P13$    | 23477           | 1134  |
| $P14$    | 24097           | 1170  |
| $P15$    | 12805           | 648   |
| $P16$    | 12693           | 623   |
| $P17$    | 10774           | 557   |
| $P18$    | 10196           | 529   |
| $P19$    | 10283           | 561   |
| $P20$    | 11724           | 626   |
| $P21$    | 14839           | 814   |
| $P22$    | 9431            | 477   |
| $P23$    | 8460            | 433   |
| $P24$    | 8005            | 416   |
| $P25$    | 10528           | 480   |
| $P26$    | 9635            | 463   |
| $P27$    | 11430           | 621   |
| $P28$    | 13321           | 682   |
| $P29$    | 10852           | 573   |
| $P30$    | 7841            | 400   |
| $P31$    | 8281            | 389   |
| $P32$    | 8588            | 406   |
| $P33$    | 362             | 362   |
| $P34$    | 9775            | 539   |
| $P35$    | 10999           | 568   |
| TOTAL    | 522464          | 26432 |
| MOYENNE  | 14928           | 755   |

**Table B.13** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 5 Chambre 5.1. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 5 Chambre 5.2

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 12554           | 551   |
| $P2$     | 11645           | 530   |
| $P3$     | 8832            | 450   |
| $P4$     | 8683            | 449   |
| $P5$     | 9653            | 472   |
| $P6$     | 10576           | 502   |
| $P7$     | 10365           | 515   |
| $P8$     | 7653            | 364   |
| $P9$     | 9682            | 465   |
| $P10$    | 7716            | 402   |
| $P11$    | 7898            | 402   |
| $P12$    | 8240            | 439   |
| $P13$    | 8277            | 408   |
| $P14$    | 6937            | 357   |
| $P15$    | 7224            | 355   |
| $P16$    | 6448            | 332   |
| $P17$    | 10049           | 500   |
| $P18$    | 8976            | 431   |
| $P19$    | 9172            | 484   |
| $P20$    | 9712            | 490   |
| $P21$    | 9517            | 449   |
| $P22$    | 9782            | 480   |
| $P23$    | 6857            | 365   |
| $P24$    | 9252            | 487   |
| $P25$    | 10150           | 542   |
| $P26$    | 7326            | 408   |
| $P27$    | 7660            | 406   |
| $P28$    | 10404           | 502   |
| $P29$    | 8628            | 456   |
| $P30$    | 8420            | 406   |
| $P31$    | 10124           | 481   |
| $P32$    | 7661            | 405   |
| $P33$    | 8852            | 457   |
| $P34$    | 6666            | 349   |
| $P35$    | 8110            | 407   |
| TOTAL    | 309701          | 15498 |
| MOYENNE  | 8849            | 443   |

**Table B.14** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 5 Chambre 5.2. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.

## Essai 5 Chambre 5.4

| Position | $s$<br>[pixels] | $No$  |
|----------|-----------------|-------|
| $P1$     | 8723            | 501   |
| $P2$     | 7468            | 375   |
| $P3$     | 3453            | 213   |
| $P4$     | 8314            | 429   |
| $P5$     | 7909            | 436   |
| $P6$     | 8061            | 408   |
| $P7$     | 5865            | 328   |
| $P8$     | 12040           | 667   |
| $P9$     | 7498            | 418   |
| $P10$    | 13142           | 668   |
| $P11$    | 6301            | 374   |
| $P12$    | 10111           | 512   |
| $P13$    | 9326            | 471   |
| $P14$    | 10449           | 543   |
| $P15$    | 17393           | 755   |
| $P16$    | 9603            | 543   |
| $P17$    | 13094           | 709   |
| $P18$    | 8848            | 497   |
| $P19$    | 9015            | 501   |
| $P20$    | 7528            | 423   |
| $P21$    | 10819           | 535   |
| $P22$    | 13591           | 712   |
| $P23$    | 9843            | 525   |
| $P24$    | 8837            | 466   |
| $P25$    | 10861           | 550   |
| $P26$    | 10888           | 609   |
| $P27$    | 6837            | 364   |
| $P28$    | 9042            | 495   |
| $P29$    | 13370           | 748   |
| $P30$    | 6703            | 370   |
| $P31$    | 5567            | 288   |
| $P32$    | 5038            | 275   |
| $P33$    | 6439            | 348   |
| $P34$    | 6401            | 346   |
| $P35$    | 7275            | 387   |
| TOTAL    | 315652          | 16789 |
| MOYENNE  | 9019            | 480   |

**Table B.15** – Résultat des traitements des images pour l'essai de la reproductibilité de l'état initial :Essai 5 Chambre 5.4. Le  $s_t$  est la surface occupée totale et  $No$  est le nombre des bactéries sur la surface.



## Annexe C

# Résumé de la prise d'images à chaque expérience

| Expérience | Temps de développement du biofilm | Positions analysées (bactéries vivantes)                                   | Positions analysées (bactéries mortes)                | Taille de chaque image (2D)            |
|------------|-----------------------------------|--|---|--|
| Min        | 24 h                              | P1, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P12  | P5, P7, P8, P9  | 145.31 $\mu$ m $\times$ 145.31 $\mu$ m |
|            | 48 h                              | P1, P2, P3, P4, P5, P6 P7, P8 P9, P10 P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17    | P6, P7, P17, P11                                      | 145.31 $\mu$ m $\times$ 145.31 $\mu$ m |
|            | 72 h                              | P1, P2 P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17  | P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P17                | 96.88 $\mu$ m $\times$ 96.88 $\mu$ m   |
| Max        | 24 h A                            | P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17 | P6, P7, P10, P17                                      | 145.31 $\mu$ m $\times$ 145.31 $\mu$ m |
|            | 24 h B                            | P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P16, P17 |   | 145.31 $\mu$ m $\times$ 145.31 $\mu$ m |
|            | 48 h A                            | P1, P4, P5, P8, P9, P10, P12, P13, P16                                     |   | 96.88 $\mu$ m $\times$ 96.88 $\mu$ m   |
|            | 48 h B                            | P1, P3, P4, P5, P7, P8, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P17                  | P3, P4, P5, P7, P8, P10, P11, P12, P13, P14, P15, P17 | 83.04 $\mu$ m $\times$ 83.04 $\mu$ m   |
|            | 72 h A                            | P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P14, P15, P17                | P6, P7, P11, P17                                      | 145.31 $\mu$ m $\times$ 145.31 $\mu$ m |
|            | 72 h B                            | P1, P2, P4, P5, P6, P8, P9, P10, P12, P13, P16                             |   | 145.31 $\mu$ m $\times$ 145.31 $\mu$ m |

**Table C.1** – Résumé de la prise d'images à chaque expérience.

## Annexe D

# Caractéristiques analysées pour évaluation de la valeur de SER

Les tableaux présentent la fraction volumique moyenne sur trois points consécutifs ( $\bar{\phi}_3$ ), les surfaces associées à ces points et le coefficient de variation des fraction volumique moyenne ( $CV_3$ ). Le tableau [D.1](#) présente les expériences à plus faible cisaillement pour les trois temps analysés. Les tableaux [D.2](#), [D.3](#) et [D.4](#) présentent les expériences à plus fort cisaillement pour les temps 24 h, 48 h, et 72 h, respectivement.



| Temps                  | Surface ( $mm^2$ )     | $\phi_3$ | $CV_3$ (%) |
|------------------------|------------------------|----------|------------|
| 24h                    | 0.021 , 0.042 et 0.063 | 0.004    | 12         |
|                        | 0.042 , 0.063 et 0.084 | 0.004    | 5          |
|                        | 0.063 , 0.084 et 0.106 | 0.004    | 5          |
|                        | 0.084 , 0.106 et 0.127 | 0.004    | 4          |
|                        | 0.106 , 0.127 et 0.148 | 0.003    | 4          |
|                        | 0.127 , 0.148 et 0.169 | 0.003    | 4          |
| 48h                    | 0.021 , 0.042 et 0.063 | 0.017    | 35         |
|                        | 0.042 , 0.063 et 0.084 | 0.013    | 17         |
|                        | 0.063 , 0.084 et 0.106 | 0.011    | 7          |
|                        | 0.084 , 0.106 et 0.127 | 0.011    | 5          |
|                        | 0.106 , 0.127 et 0.148 | 0.010    | 5          |
|                        | 0.127 , 0.148 et 0.169 | 0.011    | 11         |
|                        | 0.148 , 0.169 et 0.190 | 0.011    | 12         |
|                        | 0.169 , 0.190 et 0.211 | 0.012    | 2          |
|                        | 0.190 , 0.211 et 0.232 | 0.012    | 2          |
|                        | 0.211 , 0.232 et 0.253 | 0.012    | 7          |
|                        | 0.232 , 0.253 et 0.274 | 0.013    | 10         |
|                        | 0.253 , 0.274 et 0.296 | 0.014    | 7          |
|                        | 0.274 , 0.296 et 0.317 | 0.015    | 3          |
|                        | 0.296 , 0.317 et 0.338 | 0.015    | 2          |
| 0.317 , 0.338 et 0.359 | 0.015                  | 2        |            |
| 72h                    | 0.009 , 0.019 et 0.028 | 0.006    | 9          |
|                        | 0.019 , 0.028 et 0.038 | 0.006    | 11         |
|                        | 0.028 , 0.038 et 0.047 | 0.006    | 11         |
|                        | 0.038 , 0.047 et 0.056 | 0.006    | 8          |
|                        | 0.047 , 0.056 et 0.066 | 0.006    | 4          |
|                        | 0.056 , 0.066 et 0.075 | 0.007    | 27         |
|                        | 0.066 , 0.075 et 0.084 | 0.008    | 25         |
|                        | 0.075 , 0.084 et 0.094 | 0.008    | 2          |
|                        | 0.084 , 0.094 et 0.103 | 0.008    | 2          |
|                        | 0.094 , 0.103 et 0.113 | 0.008    | 2          |
|                        | 0.103 , 0.113 et 0.122 | 0.008    | 2          |
|                        | 0.113 , 0.122 et 0.131 | 0.008    | 4          |
|                        | 0.122 , 0.131 et 0.141 | 0.008    | 3          |
|                        | 0.131 , 0.141 et 0.150 | 0.008    | 2          |
| 0.141 , 0.150 et 0.160 | 0.008                  | 2        |            |

Table D.1 –  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$

| Temps | Surface ( $mm^2$ )    | $\bar{\phi}_3$ | $CV_3$ (%) |
|-------|-----------------------|----------------|------------|
| 24h A | 0.021 , 0.042 , 0.063 | 0.008          | 1          |
|       | 0.042 , 0.063 , 0.084 | 0.008          | 2          |
|       | 0.063 , 0.084 , 0.106 | 0.008          | 2          |
|       | 0.084 , 0.106 , 0.127 | 0.008          | 1          |
|       | 0.106 , 0.127 , 0.148 | 0.008          | 1          |
|       | 0.127 , 0.148 , 0.169 | 0.008          | 1          |
|       | 0.148 , 0.169 , 0.190 | 0.008          | 1          |
|       | 0.169 , 0.190 , 0.211 | 0.008          | 2          |
|       | 0.190 , 0.211 , 0.232 | 0.009          | 2          |
|       | 0.211 , 0.232 , 0.253 | 0.009          | 3          |
|       | 0.232 , 0.253 , 0.274 | 0.009          | 3          |
|       | 0.253 , 0.274 , 0.296 | 0.009          | 1          |
|       | 0.274 , 0.296 , 0.317 | 0.009          | 2          |
|       | 0.296 , 0.317 , 0.338 | 0.010          | 2          |
|       | 0.317 , 0.338 , 0.359 | 0.010          | 2          |
| 24h B | 0.021 , 0.042 , 0.063 | 0.006          | 12         |
|       | 0.042 , 0.063 , 0.084 | 0.005          | 9          |
|       | 0.063 , 0.084 , 0.106 | 0.005          | 7          |
|       | 0.084 , 0.106 , 0.127 | 0.005          | 1          |
|       | 0.106 , 0.127 , 0.148 | 0.005          | 2          |
|       | 0.127 , 0.148 , 0.169 | 0.005          | 2          |
|       | 0.148 , 0.169 , 0.190 | 0.004          | 1          |
|       | 0.169 , 0.190 , 0.211 | 0.004          | 3          |
|       | 0.190 , 0.211 , 0.232 | 0.004          | 3          |
|       | 0.211 , 0.232 , 0.253 | 0.004          | 2          |
|       | 0.232 , 0.253 , 0.274 | 0.004          | 1          |
|       | 0.253 , 0.274 , 0.296 | 0.004          | 1          |
|       | 0.274 , 0.296 , 0.317 | 0.004          | 0          |
|       | 0.296 , 0.317 , 0.338 | 0.004          | 2          |
|       | 0.317 , 0.338 , 0.359 | 0.004          | 2          |

**Table D.2** –  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa, 24 h A et B

| Temps | Surface ( $mm^2$ )    | $\bar{\phi}_3$ | $CV_3$ (%) |
|-------|-----------------------|----------------|------------|
| 48h A | 0.009 , 0.019 , 0.028 | 0.030          | 16         |
|       | 0.019 , 0.028 , 0.038 | 0.031          | 14         |
|       | 0.028 , 0.038 , 0.047 | 0.030          | 17         |
|       | 0.038 , 0.047 , 0.056 | 0.026          | 14         |
|       | 0.047 , 0.056 , 0.066 | 0.023          | 10         |
|       | 0.056 , 0.066 , 0.075 | 0.022          | 6          |
|       | 0.066 , 0.075 , 0.084 | 0.022          | 6          |
| 48h B | 0.007 , 0.014 , 0.021 | 0.064          | 19         |
|       | 0.014 , 0.021 , 0.028 | 0.061          | 24         |
|       | 0.021 , 0.028 , 0.034 | 0.050          | 10         |
|       | 0.028 , 0.034 , 0.041 | 0.045          | 13         |
|       | 0.034 , 0.041 , 0.048 | 0.042          | 6          |
|       | 0.041 , 0.048 , 0.055 | 0.040          | 5          |
|       | 0.048 , 0.055 , 0.062 | 0.040          | 5          |
|       | 0.055 , 0.062 , 0.069 | 0.038          | 4          |
|       | 0.062 , 0.069 , 0.076 | 0.037          | 5          |
|       | 0.069 , 0.076 , 0.083 | 0.035          | 5          |
|       | 0.076 , 0.083 , 0.090 | 0.033          | 5          |

**Table D.3** –  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa, 48 h A et B

| Temps | Surface ( $mm^2$ )    | $\bar{\phi}_3$ | $CV_3$ (%) |
|-------|-----------------------|----------------|------------|
| 72h A | 0.021 , 0.042 , 0.063 | 0.029          | 32         |
|       | 0.042 , 0.063 , 0.084 | 0.023          | 18         |
|       | 0.063 , 0.084 , 0.106 | 0.020          | 6          |
|       | 0.084 , 0.106 , 0.127 | 0.019          | 7          |
|       | 0.106 , 0.127 , 0.148 | 0.018          | 4          |
|       | 0.127 , 0.148 , 0.169 | 0.018          | 5          |
|       | 0.148 , 0.169 , 0.190 | 0.018          | 5          |
|       | 0.169 , 0.190 , 0.211 | 0.019          | 4          |
|       | 0.190 , 0.211 , 0.232 | 0.020          | 9          |
|       | 0.211 , 0.232 , 0.253 | 0.021          | 9          |
|       | 0.232 , 0.253 , 0.274 | 0.023          | 7          |
|       | 0.253 , 0.274 , 0.296 | 0.024          | 3          |
| 72h B | 0.021 , 0.042 , 0.063 | 0.046          | 23         |
|       | 0.042 , 0.063 , 0.084 | 0.040          | 4          |
|       | 0.063 , 0.084 , 0.106 | 0.041          | 5          |
|       | 0.084 , 0.106 , 0.127 | 0.042          | 2          |
|       | 0.106 , 0.127 , 0.148 | 0.043          | 3          |
|       | 0.127 , 0.148 , 0.169 | 0.044          | 4          |
|       | 0.148 , 0.169 , 0.190 | 0.046          | 4          |
|       | 0.169 , 0.190 , 0.211 | 0.047          | 2          |
|       | 0.190 , 0.211 , 0.232 | 0.048          | 1          |

**Table D.4** –  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa, 72 h A et B

## Annexe E

# Mécanismes de l'adhésion bactérienne

L'adhérence bactérienne à la surface d'un matériau est un processus dans lequel la bactérie se lie intimement à la surface. Il peut être décrit comme un procédé en deux étapes, la première étape étant une étape dite physique, instantanée et réversible, et la deuxième, une étape dite moléculaire, dépendant du temps et irréversible (An & Friedman, 1998).

Les caractéristiques des matériaux qui influencent l'adhérence bactérienne sont la composition chimique, la charge de surface, l'hydrophobicité, et la configuration physique, ou simplement la rugosité de surface (Katsikogianni & Missirlis, 2004). Cependant, une des principales caractéristique de l'adhérence bactérienne est l'hydrophobicité (Carré & Mittal, 2011).

En général, les bactéries avec des caractéristiques hydrophobes préfèrent des matériaux avec des surfaces hydrophobes, et ceux ayant des caractéristiques hydrophiles préfèrent les surfaces hydrophiles (Mitik-Dineva *et al.*, 2009). Cependant, il a été démontré que des matériaux avec des surfaces hydrophobes jouent un rôle plus important dans l'adhésion que l'hydrophobicité de la surface bactérienne (Katsikogianni & Missirlis, 2004).

Ainsi, de nombreux chercheurs ont montré que les micro-organismes se lient plus rapidement à une surface hydrophobe, qu'à des matières hydrophiles (Donlan, 2002a). Cependant, d'autres études montrent que l'adsorption et la désorption se produit beaucoup plus sur les surfaces hydrophiles que sur les surfaces hydrophobes (Carré & Mittal, 2011). An & Friedman (1998) ont constaté que les matériaux hydrophiles pourraient être plus résistants à l'adhésion bactérienne que ceux hydrophobes. Cela montre que la relation entre les caractéristiques d'adhérence de surface et de bactérie sont complexes. En plus, les caractéristiques de surface peuvent changer avec l'adhésion des bactéries pour la production de surfactant exogène par des bactéries (Carré & Mittal, 2011).

De façon générale, l'adhésion se produira plus facilement plus les surfaces sont rugueuses et hydrophobes. Une augmentation de la vitesse d'écoulement, la température de l'eau, ou de la concentration des éléments nutritifs peut également conduire à une augmentation de l'adhérence, si ces paramètres ne dépassent pas le niveau critique (Donlan, 2002).

## Hydrophobicité

Comme cité préalablement, l'hydrophobicité des surfaces est une des principales caractéristique de l'adhérence bactérienne. Une surface est considérée hydrophile quand l'angle de contact est inférieur à  $90^\circ$  et, au contraire, une surface est considérée hydrophobe quand l'angle de contact est supérieur à  $90^\circ$ . Ainsi, pour connaître l'hydrophobicité des composantes de la chambre d'écoulement, nous avons mesuré ces angles des contact. Les composants analysés ont été : la lamelle en verre borosilicaté, la chambre en PDMS et la chambre en PMMA modifié. Les mesures sont réalisées après nettoyage et stérilisation selon le protocole de manipulation (section 6.1, chapitre 6). Les valeurs des angles des contacts mesurés sont présentés dans le tableau E.1.

| Matériau  | Angle de contract              | Hydrophobicité |
|---|--------------------------------|----------------|
| Bactérie <i>P. putida</i><br>(Power <i>et al.</i> , 2007) | entre $36^\circ$ et $49^\circ$ | hydrophile     |
| Lamelle en verre  | $37.35^\circ$                  | hydrophile     |
| Chambre en PMMA modifié                                   | $82.72^\circ$                  | hydrophile     |
| Chambre en PDMS   | $93.15^\circ$                  | hydrophobe     |

**Table E.1** – Angle des contact : Bactérie *P. putida* (Power *et al.*, 2007), lamelle en verre, chambre en PMMA modifié et chambre en PDMS.

On observe dans le tableau E.1, que la surface des bactéries *P. putida* et de la lamelle en verre possèdent une hydrophobicité considérablement proche avec un faible angle de contact. Celui-là peut justifier l'adhésion élevée sur la lamelle de verre, sachant que les bactéries avec des caractéristiques hydrophiles préfèrent les surfaces hydrophiles (Mitik-Dineva *et al.*, 2009).

Cependant, comme nous avons cité auparavant (Katsikogianni & Missirlis, 2004), il a été démontré que les surfaces hydrophobes jouent un rôle plus important dans l'adhérence que l'hydrophobicité de la surface bactérienne. On observe ainsi que la chambre en PDMS est le matériau hydrophobe utilisé dans les systèmes d'écoulement, peuvent ainsi justifier sa plus important adhésion des bactéries.

**Annexe F**

## **Distribution Spatiale dans le Biofilm**

| Positions | 24 h      |              |              |                | 48 h      |              |              |                | 72 h      |              |              |                |
|-----------|-----------|--------------|--------------|----------------|-----------|--------------|--------------|----------------|-----------|--------------|--------------|----------------|
|           | $H_{int}$ | $\phi_{int}$ | $\phi_{ext}$ | $\phi_{total}$ | $H_{int}$ | $\phi_{int}$ | $\phi_{ext}$ | $\phi_{total}$ | $H_{int}$ | $\phi_{int}$ | $\phi_{ext}$ | $\phi_{total}$ |
| P1        | 9.12      | 0.0340       | 0.0023       | 0.0049         | 21.66     | 0.0714       | 0.0031       | 0.0163         | 9.12      | 0.0387       | 0.0009       | 0.0059         |
| P2        |           |              |              |                | 4.56      | 0.0359       | 0.0041       | 0.0058         | 6.84      | 0.1052       | 0.0003       | 0.0067         |
| P3        | 7.98      | 0.0179       | 0.0021       | 0.0032         | 4.56      | 0.0304       | 0.0029       | 0.0046         | 5.70      | 0.0435       | 0.0012       | 0.0033         |
| P4        | 4.56      | 0.0238       | 0.0023       | 0.0035         | 12.54     | 0.0305       | 0.0034       | 0.0065         | 19.38     | 0.0497       | 0.0024       | 0.0106         |
| P5        | 6.84      | 0.0239       | 0.0015       | 0.0030         | 3.42      | 0.0380       | 0.0062       | 0.0073         | 5.70      | 0.0330       | 0.0011       | 0.0027         |
| P6        |           |              |              |                | 5.70      | 0.0311       | 0.0055       | 0.0071         | 5.70      | 0.0966       | 0.0002       | 0.0052         |
| P7        | 5.70      | 0.0189       | 0.0019       | 0.0030         | 5.70      | 0.0308       | 0.0032       | 0.0050         | 4.56      | 0.0485       | 0.0013       | 0.0034         |
| P8        | 4.56      | 0.0190       | 0.0017       | 0.0026         | 5.70      | 0.1041       | 0.0300       | 0.0334         | 5.70      | 0.1295       | 0.0157       | 0.0314         |
| P9        | 4.56      | 0.0216       | 0.0013       | 0.0024         | 5.70      | 0.0363       | 0.0083       | 0.0101         | 11.40     | 0.0506       | 0.0026       | 0.0077         |
| P10       |           |              |              |                | 4.56      | 0.0488       | 0.0046       | 0.0069         | 7.98      | 0.0741       | 0.0011       | 0.0063         |
| P11       |           |              |              |                | 7.98      | 0.0292       | 0.0250       | 0.0236         | 7.98      | 0.0503       | 0.0024       | 0.0065         |
| P12       | 3.42      | 0.0172       | 0.0015       | 0.0023         | 4.56      | 0.0766       | 0.0080       | 0.0126         | 6.84      | 0.0358       | 0.0044       | 0.0064         |
| P13       |           |              |              |                | 4.56      | 0.0777       | 0.0355       | 0.0361         | 7.98      | 0.0350       | 0.0023       | 0.0049         |
| P14       |           |              |              |                | 5.70      | 0.0637       | 0.0248       | 0.0272         | 4.56      | 0.0501       | 0.0060       | 0.0087         |
| P15       |           |              |              |                | 4.56      | 0.0715       | 0.0103       | 0.0175         | 13.68     | 0.0839       | 0.0051       | 0.0151         |
| P16       |           |              |              |                | 6.84      | 0.0476       | 0.0199       | 0.0212         | 5.70      | 0.0531       | 0.0034       | 0.0066         |
| P17       |           |              |              |                | 4.56      | 0.0469       | 0.0068       | 0.0092         | 10.26     | 0.0385       | 0.0013       | 0.0047         |
| Moyenne   | 5.84      | 0.0221       | 0.0018       | 0.0031         | 6.64      | 0.0512       | 0.0119       | 0.0147         | 8.18      | 0.0598       | 0.0030       | 0.0080         |

**Table F.1** – Résumé de la distribution spatiale des bactéries vivantes dans le biofilm :  $\tau_w = 2.1 \times 10^{-3}$  Pa.

| Positions | 24 h A    |              |              |                | 24 h B    |              |              |                |
|-----------|-----------|--------------|--------------|----------------|-----------|--------------|--------------|----------------|
|           | $H_{int}$ | $\phi_{int}$ | $\phi_{ext}$ | $\phi_{total}$ | $H_{int}$ | $\phi_{int}$ | $\phi_{ext}$ | $\phi_{total}$ |
| P1        | 6.84      | 0.0282       | 0.0048       | 0.0082         | 6.84      | 0.0778       | 0.0076       | 0.0121         |
| P2        | 5.7       | 0.0443       | 0.0046       | 0.0084         | 7.98      | 0.046        | 0.0050       | 0.0082         |
| P3        | 4.56      | 0.0443       | 0.0043       | 0.0080         | 5.7       | 0.0717       | 0.0048       | 0.0085         |
| P4        | 5.7       | 0.0283       | 0.0047       | 0.0074         | 6.84      | 0.0346       | 0.0043       | 0.0063         |
| P5        | 5.7       | 0.0452       | 0.0047       | 0.0091         | 9.12      | 0.0493       | 0.0054       | 0.0091         |
| P6        | 4.56      | 0.0431       | 0.0030       | 0.0071         | 5.7       | 0.0662       | 0.0052       | 0.0086         |
| P7        | 5.7       | 0.0429       | 0.0040       | 0.0092         | 9.12      | 0.0343       | 0.0044       | 0.0069         |
| P8        | 5.7       | 0.0347       | 0.0041       | 0.0087         | 6.84      | 0.0557       | 0.0054       | 0.0090         |
| P9        | 5.7       | 0.0406       | 0.0047       | 0.0096         | 6.84      | 0.0608       | 0.0027       | 0.0070         |
| P10       | 3.42      | 0.061        | 0.0051       | 0.0108         | 4.56      | 0.0712       | 0.0018       | 0.0055         |
| P11       | 6.84      | 0.0231       | 0.0080       | 0.0105         | 5.7       | 0.0588       | 0.0018       | 0.0057         |
| P12       | 5.7       | 0.0498       | 0.0060       | 0.0125         | 10.26     | 0.0334       | 0.0033       | 0.0060         |
| P13       | 5.7       | 0.0336       | 0.0075       | 0.0110         | 5.7       | 0.0559       | 0.0014       | 0.0051         |
| P14       | 4.56      | 0.0565       | 0.0040       | 0.0104         | 4.56      | 0.0485       | 0.0014       | 0.0043         |
| P15       | 4.56      | 0.0592       | 0.0077       | 0.0138         | 4.56      | 0.0388       | 0.0022       | 0.0045         |
| P16       | 4.56      | 0.0477       | 0.0072       | 0.0123         | 5.7       | 0.0502       | 0.0044       | 0.0070         |
| P17       | 4.56      | 0.025        | 0.0009       | 0.0043         | 6.84      | 0.0626       | 0.0054       | 0.0093         |
| Moyenne   | 5.30      | 0.0416       | 0.0050       | 0.0095         | 6.64      | 0.0539       | 0.0039       | 0.0072         |

**Table F.2** – Résumé de la distribution spatiale dans le biofilm développé pendant 24 h à  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa



| Positions | 48 h A    |              |              |                | 48 h B    |              |              |                |
|-----------|-----------|--------------|--------------|----------------|-----------|--------------|--------------|----------------|
|           | $H_{int}$ | $\phi_{int}$ | $\phi_{ext}$ | $\phi_{total}$ | $H_{int}$ | $\phi_{int}$ | $\phi_{ext}$ | $\phi_{total}$ |
| P1        | 11.4      | 0.1093       | 0.0345       | 0.0421         | 17.1      | 0.1041       | 0.0595       | 0.0663         |
| P2        |           |              |              |                |           |              |              |                |
| P3        |           |              |              |                | 11.4      | 0.1074       | 0.0956       | 0.0946         |
| P4        | 20.52     | 0.0778       | 0.0229       | 0.0330         | 9.12      | 0.0692       | 0.0087       | 0.0137         |
| P5        | 11.4      | 0.0963       | 0.0607       | 0.0619         | 12.54     | 0.1113       | 0.0360       | 0.0447         |
| P6        |           |              |              |                |           |              |              |                |
| P7        |           |              |              |                | 6.84      | 0.0774       | 0.0213       | 0.0242         |
| P8        | 7.98      | 0.0447       | 0.0162       | 0.0183         | 7.98      | 0.0791       | 0.0098       | 0.0147         |
| P9        | 12.54     | 0.0616       | 0.0082       | 0.0144         |           |              |              |                |
| P10       | 10.26     | 0.0636       | 0.0085       | 0.0145         | 12.54     | 0.0708       | 0.0592       | 0.0594         |
| P11       |           |              |              |                | 10.26     | 0.0699       | 0.0156       | 0.0210         |
| P12       | 10.26     | 0.0574       | 0.0151       | 0.0193         | 9.12      | 0.0687       | 0.0343       | 0.0373         |
| P13       | 5.7       | 0.0739       | 0.0674       | 0.0623         | 9.12      | 0.0436       | 0.0154       | 0.0178         |
| P14       |           |              |              |                | 11.4      | 0.1067       | 0.0229       | 0.0328         |
| P15       |           |              |              |                | 6.84      | 0.0774       | 0.0126       | 0.0179         |
| P16       | 12.54     | 0.0602       | 0.0139       | 0.0193         |           |              |              |                |
| P17       |           |              |              |                | 7.98      | 0.0750       | 0.0158       | 0.0203         |
| Moyenne   | 11.40     | 0.0716       | 0.0275       | 0.0317         | 10.17     | 0.0816       | 0.0313       | 0.0357         |

**Table F.3** – Résumé de la distribution spatiale des bactéries vivantes dans le biofilm : 48 h à  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa

| Positions | 72 h A    |              |              |                | 72 h B    |              |              |                |
|-----------|-----------|--------------|--------------|----------------|-----------|--------------|--------------|----------------|
|           | $H_{int}$ | $\phi_{int}$ | $\phi_{ext}$ | $\phi_{total}$ | $H_{int}$ | $\phi_{int}$ | $\phi_{ext}$ | $\phi_{total}$ |
| P1        | 7.98      | 0.1545       | 0.0353       | 0.0457         | 7.98      | 0.0735       | 0.0574       | 0.0581         |
| P2        | 10.26     | 0.0606       | 0.0156       | 0.0199         | 7.98      | 0.0785       | 0.0289       | 0.0326         |
| P3        | 7.98      | 0.1014       | 0.0034       | 0.0112         |           |              |              |                |
| P4        | 5.7       | 0.1405       | 0.0154       | 0.0247         | 9.12      | 0.0730       | 0.0304       | 0.0340         |
| P5        | 7.98      | 0.0363       | 0.0105       | 0.0128         | 9.12      | 0.0768       | 0.0490       | 0.0512         |
| P6        | 9.12      | 0.0674       | 0.0177       | 0.0220         | 7.98      | 0.0989       | 0.0397       | 0.0451         |
| P7        | 9.12      | 0.0707       | 0.0085       | 0.0154         |           |              |              |                |
| P8        | 5.7       | 0.1593       | 0.0376       | 0.0460         | 10.26     | 0.0571       | 0.0405       | 0.0421         |
| P9        | 9.12      | 0.0439       | 0.0131       | 0.0161         | 6.84      | 0.0922       | 0.0512       | 0.0537         |
| P10       | 14.82     | 0.1037       | 0.0284       | 0.0384         | 7.98      | 0.1048       | 0.0550       | 0.0597         |
| P11       | 14.82     | 0.0848       | 0.0407       | 0.0466         |           |              |              |                |
| P12       |           |              |              |                | 5.7       | 0.1329       | 0.0540       | 0.0586         |
| P13       |           |              |              |                | 9.12      | 0.0684       | 0.0415       | 0.0437         |
| P14       | 4.56      | 0.1034       | 0.0385       | 0.0439         |           |              |              |                |
| P15       | 10.26     | 0.0880       | 0.0438       | 0.0491         |           |              |              |                |
| P16       |           |              |              |                | 4.56      | 0.1174       | 0.0521       | 0.0554         |
| P17       | 4.56      | 0.0644       | 0.0091       | 0.0124         |           |              |              |                |
| Moyenne   | 8.71      | 0.0914       | 0.0227       | 0.0289         | 7.88      | 0.0885       | 0.0454       | 0.0486         |

**Table F.4** – Résumé de la distribution spatiale des bactéries vivantes dans le biofilm : 72 h à  $\tau_w = 9.4 \times 10^{-2}$  Pa