HAL
open science

Dynamique de formation des biofilms de Bacillus subtilis à l'interface eau-air : expériences et modélisation

Maxime Ardré Ardré

To cite this version:

Maxime Ardré Ardré. Dynamique de formation des biofilms de Bacillus subtilis à l'interface eau-air : expériences et modélisation. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112235 . tel-01135841

HAL Id: tel-01135841

https://theses.hal.science/tel-01135841

Submitted on 26 Mar 2015

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.

UNIVERSITÉ PARIS SUD

Comprendre le monde, construire l'avenir®

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE :
École Doctorale de Physique d'Ile de France
Laboratoire de Physique des solides

Physique

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 26/09/2014

par

Maxime ARDRÉ

Dynamique de formation des biofilms de *Bacillus subtilis* à l'interface eau-air : expériences et modélisation

Directeur de thèse :	Mathis	PLAPP	Directeur de recherches (Laboratoire PMC, Palaiseau)
Co-directeur de thèse :	Carine	DOUARCHE	Maitre de conférences (Laboratoire LPS, Orsay)

Composition du jury :

Président du jury :	Guiseppe	FOFFI	Professeur (Laboratoire LPS, Orsay)
Rapporteurs :	Bahram	HOUCHMANDZADEH	Directeur de recherche (Laboratoire LIPhy, Grenoble)
	Sébastien	MARTIN	Professeur (Laboratoire MAPS, Paris)
Examinateurs :	Adrian	DAERR	Maitre de conférences (Laboratoire MSC, Paris)
Membres invités :	Hervé	HENRY	Chargé de recherche (Laboratoire PMC, Palaiseau)

Table des matières

1 Introduction **3**
1.1 Les bactéries . . . 3
1.1.1 Généralités sur les bactéries . . . 3
1.1.2 *Bacillus subtilis* . . . 4
1.2 La motilité des bactéries . . . 6
1.2.1 Run & Tumble . . . 6
1.2.2 Tactisme . . . 7
1.3 Comportements collectifs . . . 8
1.3.1 Mouvements collectifs . . . 8
1.3.2 Communication entre bactéries . . . 9
1.4 Biofilms . . . 9
1.4.1 Généralités . . . 9
1.4.2 Formation . . . 10
1.4.3 Elements constitutif d'un biofilm . . . 12
1.4.4 Morphologie . . . 13
1.4.5 Auto-organisation et environnement : modélisation . . . 14
1.4.6 Etat de l'art des méthodes de modélisation . . . 15
1.5 Aperçu du travail de thèse . . . 17

2 Formation d'un biofilm : expériences **20**
2.1 Objet d'étude . . . 20
2.1.1 Problématique . . . 20
2.1.2 Conditions expérimentales . . . 21
2.2 Mesures microscopiques . . . 21
2.2.1 Optimisation de la fluorescence . . . 21
2.2.2 Mesure de la taille . . . 29
2.2.3 Mesure de la vitesse . . . 33
2.3 Répartition des bactéries dans le volume . . . 36

2.3.1 Dispositif expérimental 36
2.3.2 Analyse des données du laser 42
2.3.3 Evolution de la concentration en bactéries au cours de la formation du biofilm 45
2.3.4 Corrélation avec les images 46
2.3.5 Croissance moyenne de la population de bactéries . . . 47
2.3.6 Conclusions et perspectives 51

3 Modèle de continuum 56
3.1 Accumulation 57
3.1.1 Le modèle de réaction-diffusion 57
3.1.2 Simulation en une dimension 59
3.1.3 Choix des paramètres 62
3.1.4 Résultats 64
3.2 Bioconvection 68
3.2.1 Introduction 68
3.2.2 Modélisation 69
3.2.3 Simulations 72
3.2.4 Résultats 77
3.3 Conclusions et perspectives 90

4 Modèle hybride continu-discret 92
4.1 Originalité du travail 92
4.2 Hypothèses sur la formation d'un biofilm et mise en œuvre . . 93
4.2.1 Définition du système 93
4.2.2 Modélisation de l'environnement 94
4.2.3 Modélisation et simulation des caractéristique bactériennes 97
4.2.4 La dynamique des bactéries individuelles 109
4.3 Etudes paramétriques du modèle 117
4.3.1 Formation d'un biofilm 117
4.3.2 Concentration moyenne en bactéries au moment de la transition 126
4.3.3 Scénarios de transition 127

5 Conclusion 137

6 Annexe **141**
6.1 Milieu de culture LB LBbiofilm 141
6.2 Différence finie et schéma d'Euler explicite 141
6.3 Critère de stabilité des simulations FTCS 142
6.4 Transformation équation de NS en terme de vorticité 143
6.5 Détail du calcul des champs de la section 3.2.3.1 144
6.6 Détail du calcul des conditions aux bords de la vorticité section 3.2.3.1 145
6.7 Optimisation du SOR 145

Remerciements

J'aimerais remercier les personnes qui m'ont fait l'honneur d'être jury de cette thèse. Guiseppe Foffi Professeur à l'université Paris-Sud, Bahram Houchmandzadeh Directeur de recherche au CNRS, Sebastien Martin Professeur à l'université Paris Descartes, Adrian Daerr Maitre de conférence à l'université Paris Diderot.

Je remercie Mathis Plapp. Ses grandes qualités scientifiques et son sens de la pédagogie ont fait de chacune de nos discussions des moments riches, nourrissants et éclairants. Merci de m'avoir permis de travailler dans un environnement serein dans lequel j'ai pu m'exprimer.

Je souhaite remercier Carine Douarche pour avoir permis la réalisation de ce beau projet qui allie intimement l'expérience à la théorie, la physique à la biologie. Merci pour avoir accepter de partager ses connaissances du monde fascinant des bactéries et leur biofilm.

J'aimerais remercier Hervé Henry pour son encadrement et son investissement dans ce travail. Ses connaissances en physique statistique et son expérience de l'outil numérique ont été d'un grand soutien.

Merci à l'équipe SOBIO du laboratoire de Physique des Solides de m'avoir acceuilli en son sein.

Merci au laboratoire de Physique de la Matière Condensé. Je pense à tous ses membres qui font régner une chaleureuse ambiance d'équipe. Une pensé spéciale à Julien Monguillon avec qui j'ai particulairement intéragi.

Je pense à mes amis docteurs/doctorants de PMC et du LPS avec qui j'ai partagé de bon moments, aux labos et en dehors.

Merci à Charles Duvert, Celine Delrieux, Bérengère Frugnac et Mathilde Garcia pour leur relecture attentive de ce manuscrit.

Une pensée à Pauline Durand et Léo Valon pour avoir été là tout au long de cette thèse. Et à Hugo Wioland, Isabelle Motta, Jordan Monnet, Camille Paoletti, Clotilde Le Quinioux, mes potes d'IPB, pour avoir maintenu cette

émulation scientifico-fetard très stimulante, pourvu que ca dure...

Enfin, merci à mes parents de m'avoir soutenu à partir du 5 juin 1987 et m'avoir permis d'en arriver là.

Chapitre 1

Introduction

1.1 Les bactéries

1.1.1 Généralités sur les bactéries

Grâce à sa (ses) membrane(s) la cellule délimite un espace clos dans lequel peuvent intervenir de multiples processus chimiques associés à la vie. La cellule est ainsi devenue le dénominateur commun à partir duquel est née la foisonnante expression de la vie observée aujourd'hui. En fait, depuis le dernier ancêtre commun universel il y a 3,5 à 3,8 milliard d'années [32], aussi appelé LUCA pour *last universal common ancestor*, trois types de cellules sont distinguées. Chaque type de cellules définit ce qu'on appelle un domaine : eucaryote, archée, et bactérie (ou eubacteria). Ces trois domaines sont les premières branches de l'arbre phylogénique qui représente le classement des êtres vivants (connus) par lien de parenté.

Le type de cellules qui a su coloniser le plus efficacement la terre est sans conteste le type bactérien. En terme de biomasse c'est celui qui est le plus représenté sur le globe [117]. Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires se reproduisant par division. On les classe en différentes espèces et chaque espèce est constituée de différentes souches. On les trouve partout, dans l'atmosphère, dans les océans, dans la terre, dans les autres êtres vivants... elles sont ubiquitaires. Cette propriété est sans doute due à leur très grande faculté d'adaptation qui leur permet de coloniser une grande variété d'environnements. Leur impact sur l'écosystème est considérable, et nous sommes encore en train de découvrir les multiples influences qu'elles peuvent avoir.

Depuis la découverte du lien entre les bactéries et les maladies infectieuses par Koch (1876 découverte du bacille du charbon, 1882 découverte du Bacille de la tuberculose) et Pasteur (1877 premier vaccin contre la fièvre charbonneuse des moutons), les bactéries étaient considérées comme néfastes car elles peuvent être la cause des maladies, et on a donc cherché à lutter contre leur développement. Aujourd'hui, cependant, nous avons réalisé que les bactéries font partie intégrante de notre écosystème. Par exemple, le corps humain est fait de dix fois plus de bactéries que de cellules humaines [9] et leur rôle semble si important qu'on associe désormais notre flore intestinale à un organe à part entière appelé le *microbiote* [23]. D'autres cas de symbiose sont observés entre eucaryotes multicellulaires et bactéries comme chez les plantes [42] ou les calamars [52] par exemple.

Dans l'industrie, les bactéries peuvent être très utiles. On s'en sert comme des petites machines capables de produire des molécules ou comme des catalyseurs de processus chimiques [49]. Par exemple, dans le traitement des eaux les bactéries sont utilisées dans les bassins de décantation pour activer le processus de purification de l'eau (méthode des boues activées) ; dans l'agroalimentaire, elles sont utilisées pour la production des yaourts, l'affinage des fromages, l'élaboration des produits de charcuterie ; en pharmacie la bactérie *Bacillus subtilis* est utilisée pour produire la bacitracin couramment utilisée comme antibiotique

1.1.2 *Bacillus subtilis*

La bactérie que nous allons particulièrement étudier ici est *Bacillus subtilis* (souche B168 et NCIB3610). Comme son nom l'indique, cette bactérie a une forme de bâtonnet car c'est un bacille, elle fait quelques micromètres de long pour une section de $1\,\mu\text{m}^2$.

Bacillus subtilis (BS) est *gram-positive* ce qui signifie que sa membrane est constituée d'une couche de peptidoglycanes (un polymère) et d'une couche lipidique qui prennent en sandwich l'espace périplasmique. Dans la membrane, on trouve différentes protéines qui permettent des échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. La bactérie peut alors importer des nutriments ou des signaux chimiques, ou encore exporter des déchets de son métabolisme.

Pour finir, BS est connue pour avoir besoin de dioxygène dans son métabolisme, on dit qu'elle est aérobe [60].

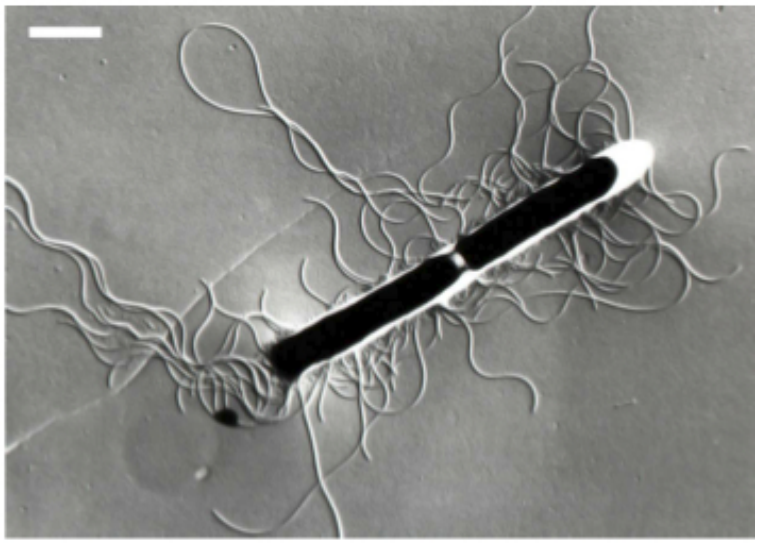


FIGURE 1.1 – Image prise par microscopie électronique de *Bacillus subtilis*[22]. Nous voyons la bactérie en cours de division. Elle est constituée d'un corps basal de quelques micromètres de long et de moins d'un micromètre de large. Les filaments blancs de la bactéries sont ses flagelles qui lui permettent de se déplacer. La barre d'échelle fait $1\,\mu$m.

1.2 La motilité des bactéries

1.2.1 Run & Tumble

Pour se mouvoir dans un milieu liquide, BS est munie de flagelles constituées d'une multitude de protéines de flagellin assemblées en un tube flexible d'environ $15\,\mu m$ de long et $20\,nm$ de section. Comme les flagelles sont réparties sur tout le corps de la cellule on dit que BS est *peritriche*. Chaque flagelle est fixée dans la membrane par un moteur. Les moteurs peuvent tourner dans les deux sens de rotation avec une fréquence d'environ 100 Hz [22, 8]. Lorsque les moteurs tournent dans le sens trigonométrique, les flagelles s'assemblent pour former un faisceau en forme de tire-bouchon. Celui-ci exerce alors une force de propulsion qui fait avancer le corps basal à une vitesse d'environ $20\,\mu\mathrm{m}\cdot\mathrm{s}$.

A l'échelle des bactéries, les milieux liquides tels que l'eau sont très visqueux. Le nombre de Reynolds d'une bactérie dans un milieu de viscosité cinématique semblable à celle de l'eau ($\nu \simeq 10^{-6}\,m^2 \cdot s^{-1}$) vaut environ $Re = \frac{VL}{\nu} = \frac{20\,\mu m \cdot s^{-1} \times 1\,\mu m}{10^{-6}\,m^2 \cdot s^{-1}} = 2 \cdot 10^{-5}$. Pour faire une comparaison à notre échelle de $1,8\,m$, cela équivaut à nager avec une vitesse de $1\,m \cdot s^{-1}$ dans un fluide ayant la même viscosité que la poix utilisée dans l'expérience « la plus lente du monde » $\nu = 10^5\,m^2 \cdot s$ [37].

BS, comme *Escherichia coli* (une autre bactérie bien connue), se déplace dans son environnement en faisant une marche aléatoire. Lorsque les moteurs des flagelles tournent dans le sens trigonométrique, les flagelles s'assemble en un faisceau de forme helicoïdal, et la bactérie avance de manière rectiligne (run). En revanche, quand les moteurs tournent dans le sens horaire, le faisceau de flagelles se désassemble, la bactérie s'arrête, et tourne sur elle-même (tumble). L'enchainement de runs et de tumbles matérialise une marche aléatoire. Grâce à cela, la bactérie explore son environnement. Dans le cas où celui-ci est homogène, un run dure environ $1\,s$ et un tumble environ $0,1\,s$.

Lorsque l'environnement de la bactérie n'est pas homogène, elle est capable de modifier sa marche aléatoire pour se diriger vers une zone plus « favorable ». Pour cela, elle biaise sa marche aléatoire en allongeant la durée de ces runs lorsqu'ils sont orientés dans la direction de la zone favorable.

1.2.2 Tactisme

BS est particulièrement connue pour faire de l'aérotactisme [119, 22, 122], c'est-à-dire qu'elle va en direction des zones riches en dioxygène. Pour cela, elle possède notamment les récepteurs membranaires HemAT qui lui permettent de mesurer la concentration du dioxygène [124]. Le mécanisme lié à l'aérotactisme a beaucoup été étudié dans le cadre de l'attirance vers d'autres molécules (acides aminés, glucose...). La bactérie utilise alors d'autres récepteurs et on appelle son comportement chemotactisme [41, 90, 105, 106].

Les récepteurs de la cellule sont des protéines ancrées dans la membrane. Lorsque un récepteur capte une molécule (ligand), il s'active et induit la phosphorylation d'une protéine membranaire *cheA*. Cette protéine échange ensuite son atome de phosphore avec une protéine cytoplasmique *cheY* qui devient *cheY-P*. *CheY-P* migre dans le cytoplasme, se lie à un des moteurs, et active sa rotation dans le sens trigonométrique (dans le cas de BS), ce qui a pour effet d'allonger le run de la bactérie. Le signal allant des récepteurs jusqu'aux moteurs est transmis en une fraction de seconde ($0,1\,\mathrm{s}$). Le système de signalisation contient une boucle de rétroaction lente (plusieurs dizaines de secondes). Celle-ci permet aux récepteurs de s'adapter à la concentration ambiante en ligands. Pour cela, les récepteurs membranaires sont capables d'accueillir des groupements méthyles qui modulent leur probabilité d'être activés quand un ligand se fixe dessus. Plus ils sont méthylés, plus il faudra de ligands pour les activer. Ce sont les protéines *cheR* et *cheB* qui contrôlent l'équilibre de méthylation du récepteur, *cheR* le méthyle et *cheB* le déméthyle. L'activité de ces protéines dépend de celle de *cheA*, donc lorsque les récepteurs activent *cheA* ils s'inhibent également, et inversement s'ils désactivent *cheA* ils s'activent [87, 3, 104]. Ainsi, lorsque la concentration ambiante en ligand redevient constante après un changement, la bactérie s'adapte et recouvre une marche aléatoire non biaisée.

L'adaptation se produit à une échelle de temps lente par rapport au temps de transmission du signal des moteurs vers les récepteurs. Cela offre un dispositif permettant aux cellules de se rappeler leur état passé récent et de le comparer à leur situation actuelle [66, 111, 93]. Cette comparaison temporelle permet aux bactéries de mesurer les gradients de concentration en ligands. Lorsqu'elle remonte un gradient d'attractant, la durée des runs augmente.

De manière remarquable, les bactéries sont sensibles à des variations de concentration en ligands infimes (de l'ordre de $3\,\mathrm{nM}$), ou à des variations 100000 fois plus grandes [70]. Ces observations traduisent la présence d'un

mécanisme sophistiqué qui permet d'amplifier le signal que produit la variation en ligands sur plusieurs ordres de grandeur. Le mécanisme expliquant un gain prodigieux n'est pas totalement élucidé [14], mais certains auteurs ont montré qu'une grande amplification du signal à lieu au niveau des récepteurs [98] ou au niveau des moteurs [24].

En résumé, les bactéries sont donc des êtres unicellulaires qui, sous leur apparente simplicité, recèlent des mécanismes prodigieux. Ceux-ci leur permettent de mesurer leur environnement et de réagir en conséquence. Les interactions avec leur environnement peuvent, à l'échelle d'une population, conduire à de véritables comportements collectifs.

1.3 Comportements collectifs

Les comportements collectifs des bactéries sont l'ensemble des phénomènes qui émergent à partir d'une population de bactéries. Cette catégorie de phénomènes englobe de multiples manifestations qui s'expliquent par différents types d'interactions.

1.3.1 Mouvements collectifs

De nombreuses études rapportent des phénomènes collectifs qui ont trait au mouvement des bactéries. Certaines d'entre elles décrivent des observations faites sur des gels à l'échelle macroscopique, c'est-à-dire visibles à l'oeil nu. En fonction des conditions de culture, les auteurs observent que les colonies de bactéries forment différents motifs [16]. Ces motifs s'expliquent grâce au chemotactisme des bactéries [17]. Dans les cultures liquides concentrées en bactéries, d'autres observations ont montré que les bactéries sont capables de migrer en direction d'une source de nutriment. Cette migration collective se traduit par l'apparition de bandes, concentrées en bactéries se propageant dans le milieu [2, 91], et une fois encore c'est le chemotactisme qui explique ce phénomène.

Des mouvements collectifs semblables à ceux des bancs de poissons ou des nuées d'oiseaux [20] ont aussi été observés. Le mouvement des bactéries est alors corrélé sur des distances plus grandes que la taille d'une cellule. Ces corrélations s'expliquent par un autre type d'interaction : les interactions hydrodynamiques [34] qui sont dues aux courant générés par la nage des bactéries. Dans les cultures concentrées en bactéries, ces interactions peuvent

mener à des mouvements turbulents [116, 21, 97, 31] ou même générer des micro-courants dans le fluide [118].

De plus, la migration collective des bactéries peut engendrer d'autres phénomènes collectifs, mais cette fois à l'échelle macroscopique. Certaines études ont montré que le fluide peut être mis en mouvement à l'échelle macroscopique grace à la migration collective de micro-nageur (bactéries, algues...) [45, 47, 46, 51, 108]. Dans ce cas, ce sont les forces de gravité qui sont la cause du mouvement, car les bactéries sont légèrement plus denses que l'eau. BS a par exemple une masse volumique d'environ $1,03\,\mathrm{kg.L}^{-1}$.

1.3.2 Communication entre bactéries

D'autres mécanismes permettant aux bactéries d'agir non seulement de manière collective mais en plus de manière concertée ont été identifiés. En effet, des voies de communication ont été identifié par phéromones ou contacts [18, 6]. Les signaux peuvent avoir différents buts : donner des informations aux bactéries voisines, ajouter une contribution aux signaux déjà émis, ou encore brouiller l'information transmise par d'autres bactéries. BS est notamment connue pour excréter des exopolysaccharides (EPS), des tensio-actifs (bslA) ou le peptide comX.

La présence de ces molécules dans le milieu permet aux cellules qui les captent de mesurer le nombre de voisins qui les entoure. Ce mécanisme est appelé le *Quorum sensing*. Grâce à celui-ci, les bactéries peuvent coordonner leur activité et former des structures multicellulaires telles qu'un biofilm.

1.4 Biofilms

1.4.1 Généralités

Les bactéries sont des êtres unicellulaires, mais elles ne vivent pas toujours de manière isolée. Au contraire, elles construisent des tissus multicellulaires appelés biofilms, qui sont leur habitat privilégié [26, 27, 44].

Les biofilms se forment sur les interfaces solides ou liquides. Par exemple, dans une rivière les pellicules visqueuses sur les cailloux sont souvent des biofilms, la plaque dentaire en est un, les canalisations d'eau en sont parfois envahies, les racines des plantes en accueillent, et les tubes digestifs en sont tapissés [25].

Un biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de bactéries. En son sein reigne une réelle organisation, et certains auteurs n'hésitent pas à les comparer à des villes bactériennes ou des êtres multicellulaires [114, 76]. D'un point de vue fondamental, il est donc intéressant d'étudier le comportement de cet être.

D'un point de vue plus pragmatique, les biofilms ont des impacts majeurs sur les activités humaines [29]. En médecine ils sont la principale cause de maladies nosocomiales du fait de la résistance aux antibiotiques qu'ils confèrent aux bactéries [77]. Ils peuvent aussi altérer par corrosion les surfaces sur lesquelles ils sont fixés, créer des bouchons dans les canalisations, diminuer le transfert thermique des chaudières... Dans le secteur naval, ils augmentent la rugosité des coques de bateaux provoquant leur ralentissement ainsi qu'une consommation accrue en carburant [92].

Il est également possible de tirer profit des biofilms. Dans le traitement des eaux usées ils sont utilisés dans différents procédés de purification (filtration, lit fluidisé, méthanisation), dans le secteur du bâtiment on les utilise comme anti-fuite [10], dans le secteur de l'énergie ils entrent dans la composition de biopiles [35].

Les biofilms ont donc un rôle majeur dans la faculté des bactéries à coloniser des environnements variés et à résister à une multitudes d'agressions externes. En outre, ils ont des répercutions importantes sur l'activité humaine. et l'éventail de leurs applications reste encore largement à explorer [71].

1.4.2 Formation

On reconnait plusieurs phases dans le processus de formation d'un biofilm [77, 1, 101]. La figure 1.2 résume le cycle du biofilm sur les surfaces solides proposé par George O'Toole et al[77]. On identifie cinq phases. La première décrit une population de bactéries nomades qui nagent dans un milieu liquide, on dit qu'elles sont dans l'état planctonique. La seconde phase décrit l'approche active d'une surface par certaines des bactéries planctoniques. Dans la troisième phase, certaines bactéries situées sur la surface changent de phénotype, c'est à dire qu'elles changent de comportement observable. Les bactéries se mettent à produire les protéines nécessaires à la formation d'un biofilm et elles se fixent à la surface de manière irréversible. La quatrième phase correspond à la construction d'un biofilm mature structuré. Et pour finir, la cinquième phase décrit l'émission par le biofilm de bactéries à l'état

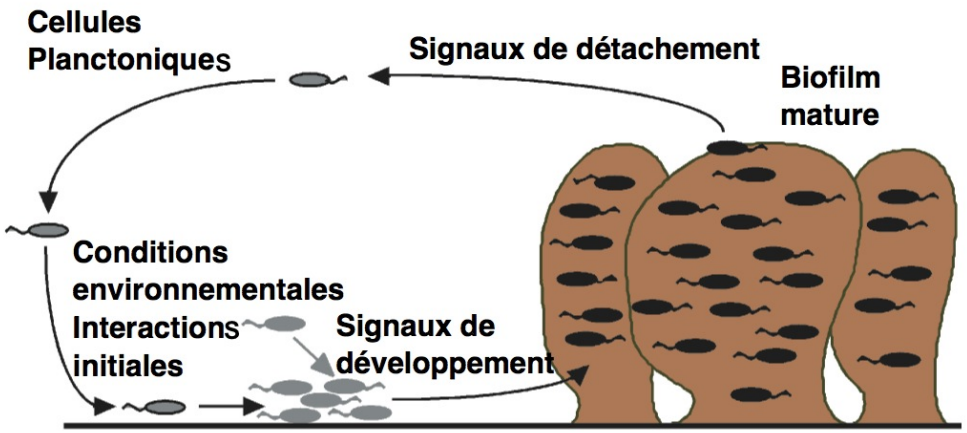


FIGURE 1.2 – Etapes de formation d'un biofilm. Schéma issue de [77]. En partant de bactéries dans l'état planctonique, les bactéries sont attirées vers une surface à cause de différents signaux. Là, elles interagissent les unes avec autres pour initier la formation d'un biofilm. Le biofilm mature une fois formé, certaine bactérie en sorte dans l'état planctonique pour aller coloniser d'autres surfaces.

planctonique qui vont coloniser d'autres surfaces.

La souche de BS que nous utilisons forme en revanche des bifolms sur les surfaces liquides. Le cycle du biofilm s'en trouve sûrement changé dans les détails mais les grandes lignes demeurent les mêmes.

Pour former un biofilm, BS met en oeuvre tout un processus génétiquement piloté qui implique un véritable changement de leurs caractéristiques observables, on parle de changement phénotypique [50, 53, 63, 73, 112]. Les bactéries qui sont d'abord dans un phénotype exhibant de la motilité (nomades) transitent vers un phénotype où elles sont immobiles et produisent de la matrice extracellulaire (sédentaires). Le changement de phénotype de BS au cours de la formation d'un biofilm a beaucoup été étudié [56, 64]. Les gènes qui permettent l'expression des composants de la matrice extracellulaire inhibent la production des protéines nécessaires à la motilité de la bactérie. Lorsque BS estime être dans le bon environnement pour construire un biofilm, deux sous-populations phénotypiques apparaissent. Cette transition fonctionne avec un mécanisme à seuil [19, 109] et permet de passer du

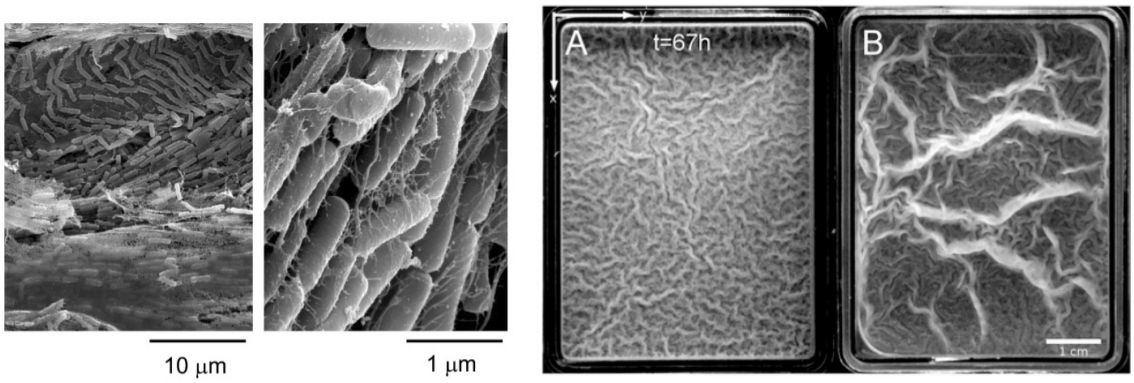
phénotype motile vers le phénotype producteur de matrice. La voie métabolique de cette transition a été identifiée [40, 19, 36]. Pour être plus précis, le *quorum sensing* active la production d'une protéine (SpoOA) qui active le phénotype producteur de matrice et réprime le phénotype motile [57]. SpoOA est connue pour avoir une expression bistable [19], ce qui explique qu'il y ait une transition abrupte d'un phénotype à l'autre [36]. Lorsque SpoOA est activée, les bactéries produisent de la matrice et elles cessent de produire des flagelles. De plus, elles ne se divisent plus en deux cellules séparées l'une de l'autre mais forment des structures semblable à des chapelets de cellules.

1.4.3 Elements constitutif d'un biofilm

Un biofilm est formé de bactéries liées par de la matrice extracellulaire [11, 78, 102]. La matrice a plusieurs fonctions : elle permet aux biofilms d'adhérer à une surface, elle protège les bactéries de l'environnement extérieur, et on lui prête également un rôle digestif car elle contient des enzymes qui métabolisent certains nutriments avant que les bactéries ne les ingèrent [38].

La composition de la matrice extracellulaire est très complexe. Dans le cas des biofilms de *Bacillus subtilis* on y trouve des polysaccharides EPS (*extracellular polymeric substance*), des protéines (TasA), de l'ADN ainsi que des lipides [48, 30, 38]. La quantité de matrice produite par les bactéries varie énormément en fonction de leur environnement. Celle-ci peut, par exemple, varier d'un facteur 100 entre différents types de milieux de culture. Le rapport de la masse de matrice par la masse de bactérie peut varier de 236% à 3% [30]. Certaines expériences permettent de visualiser la composition microscopique du biofilm en trois dimensions [11].

Dans un biofilm les bactéries, exhibent différents comportements (phénotypes) même si elles sont de souche identique. Il y a donc de la différenciation et de la spécialisation cellulaire à l'instar d'un tissu de cellules eucaryotes [64, 63]. Puisque les bactéries n'ont pas toutes le même phénotype, elles n'ont pas toutes la même fonction au sein du biofilm. Il y a une véritable répartition des tâches qui suit une certaine organisation à l'intérieur du biofilm [12, 30, 38, 68, 89, 99, 102, 110]. Chez BS, les proportions de chaque phénotype dans le biofilm est une quantité dynamique qui varie au cours du processus de formation [112]. Dans un biofilm se formant sur un gel nutritif, 12h après le début de la culture 70% des bactéries d'un échantillon du biofilm sont motiles et 29% d'un autre échantillon prélevé au même instant sont productrices de matrice. Ces proportions s'inversent ensuite, 24h après



(a) (b)

FIGURE 1.3 – Image de biofilms. La figure 1.3a montre l'image d'un biofilm de BS prise par microscopie électronique [72]. Nous voyons qu'il est constitué de bactéries liées par de la matrice de polymère. Sur la figure 1.3b nous montrons le biofilm de BS. Le biofilm est une pellicule qui se forme à l'interface eau-air [107]. La barre d'échelle fait 1cm.

le début de la culture 26% sont motiles et 81% sont producteur de matrice. Comme les échantillons ne sont pas les mêmes, la somme des pourcentages donnée précédemment peut dépasser 100% [112].

1.4.4 Morphologie

Les biofilms qui se forment sur des surfaces solides ont fait l'objet de nombreuses investigations. Des observations par microscopie ont mis en évidence qu'ils ont une architecture et une organisation particulières. La couche que forme un biofilm sur une surface a une structure hétérogène. Elle est faite de protrusions verticales en forme de champignons ou de « tige de haricot » entre lesquels on distingue des canaux qui laissent circuler le fluide environnant [55, 15, 26, 100, 96].

La structure des biofilms qui se forment sur une surface liquide a été moins étudiée. On leur connait cependant une architecture poreuse dans laquelle le fluide peut pénétrer et circuler [13, 12].

D'un point de vue macroscopique, les biofilms forment des rides caractéristiques de leurs propriétés visco-élastiques [107, 5]. Il a également été

observé qu'ils sont capables de s'étaler sur des surfaces verticales en modifiant les propriétés physico-chimique de la surface sur laquelle ils reposent, en produisant par exemple des tensio-actifs [4].

1.4.5 Auto-organisation et environnement : modélisation

La formation d'un biofilm fait intervenir de nombreux acteurs (les bactéries) qui interagissent ensemble. Alors, du point de vue d'un physicien, un biofilm est un système complexe, auto-organisé, qui sous-tend une transition entre une phase gazeuse (les bactéries nomades) et une phase solide (les bactéries sédentaires dans un biofilm).

Plusieurs travaux ont cherché à modéliser la formation de certains aspects des biofilms [80]. Ils se sont essentiellement focalisés sur les biofilms attachés à des surfaces solides.

Les modèles qui ont été développés, ont notamment cherché à comprendre comment se forme la structure des biofilms sur l'échelle d'une centaine de micromètres. Dans ce but, C. Picioreanu [83] a développé un modèle d'automate cellulaire qui reproduit la formation des structures en forme de champignon que l'on observe sur les surfaces solides. Dans son travail, il fait dépendre la vitesse de production de la biomasse du biofilm avec son approvisionnement en nutriments. Il modélise l'approvisionnement en nutriments par un processus diffusif, et parvient à reproduire la structure des biofilms qu'on voit sur les surfaces solides.

D'autres modèles utilisent une méthode basée sur des particules individuelles qui ont une position repérée dans un espace cartésien (*IdbM* pour individual based model) [75, 74, 121, 120]. Chaque particule étant de taille finie, ces modèles tiennent compte des contacts entre elles. Les particules individuelles peuvent évoluer dans des champs continus qui représentent l'environnement. Ces modèles ont été surtout utilisés pour étudier l'organisation interne des biofilms (toujours à l'échelle de la centaine de micromètres). Ils ont notamment permis d'examiner la compétition et la coopération entre les bactéries en leur sein. Ainsi, ces auteurs ont pu mettre en évidence certains des mécanismes qui expliquent l'organisation sous forme de patch des biofilms [58].

D'autres modèles ont pour but de comprendre l'influence de la motilité des bactéries dans la formation des biofilms sur les surfaces solides [81]. Toujours

basé sur un modèle de particules individuelles, ils étudient les conséquences d'un type de motilité (rampante) sur la structure du biofilm et les avantages écologiques qu'elle peut apporter. Ils montrent que la motilité n'est pas suffisante pour expliquer la formation des structures aériennes de biofilms qui poussent sur les surfaces solides. En revanche, tenir compte de l'attachement et du détachement des bactéries motiles sur le biofilms permet de l'expliquer. La présence des bactéries nageuses est donc importante pour la morphogenèse du biofilm.

Un autre type de modèle utilise une méthode uniquement basée sur des équations continues [62]. Dans ce travail, les auteurs se sont intéressés à la structuration des biofilms soumis à des cisaillements. Ce type de modèle est un autre outil qui permet d'étudier les interactions entre la biomasse et l'écoulement du fluide.

Pour conclure, on constate que beaucoup de travaux ont été menés pour étudier la formation des biofilms sur les surfaces solides. Tous ces modèles partent du principe qu'il y a déjà des bactéries fixées sur une surface solide (deuxième étape du cycle de la figure 1.2). Celles-ci produisent alors de la matrice extracellulaire en fonction de leur environnement nutritif, collaboratif, physique.

1.4.6 Etat de l'art des méthodes de modélisation

Les premiers modèles de croissance de biofilms sont des modèles continus résoluent dans une configuration monodimensionel. Leurs auteurs s'intéressent plus particulièrement à l'état stationnaire de la formation du biofilm. Ils cherchent à rendre compte de l'épaisseur finie des biofilms, de la repartition spatiales des microorganismes, et de la concentration des éléments du substrat dans une region proche du biofilm. Pour cela ils tiennent compte de différents mécanismes physiques : la croissance du biofilm par production de biomasse, la diffusion des éléments dans le substrat liquide et dans le biofilm, l'attachement et le détachement de la biomasse. Plusieurs conditions ont pu être étudié : croissance sans restriction, modifications de la concentration des éléments du substrat liquide, détachement de la biomasse[113]. Ces modèles ont permis de progresser dans la comprehension des interactions entre le biofilm et son substrat liquide. La modélisation monodimensionnelle, cependant, simplifie beaucoup les interactions entre le biofilm et son substrat. En outre, elles ne peuvent tenir compte de la dynamique spatiale de formation d'un biofilm, ainsi que de sa morphologie.

Les premiers modèles qui ont étudié la morphologie irrégulière des biofilms ont utilisé la méthode d'agrégation limitée par la diffusion (DLA pour diffusion limited agregation). La méthode DLA décrit l'agglomération de particules microscopiques. Pour cela elle part d'une particule fixe dans un espace (un noyau) et introduit une particule mobile à partir d'un bord de l'espace. Cette particule se déplacent alors avec une marche aléatoire dans l'espace jusqu'à se qu'elle touche une autre particule. Là, elle s'immobilise. On introduit alors une nouvelle particule mobile pour recommencer le processus. Ces modèles ont permis de reproduire la structure branchée des biofilms sur gel d'agar qui est observée expérimentalement dans certaines conditions [39, 69].

Par la suite, des modèles à automate cellulaire couplé à des champs continus ont été développé pour reproduire la formation d'un biofilm [84]. Ces modèles tiennent compte de l'environnement des bactéries pour expliquer la structure des biofilms (2D-3D). L'environnement est décrit par des champs continus qui évoluent selon des équations de reactions diffusion. Les bactéries sont décrites par paquets mesoscopiques contenants un grand nombre de bactéries. Chaque paquet évolue suivant certaines règles dans un espace divisé en cases. Les paquets peuvent bouger d'une case à l'autre ou se diviser sur une case voisine en fonction des conditions environnementale locale. Grace à ce genre de modèle il a été possible de reproduire les morphologies des biofilms (colonies branchées, extrusion de forme fongique) observées expérimentalement [7]. Ils prédisent que les biofilms plus épais se développent dans un régime de substrat limité avec une rugosité de surface, une porosité élevée et un faible degré de compacité. Quand la concentration du substrat augmente, biofilms devient progressivement une structure plus compacte et homogène [88]. Cependant ces modèles ne tiennent pas compte des effets hydrodynamiques appliqués par l'environnement sur les biofilms. Ces effets sont notamment important dans les processus essentiels d'attachement de la biomasse ou de transport des nutriments.

Ont été alors developpé des modèles cherchant à rendre compte de l'interaction fluide-biofilm comme celui de Picioreanu [80] qui utilise le concept d'automate cellulaire couplé à des équations de Navier Stokes. Les modèles hybrides discrets-continus produisent des résultats en bon accord avec les attentes expérimentales. Ils prédisent que l'érosion rend la surface du biofilm lisse et que la desquamation conduit à une augmentation de la rugosité de la surface biofilm. Les simulations montre également un effet d'avalanche dans la perte de la biomasse, et que les biofilms à croissance rapide ont un taux de détachement plus grand que ceux à croissance lente [82].

Cependant, il existe certains inconvénients associés aux processus aléatoires utilisés dans la méthode de redistribution de la biomasse avec la méthode des automates cellulaires. En effet ces méthodes de simulations dépendent des dimensions du pas grille utilisé dans les simulations, et une même condition initiale peut produire différents résultats. Des modèles déterministes basé uniquement sur des équations continues ont donc été écrit pour parait à ces problèmes. Tous ces modèles prennent en compte l'effet du fluide sur les biofilms. Ils prédisent que l'érosion rend la surface du biofilm lisse et que la desquamation conduit à une augmentation de la rugosité de la surface biofilm[123, 62].

Enfin, un dernier type de modèle a été proposé, basé sur des particules individuelles (IdM pour individuel based model). Ces modèles décrivent les bactéries comme des particules autonomes évoluant dans un substrat décrit par des équations continues. Le mouvement des particules autonomes est régit par des équations continues, ce qui en fait un modèle déterministe et surmonte les inconvénients associés à l'aspect aléatoire dans les modèles basés sur les automates cellulaires [59]. Ce type de modèle permet d'étudier directement la distribution spatiale des microorganismes dans le biofilm. Ainsi, ils permettent d'étudier l'écologie en sein des biofilms, c'est à dire la compétition et la coopération qui a lieu entre les différents types de bactéries (phénotype, souches, espèces) qui le constituent [74, 120]. Ces modèles permettent également d'étudier les interactions entre les entités élémentaires du biofilm, comme les bactéries. En effet, il y est aisé d'introduire une réaction comportemantale propre à chaque bactérie en réponse à leur environnement local (phéromones, nutriments, etc). Certains auteurs ont donc simulé la formation d'un biofilm sur une surface solides et étudie les règles suivies par les bactéries expliquants le morphologie des biofilms [81, 121].

1.5 Aperçu du travail de thèse

Dans le cadre de cette thèse nous nous intéressons particulièrement aux biofilms de *Bacillus subtilis* (souche B168), et nous nous sommes focalisés sur les premières phases de la formation de ses biofilms. Le but de cette thèse est de comprendre les processus qui mènent à la formation d'un biofilm à l'interface eau-air [107, 56] en combinant les approches expérimentale et théorique.

Dans un premier temps, (chapitre 2) nous présentons l'approche expé-

rimentale. Pour commencer, nous décrivons l'étude de la motilité de BS à l'échelle microscopique. Nous avons mesuré la vitesse instantanée de BS lorsqu'elle nage. Nous avons filmé BS en microscopie de fluorescence pour mesurer cette quantité sur un grand nombre de bactéries. Ce travail à nécessité l'optimisation de la production de protéine fluorescente GFP (pour *green fluorescent protein*) par la souche BSB168-GFP. Cette souche synthétise de la GFP en présence de la molécule d'*isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG). Nous avons alors étudié la production de GFP en fonction de la concentration d'IPTG dans le milieu de culture.

Nous décrivons ensuite l'évolution de la morphologie de BSB168 et BSB168-GFP en fonction, du temps, et de la croissance de sa population. Lors de cette expérience nous avons suivi à l'aide d'un microscope l'évolution de la longueur et de la largeur moyenne de BS. Pour observer l'influence de cette molécule sur le comportement de BS, l'étude est menée en présence et en absence d'IPTG dans le milieu de culture.

Enfin, nous présentons l'étude macroscopique de la distribution des bactéries dans le volume du milieu de culture au cours de la formation d'un biofilm. Pour cela, nous avons créé un dispositif qui permet de mesurer la concentration en bactéries de manière non destructive et non invasive. Le dispositif prend en parallèle de cette mesure des photos de la formation du biofilm. Ainsi, nous avons accès à l'évolution de la répartition des bactéries dans le volume du milieu de culture au cours de la formation d'un biofilm. Nous decrivons ensuite ces observations en en corrélation avec l'enregistrement de la formation du biofilm avec une camera. Enfin, nous comparons la croissance de la population bactérienne moyennée à l'échelle de la boite, dans le cas où un biofilm se forme, par rapport le cas où un biofilm ne se forme pas.

Dans un second temps, nous exposerons l'approche théorique. Nous décrirons les modèles développés sur la base de nos observations expérimentales.

Le premier modèle décrit dans le chapitre 3 se concentre sur la toute première étape de migration des bactéries vers la surface où se forme le biofilm. Le modèle est basé sur des équations continues du type Keller-Segel [54]. Il décrit l'évolution de la concentration en bactéries couplée avec l'évolution de la concentration en dioxygène. Le modèle est résolu numériquement dans un système à une dimension.

Puis, nous présenterons une extension du modèle précédent tenant compte des mouvements du fluide. L'évolution du champ de vitesse du fluide est couplée avec la concentration en bactéries via un terme qui tient compte de

la différence de masse volumique entre les bactéries et le milieu de culture. Le système sera décrit et résolu numériquement en deux dimensions.

Les modèles aux équations continues sont pratiques pour décrire l'évolution de champs. En revanche, la formation d'un biofilm s'apparente à une transition gaz-solide, ce qui nécessite de pouvoir bien décrire l'interface. Il est alors plus commode d'utiliser une description des bactéries en termes de particules individuelles. Nous présenterons dans le chapitre 4 un nouveau modèle qui prend en compte la nage des bactéries individuelles, ainsi que leur transition vers un phénotype qui leur permet de former un solide mou à l'interface eau-air. Les bactéries sont représentées par des particules individuelles qui évoluent dans un environnement décrit par des champs continus. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un tel modèle est formulé pour la formation d'un biofilm à l'interface eau-air. Nous donnons dans un premier temps les détails techniques de sa mise en oeuvre. Puis, dans un second temps, grâce à une étude paramétrique, nous analysons l'influence de certains éléments du modèle sur la dynamique de formation et la structuration d'un biofilm.

Chapitre 2

Formation d'un biofilm : expériences

2.1 Objet d'étude

2.1.1 Problématique

Les biofilms de *Bacillus subtilis* (BS) se forment à la l'interface liquide-air de son milieu de culture. Nous utilisons les souches BSB168 et BSB168-GFP parce qu'elles sont couramment utilisées en laboratoire. BSB168 est une souche de BS domestique qui a besoin de tryptophan pour son métabolisme. BSB168-GFP est une souche de BS issue de BSB168 dans laquelle est inséré le gène de la protéine GFP (*green fluorescence protein*).

Les questions qui nous intéressent particulièrement sont : qu'est ce qui peut expliquer que BS forme des biofilms spécialement à l'interface liquide-air ? Quelles sont les étapes de la morphogenèse du biofilm ? Quel comportement ont les bactéries dans le milieu liquide ?

La problématique sous-jacente interroge le lien qui s'opère entre le comportement microscopique des bactéries et les structures macroscopiques qu'elles créent (tel un biofilm). En effet, il existe plusieurs échelles caractéristiques significatives pour étudier le processus de formation d'un biofilm. A l'échelle moléculaire on peut par exemple étudier les molécules qui constituent le biofilm ou les récepteurs de la membrane bactérienne. A l'échelle cellulaire on peut étudier la motilité de bactéries en fonction de leur environnement. A l'échelle d'une population bactérienne on peut étudier la communication entre bactéries. A l'échelle macroscopique on peut étudier la rhéologie du

biofilm, ou les étapes de sa formation visible à l'oeil nu. Dans le travail que nous présentons ici, nous nous sommes placés à différentes échelles.

Dans un premier temps, en nous plaçant à l'échelle microscopique, nous avons cherché à quantifier l'évolution de la morphologie de BS (sa taille) au cours de son augmentation de population en milieu liquide. En effet, certaines études nous ont appris que la formation d'un biofilm par BS sous-tend un changement de sa morphologie [56, 65]. On sait également que chez *E. coli* [67] la taille des bactéries est corrélée avec leur taux de consommation en dioxygène.

La motilité des bactéries étant un paramètre important pour la formation des biofilms [86], nous avons cherché à quantifier la vitesse de propulsion de BS dans un milieu liquide. Cette mesure nous à conduit à réaliser une calibration de la fluorescence de BSB16-GFP induite par *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG).

Dans un second temps, nous nous sommes placés à l'échelle macroscopique. Nous avons suivi l'évolution de la répartition des bactéries dans le milieu de culture au cours de la formation d'un biofilm. Puis, nous avons corrélé la répartition de la concentration en bactéries avec la cinétique de formation d'un biofilm.

2.1.2 Conditions expérimentales

Les bactéries sont constamment manipulées dans des conditions stériles. Sans ces conditions d'autres organismes se développeraient dans les cultures ce qui aurait pour effet de perturber, détruire ou tout au moins biaiser les expériences que nous souhaitons réaliser. Aussi, tous les ustensiles que nous utilisons sont stériles. La verrerie recyclable est stérilisée par autoclave de 20 minutes à 121 ºC, et les ustensiles non recyclables (pipettes, boîte de pétri) sont achetés stériles et constamment manipulés à quelques centimètres d'une flamme.

2.2 Mesures microscopiques

2.2.1 Optimisation de la fluorescence

Dans BSB168-GFP, le gène *gfp* se situe sur le chromosome de la bactérie à la suite du gène *lacI* et de l'opérateur de l'opéron lactose. Le gène

lacI code pour une protéine répresseur qui vient se fixer sur l'opérateur de l'opéron. Les gènes consécutifs à l'opérateur ne sont donc pas exprimés lorsque l'opérateur est occupé par le repressseur. On peut empêcher la proteine represseur de se fixer sur l'opérateur grâce à la molécule *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) qui neutralise la proteine en se liant à elle . Ainsi, en présence d'IPTG, la bactérie transcrit les gènes en aval de l'opérateur, elle produit donc la protéine GFP et devient fluorescente. Il est important de noter que l'IPTG n'est pas dégradé par les bactéries. Le gène de GFP est également associé avec un gène de résistance à l'antibiotique spectinomycine (produit même en l'absence d'IPTG). BSB168-GFP se cultive dans un milieu de culture ayant cet antibiotique, de sorte que seul les bactéries porteuses du gène de résistance (et donc du gène de GFP) survivent.

Nous avons optimisé la fluorescence de la souche en réalisant une étude de la production de GFP par bactérie en fonction de la concentration d'IPTG dans le milieu de culture. Le but étant que les bactéries ¨fluorèscent¨ le plus rapidement avec une intensité maximale.

2.2.1.1 Définition de la densité optique (DO)

La DO est une évaluation de la turbidité de la culture. Le principe est le suivant : la lumière passant à travers un milieu contenant de petites particules est dispersée par ces dernières. Plus il y a de particules, plus la lumière est dispersée. Ainsi, en mesurant l'atténuation de l'intensité de la lumière qui ressort sans déviation du milieu de culture on peut estimer instantanément la concentration en bactéries. Dans un régime dilué la DO est proportionnelle à la concentration en bactéries.

2.2.1.2 Protocole

Le spectrophotomètre GS08-Fluorimeter© (TECAN) permet de mesurer la fluorescence émise par une culture dans une plaque multi-puits. Nous avons utilisé les plaques stériles Biofil© 24 puits pour tester différentes concentrations d'IPTG dans le milieu de culture. Le milieu est donc constitué par du LB (voir annexe pour la composition et les conditions expérimentales) dans lequel on ajoute une dose d'IPTG. Les doses testées sont les suivantes : 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Présentation du protocole :

1. La veille de l'expérience mettre en culture une colonie de BSB168-GFP prélevée sur gel de LB-agar contenant de la spectinomycine ($100\,\mu g \cdot ml^{-1}$) dans un tube qui contient du LB et $50\,\mu g{\cdot}ml^{-1}$ de spectinomycine, à 37°C et agiter à 240 rpm.
2. Le jour de l'expérience, remplir neuf puits avec $600\,\mu l$ de LB pur. Dans chacun des puits, diluer 1000 fois la culture de BSB168-GFP préparée la veille. La plaque est ensuite recouverte d'un film plastique pour éviter l'évaporation du liquide contenu dans les puits et empêcher toute contamination. Placer ensuite la plaque dans le GS08-Fluorimeter© qui l'agite à 240 rpm tout en la maintenant à 37°C.
3. Au bout de 1 h40 de culture, sortir la plaque du spectrophotomètre et injecter les doses d'IPTG que l'on souhaite tester dans huit des neufs puits. Le neuvième puits fait office de contrôle car il ne contient pas d'IPTG. La plaque est ensuite remise avec un nouveau film plastique dans le spectrophotomètre dans les mêmes conditions.

Pour chaque évaluation de la fluorescence dans un puits, nous faisons une mesure en cinq points différents. Pour cela nous éclairons la culture avec une lumière de longueur d'onde 485 nm (excitation de la GFP) et nous mesurons l'intensité de la lumière émise à 530 nm. Le gain du détecteur est réglé à 50 et son temps d'intégration à $20\,\mu s$. Le nombre de flash produit par la lampe pour la mesure d'un point est de 5. Les points sont répartis comme indiqué sur la figure 2.1.

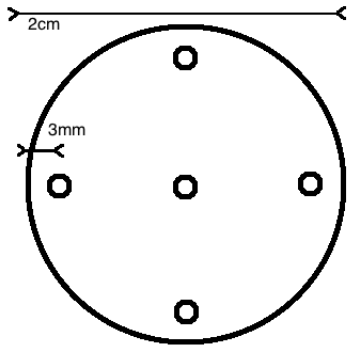


FIGURE 2.1 – Schéma de la répartition des points pour la mesure de fluorescence dans les puits de la plaque biofil. Le dessin n'est pas à l'échelle mais donne les distances importantes pour la configuration de la prise de mesure.

A chaque mesure de fluorescence, on prend également une mesure de la densité optique (DO) de la culture. La DO est prise en cinq points différents dans le puits en faisant passer un faisceau laser verticalement à travers la culture. Les points sont répartis comme sur la figure 2.1. La mesure multi-points permet d'obtenir une DO qui correspond au trajet optique moyen de la lumière dans la culture. En effet, en raison de la présence d'un ménisque à la surface du milieu, le trajet optique de la lumière varie selon l'endroit où la mesure est faite.

Pour savoir si la protéine GFP qui produit la fluorescence du milieu se trouve dans les bactéries ou dans le milieu de culture, il faut mesurer la fluorescence du surnageant à la fin de l'expérience. Nous prélevons et centrifugeons doucement la culture dans chacun des puits à 2806g. Nous récupérons les surnageants issus de la centrifugation et nous mesurons la fluorescence à l'aide du même protocole que précédemment (plaque 24 puits biofil©, 5 points de mesure).

Le volume de surnageant ($250\,\mu$L) qui est remis dans chaque puits d'une nouvelle plaque multi-puits est plus faible que le volume mis dans les puits au début de l'expérience ($600\,\mu$L). La zone du milieu excitée par la lumière est alors plus petite car le liquide monte moins haut dans les puits. Pour pouvoir comparer la fluorescence d'une culture avec celle de son surnageant on applique alors un facteur de proportionnalité égal au ratio du volume introduit dans chaque puits ($250\,\mu$L) par rapport à $600\,\mu$L. Tous les volumes sont mesurés avec précision grâce à une pipette micrométrique.

2.2.1.3 Effet de l'IPTG sur la croissance bactérienne

Nous cherchons à savoir si l'IPTG a une influence sur la multiplication des bactéries dans le milieu de culture. Pour ce faire, nous mesurons la DO en fonction du temps.

L'évolution de la DO dans chaque puits pendant les 66 h de la durée de l'expérience est représentée à la figure 2.2. La DO brute prise par le spectrophotomètre reste à son niveau initial pendant une phase de 4 h. A partir de 4 h elle augmente brusquement pendant 4 h pour atteindre une DO de $0,7$, ce qui correspond à plus de 7 fois son niveau initial. Puis, après une courte phase de saturation de 1 h, elle redescend aussi rapidement qu'elle est montée, en 2 h elle atteint la valeur de $0,45$. Il y a ensuite une phase de stabilisation qui dure 8 h. Pour finir, la DO entre dans une phase de lente diminution. A la fin de l'expérience elle a diminué jusqu'à une valeur

d'environ $0,25$ pendant une durée de 22 h.

Chacun des 9 puits suit exactement le même schéma d'évolution de la DO avec la même synchronisation. Nous remarquons que l'évolution de la population des bactéries est strictement la même au début de la croissance jusqu'à la phase de saturation qui commence 10 h après l'inoculation. Par la suite, l'évolution de la concentration en bactéries entre les différents puits reste synchronisée, même si il y a des légers décalages de la DO dans les phases de décroissance.

Nous en concluons que la concentration en IPTG n'influence pas la croissance de la population de BSB168-GFP. En outre, la plus forte concentration que nous avons essayée ($2000\,\mu$mol.L^{-1}) ne semble pas nocive.

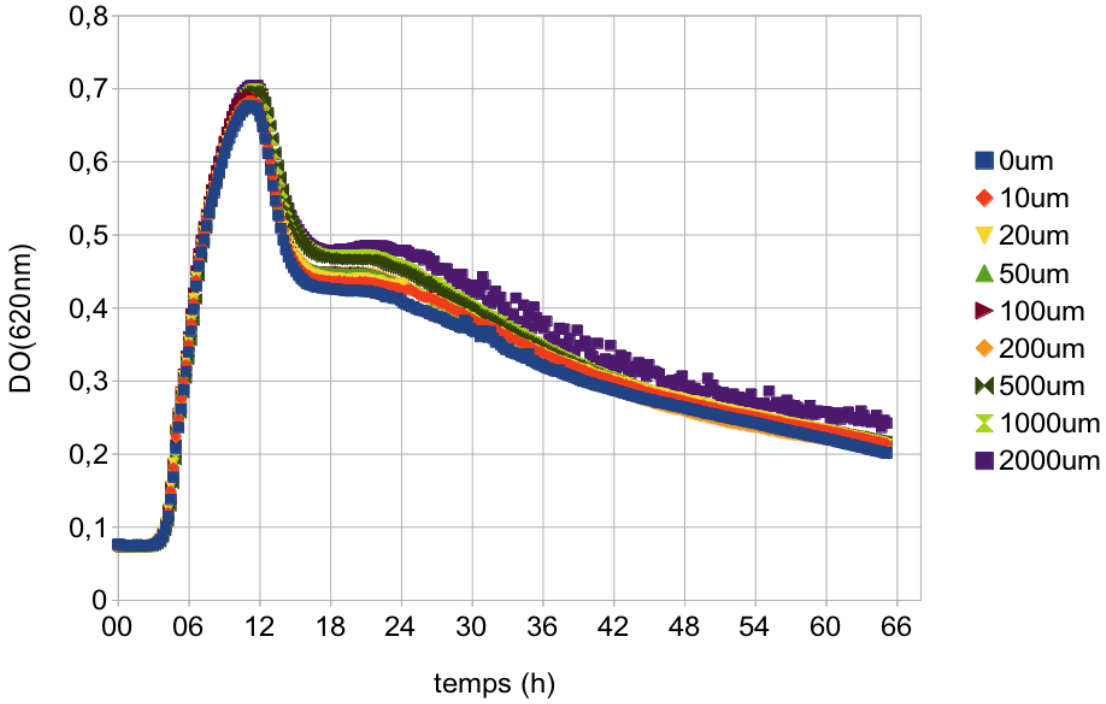


FIGURE 2.2 – Courbe de l'évolution de la DO en fonction du temps pour neuf cultures de BSB168-GFP. Chaque culture à une concentration d'IPTG différente (la légende de chaque couleur est à droite de la figure la concentration est en 1um = 1μmol·L^{-1}).

2.2.1.4 Evolution de la fluorescence au cours du temps

La mesure de la fluorescence au cours du temps est montrée dans la figure 2.3. La fluorescence augmente dans chaque puits qui contient de l'IPTG. Jusqu'à la concentration de 1000 μmol·l^{-1}, plus il y a d'IPTG plus la fluorescence obtenue à la fin de l'expérience est grande (de manière non proportionnelle voir aussi figure 2.5 plus loin). La fluorescence dans le milieu commence à augmenter à partir de 4 h après l'inoculation (comme la DO). L'augmentation de la fluorescence de 4 h à 12 h après le début de l'expérience, est identique pour les concentrations allant de 500 μmol.L^{-1} à 2000 μmol.L^{-1}. Pour les concentrations plus petites la fluorescence n'augmente pas aussi rapidement.

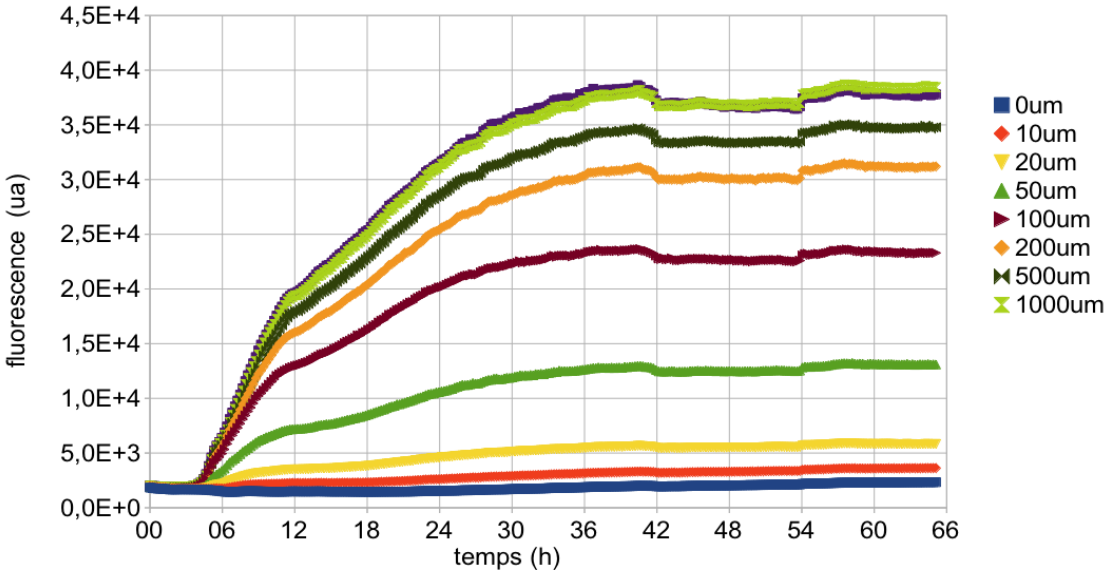


FIGURE 2.3 – Evolution de la fluorescence de culture de BSB168-GFP pour différentes concentrations d'IPTG (légende à droite en 1μM = 1μmol.L^{-1}). Plus la concentration en IPTG est élevée plus la culture est fluorescente. La saturation est atteinte à 36 h. L'anomalie entre 42 h et 66 h n'est pas significative elle correspond à une intervention de l'opérateur.

Si on trace l'évolution de l'intensité de fluorescence divisée par la valeur de la densité optique on obtient les courbes de la figure 2.4.

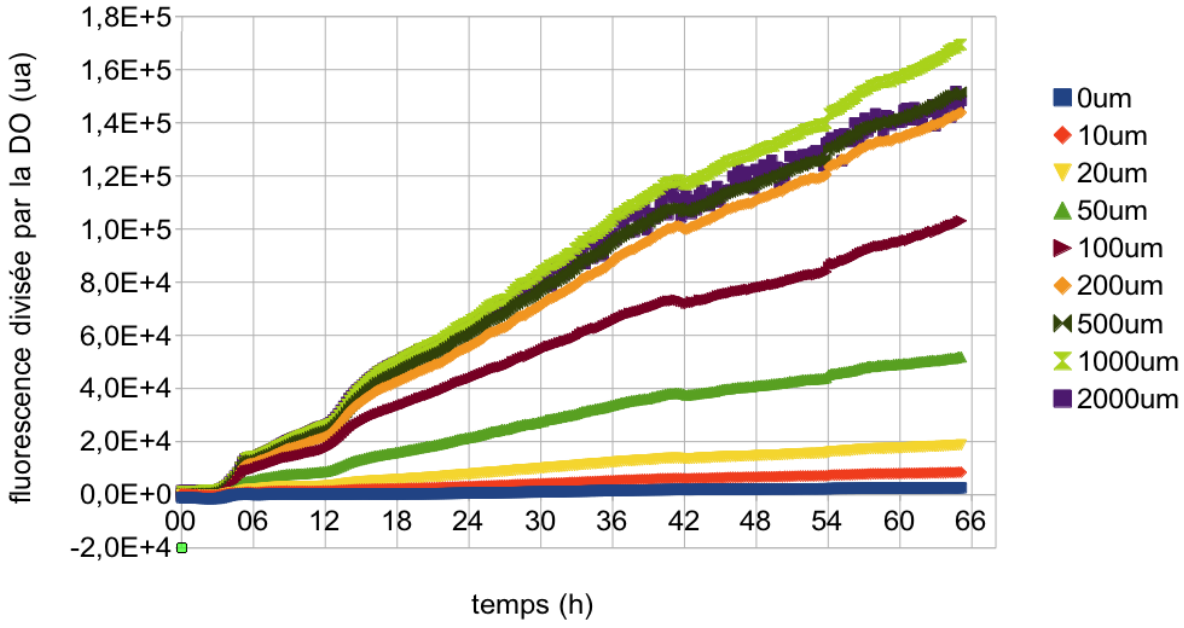


FIGURE 2.4 – fluorescence divisée par la DO dans chaque culture de BSB168-GFP

L'analyse des courbes nous indique que la fluorescence augmente globalement de manière linéaire avec le temps. Cela veut dire que le taux de production de GFP par bactérie est constant au cours du temps. Le taux de production maximum est atteint à partir de 200 μmol.L^{-1} d'IPTG dans le milieu.

Les questions qui se posent sont :

— où est localisée la protéine GFP dans la culture ?

— A la fin de l'expérience, est-elle à l'intérieur des bactéries ou a-t-elle été relarguée dans le milieu ?

Après avoir prélevé le surnageant dans chaque culture et appliqué le facteur de proportionnalité entre le volume du surnageant et le volume de la culture, on obtient l'histogramme de la figure 2.5. Il ressort que plus il y avait d'IPTG dans le milieu, plus la quantité de GFP dans le surnageant est importante. Cela correspond bien aux observations mentionnées dans la figure 2.3.

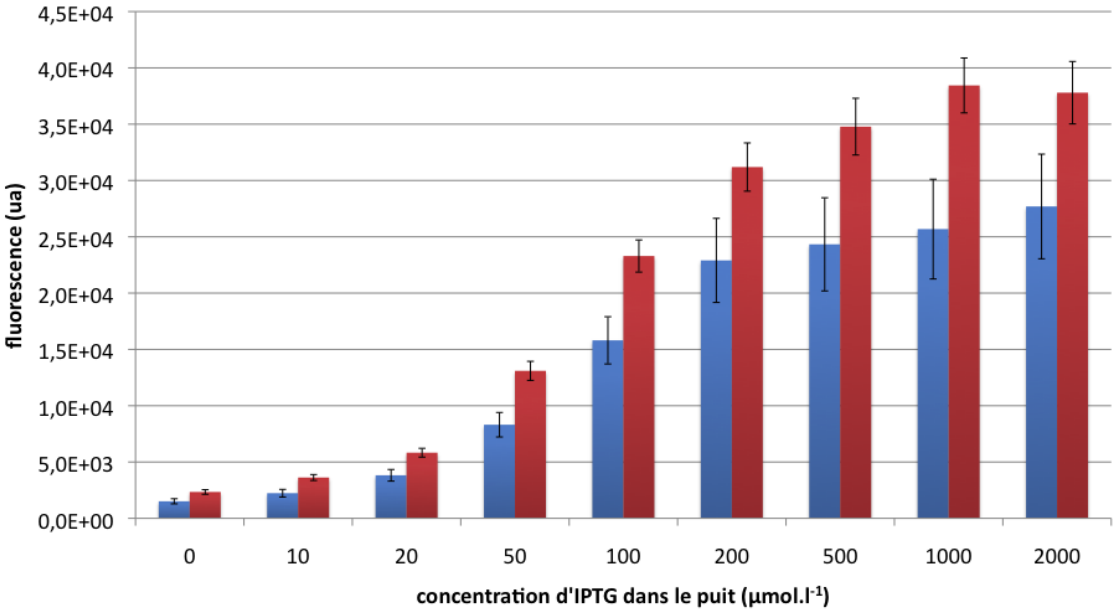


FIGURE 2.5 – Fluorescence du surnageant en bleue comparée à la fluorescence de la culture à la fin de l'expérience en rouge (66 h d'incubation). Chaque barre représente la valeur moyenne des cinq mesures prises par puits. On affiche également la déviation standard de la valeur entre les cinq points.

La majeure partie de la fluorescence à la fin de l'expérience semble donc se trouver dans le surnageant comme l'indique l'histogramme. Les bactéries ont probablement relargué la GFP qu'elles avaient dans leur cytoplasme dans le milieu de culture. Cela a pour conséquence l'augmentation de la fluorescence moyenne du milieu avec le temps.

Par ailleurs, le LB est fluorescent en lui même avec un niveau d'environ 2500 ua (unité arbitraire). Ceci correspond à la fluorescence produite par les bactéries 5 h après leur mise en culture et 3 h après que nous leur ayons inoculé de l'IPTG à une concentration d'au moins 200 μmol.L^{-1}.

2.2.1.5 Conclusion

L'induction de la fluorescence de BSB168-GFP dans du LB à 37°C est optimale avec une concentration en IPTG d'au moins 500 μmol.L^{-1}. Par ailleurs, aucun effet de l'IPTG sur la croissance n'a été relevé même avec la plus haute dose testée (2000 μmol.L^{-1}).

Nous observons qu'il faut environ 3 h après l'injection d'IPTG dans le milieu pour que la fluorescence produite par les bactéries devienne significative. Le LB étant fluorescent lui aussi, cela impose des contraintes pour l'observation de BS par microscopie de fluorescence comme de limiter au maximum l'épaisseur excitée par la lumière. En effet, plus on excitera le milieu environnent, moins le contraste avec les bactéries sera important.

2.2.2 Mesure de la taille

Nous avons observé la proportion dans laquelle la taille de BS varie au cours de l'augmentation de la population.

Nous avons voulu étudier la taille de BSB168 et BSB168-GFP dans deux milieux de culture que nous utilisons couramment. Le premier correspond à du LB pur. Le second milieu est fait de LB pur dans lequel on ajoute $500\,\mu$mol.L^{-1} d'IPTG pour faire produire à BSB168-GFP des protéines GFP comme précédement décrit dans la section 2.2.1.4.

2.2.2.1 Protocole expérimental

Présentation des différentes étapes du protocole :

1. Préparer du milieu de culture LB en conditions stériles. Dans une fraction de celui-ci ajouter, toujours de manière stérile, $500\,\mu$mol.L^{-1} d'IPTG préalablement filtré sur membrane $0,22\,\mu$m.
2. La veille de l'expérience prélèver une colonie de BSB168 et une colonie de BSB168-GFP d'une culture sur gel LB-agar. Chaque colonie est insérée dans du milieu LB et mise en culture toute la nuit à 37°C et agitée à 240 rpm.
3. Verser dans trois erlenmeyers stériles un volume de milieu de culture 20 fois plus petit que le volume total des l'erlenmeyer. Grâce à cette précaution, la culture a une grande surface d'échange avec l'air pour une faible profondeur. Avec l'effet supplémentaire de l'agitation, la culture est donc bien oxygénée. Deux des erlenmeyers sont remplis avec du LB et le troisième de LB plus $500\,\mu$mol.L^{-1} d'IPTG. Puis, diluer mille fois un échantillon des cultures bactériennes préparées la veille pour obtenir trois types de culture : BSB168 dans du LB, BSB168-GFP dans du LB et BSB168-GFP dans du LB avec IPTG.

4. Les erlenmeyers sont ensuite placés à 37°C avec une agitation de 240 rpm. Ne pas fermer totalement l'erlenmeyers pour laisser filtrer de l'air à travers leur bouchon.

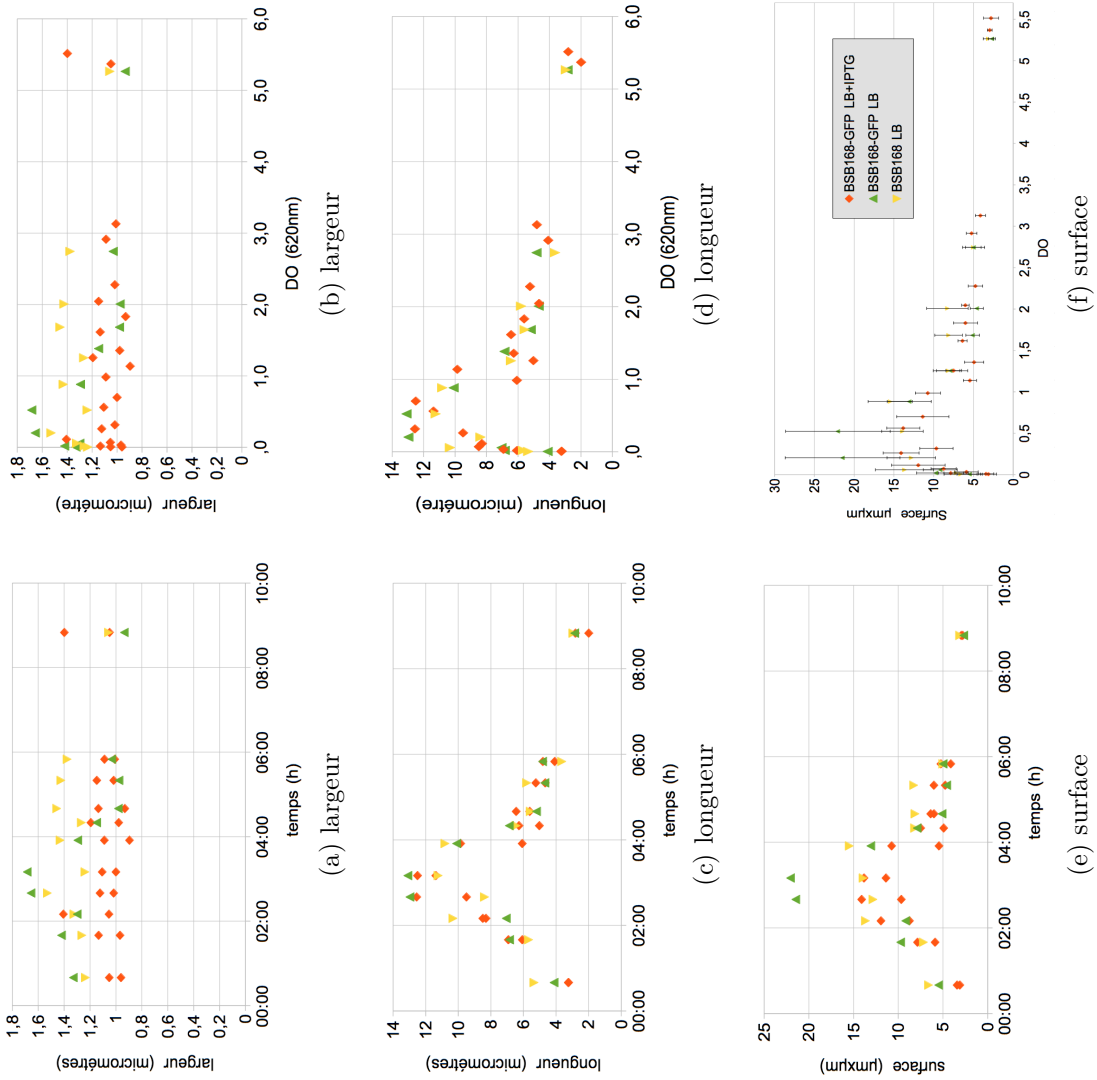
A chaque mesure nous prélevons un échantillon de 1 mL de culture de manière stérile. Nous mesurons la DO de l'échantillon et nous en déposons une goutte de 10 μL entre une lame et une lamelle en verre. Avant leur utilisation elles sont nettoyées avec de l'alcool à 90ºC et un mouchoir optique. La lame est ensuite placée dans un microscope droit à contraste de phase avec un objectif 10x et un oculaire de 0,5x. Nous prenons quelques photos à différents endroits de la lame avec une camera (XCD100 Sony). On répète la mesure onze fois en dix heures avec des intervalles de temps rapprochés entre 0 et 6 heures.

Par la suite, le grossissement de l'ensemble microscope-camera est calibré à l'aide d'une échelle pour convertir les dimensions en micromètres.

2.2.2.2 Analyse de l'évolution de la morphologie de *Bacillus subtilis*

A l'issue de l'expérience, nous obtenons des clichés de bactéries à différents instants de la croissance de la population. *Bacillus subtilis* a une forme en bâtonnet ; ses dimensions peuvent donc se résumer à une section (ou largeur) et une longueur. Le logiciel ImageJ nous sert à mesurer les dimensions latérale et longitudinale de chaque bactérie que l'on voit dans le champ. On comptabilise au moins une dizaine de bactéries pour chaque point de mesure.

Sur la série de figures 2.6 nous reportons la largeur et la longueur des souches (BSB168 et BSB168-GFP) de *Bacillus subtilis* qui ont poussé dans du LB pur et dans du LB avec IPTG. La colonne de gauche donne l'évolution en fonction du temps. Avec chaque mesure microscopique nous mesurons la DO de l'échantillon prélevé. Ainsi, nous pouvons tracer la grandeur microscopique en fonction de la DO comme sur la colonne de droite de la figure 2.7.



(a) largeur (b) largeur (c) longueur (d) longueur (e) surface (f) surface

FIGURE 2.6 – Evolution de la taille de BSB168 en fonction du temps et de la DO dans un milieu LB pur. La colonne de gauche donne l'évolution de la largeur (a), de la longueur (c), et de la surface (e) en fonction du temps. La colonne de droite (b,d,f) donne l'évolution en fonction de la DO. La figure de la surface de BS en fonction de la DO indique également l'écart type associé au point. La distribution des tailles est très grand quand les bactéries sont longues (variation d'environ 5 μm). Cette distribution ce resserre avec l'augmentation de la DO.

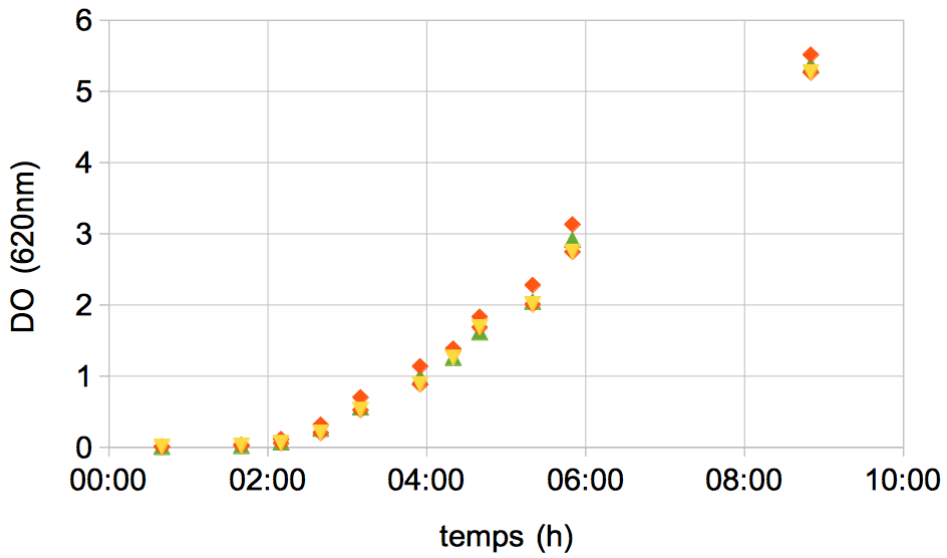


FIGURE 2.7 – Croissance de BSB168 dans du LB et BSB168-GFP dans du LB avec IPTG. Mesure avec le spectrophotomètre Hitachi à 620 nm dans une cuve en plexiglass de trajet optique 1 cm. Les courbes se confondent.

Tout d'abord, on constate que les souches BSB168 et BSB168-GFP ont le même comportement quelque soit le milieu dans lequel nous les avons fait pousser. Ensuite, nous voyons que la largeur des bactéries ne varie pas de manière significative au cours de la croissance de la culture. Sa valeur est approximativement de $1,2\,\mu$m tout au long de l'expérience. Par contre, la longueur des bactéries varie de manière importante. Sa valeur est comprise entre $4\,\mu$m à $25\,\mu$m. Il y a donc de très longues bactéries qui apparaissent dans le milieu de culture 3 h après l'inoculation. Cela se traduit par l'augmentation de la surface projetée dans le plan 2D des photos.

Sur les figures qui représentent les dimensions de BS en fonction de la DO, l'augmentation de la taille des bactéries a lieu au début de la croissance de la culture lorsque la DO est encore inférieure à 1. La taille maximale des bactéries est atteinte pour une DO de l'ordre de $0,3$, ce qui correspond à la DO à laquelle un biofilm commence à se former (comme on le verra plus tard).

Pour conclure, la présence d'IPTG dans le milieu ne modifie pas le comportement des bactéries. Et la taille des bactéries est maximale au début de la croissance de la culture. Les bactéries exhibent un phénotype de grandes

bactéries pour une DO d'environ 0,4. Ce phénotype semble être celui exhibé par BS lorsqu'elle est en train de former un biofilm [56].

2.2.3 Mesure de la vitesse

Désormais nous connaissons la quantité d'IPTG qu'il faut mettre dans le milieu pour optimiser la fluorescence de BSB168-GFP. Nous allons nous servir de ce resultat pour procéder à l'étude de la motilité de BSB168-GFP.

2.2.3.1 Protocole

Dans des conditions stériles, une culture de BSB168-GFP est incubée dans du LB avec 500 μmol.L^{-1} d'IPTG à une température de 37°C et agité à 240 rpm dans un tube laissant filtrer de l'air. Lorsqu'elle atteint la DO souhaitée, prélever un échantillon de la culture et la diluer jusqu'à une DO de au plus 0,7. Ceci permet d'avoir moins de bactéries dans le champ du microscope. Comme nous savons que le dioxygène joue un rôle important dans la motilité, il est nécessaire que sa concentration soit constante et uniforme. Nous utilisons donc un volume de milieu de culture avec une faible épaisseur, recouvert d'une membrane perméable à l'air. On prélève ensuite 60 μL de cette dilution pour la placer entre une lame et une membrane poreuse séparée par un espaceur collant de 300 μm d'épaisseur. La membrane poreuse et l'espaceur permettent à l'oxygène de pénétrer dans l'échantillon, le milieu est approvisionné en dioxygène en $\tau = \frac{L}{D_{O2}} \sim \frac{(3.10^{-4}\,\mathrm{m})^2}{2.10^{-9}\mathrm{m}^2.s^{-1}} \sim 50\,\mathrm{s}$.

Le microscope à fluorescence (*Macrofluo* Leica) nous offre un grand champ visuel et une grande distance de travail en plus de la technique de fluorescence. Le laser d'excitation de la fluorescence passe par l'objectif, pour une configuration en épifluorescence. Un objectif 5X (grossissement 423,9) est utilisé pour filmer le mouvement des bactéries en fluorescence, nous choisissons des filtres de longueur d'onde 500-520nm. La camera *(orcaR2* Hamamatsu) est réglée à une fréquence d'échantillonnage de 100 ms et avec un gain de 50.

2.2.3.2 Lien entre morphologie et motilité

L'observation d'un échantillon prélevé à une DO d'environ 0,1 révèle la présence de ¨grandes¨ bactéries, comme décrit à la section 2.2.2. Ces bactéries ne sont pas motiles. Dans l'échantillon elles sédimentent toutes sur la lame.

Par conséquent nous choisissons d'étudier la motilité de BS quand les bactéries sont ¨petites¨, c'est à dire lorsque la DO est élevée. L'étude de la motilité de BS qui suit a été faite pour des échantillons prélevés à une DO de 4 (rediluée à une DO de 0,7 comme dit dans le protocole) .

2.2.3.3 Traitement d'image et vitesse de BS

Les photos de la figure 2.8 est extraite d'une vidéo de bactéries fluorescente. Le logiciel ImageJ 1.46J a été utilisé pour traiter les films.

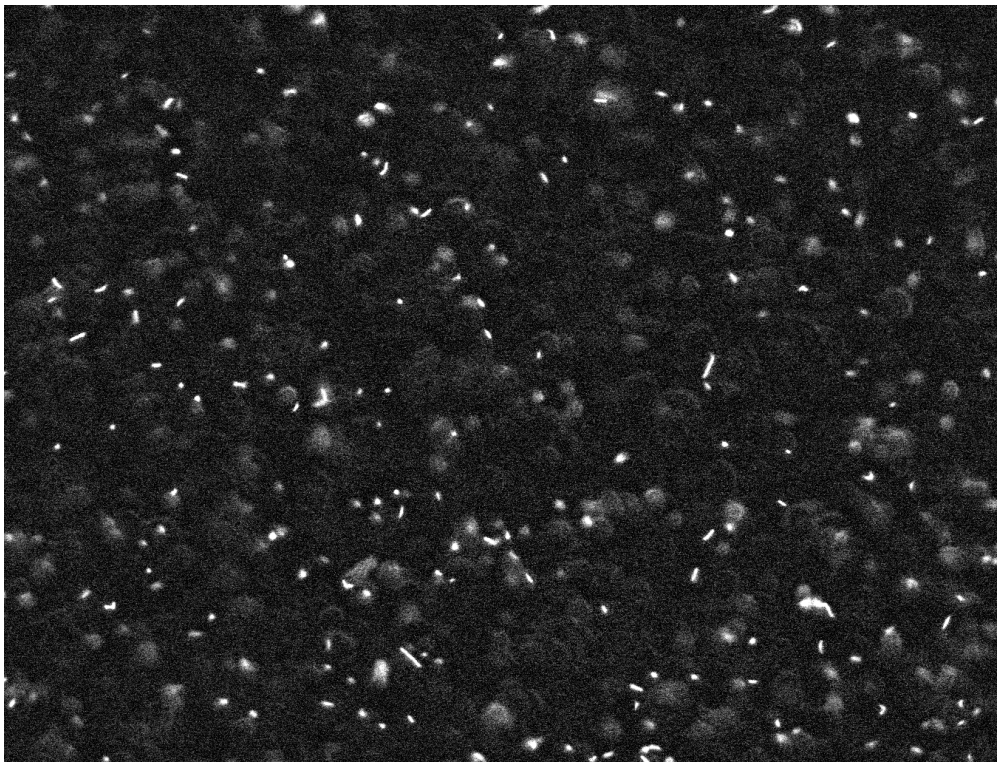


FIGURE 2.8 – Bactéries fluorescentes. Le grossissement est réglé 423,9 pour l'objectif 5x. L'image est en noir et blanc. Les bactéries sont les taches blanches. Le bruit de fond de l'image a été soustrait grâce à imageJ.

Les bactéries qui se trouvent hors du plan focal sont aussi éclairées par la lumière d'excitation de la GFP. Elles émettent une lumière fluorescente diffuse dans le plan focal de l'image ce qui crée un fond lumineux hétérogène. De plus, le milieu LB utilisé est fluorescent ce qui augmente d'autant

l'intensité du fond lumineux. Pour faire ressortir de manière contrastée les bactéries qui sont dans le champ du plan focal, nous utilisons l'outil *substract background* du menu *Process* pour enlever le bruit de fond de l'image.

Une fois cette opération réalisée, la fonction « particule tracking 2D/3D » du plugin Mosaic [103] de ImageJ est utilisée pour détecter le mouvement des bactéries. Il est difficile pour le plugin de discriminer la trajectoire de deux bactéries lorsqu'elles se croisent, mais nous pouvons extraire des morceaux de trajectoire. Nous mesurons sur ces morceaux une valeur moyenne de la vitesse instantanée (entre deux images) d'environ 20 μm.s^{-1} (voir l'histogramme sur la figure 2.9).

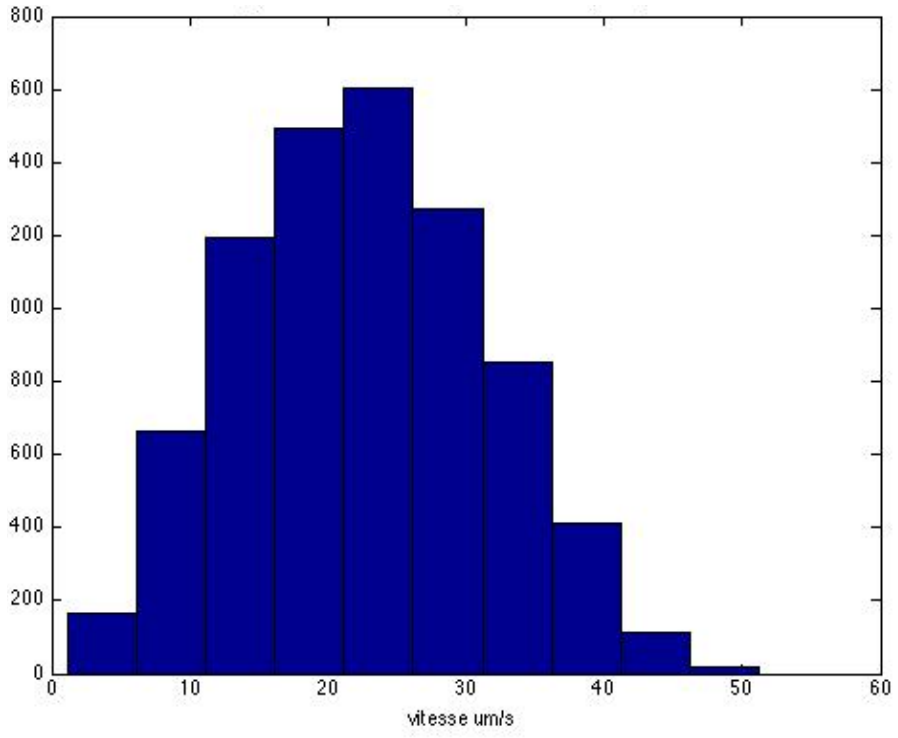


FIGURE 2.9 – Histogramme des vitesses instantanées de *Bacillus subtilis* B168-GFP lorsqu'elle est prélevée d'une culture concentrée. La vitesse est donnée en $\mu m.s^{-1}$.

2.2.3.4 Conclusion et perspectives

Pour conclure, ces données nous permettent d'extraire une statistique sur la vitesse moyenne de BS, et de constater qu'elle est piquée à $20\,\mu\text{m.s}^{-1}$.

Il serait intéressant de suivre la vitesse instantanée des bactéries à la surface d'un milieu où BS forme un biofilm. Toutefois la présence d'un grand volume sous le plan focal implique qu'il y aura un fond lumineux puissant qui viendra drastiquement diminuer le contraste des bactéries fluorescentes.

Avec un logiciel de reconstitution de trajectoire plus performant il serait intéressant de suivre également la fréquence de réorientation de BS. Pour cela il faudrait surement développer un logiciel qui prennent en compte la forme en bâtonnet des bactéries. Cela permettrait d'anticiper la position d'une bactérie sur l'image suivante, puisqu'elle avance parallèlement à sa longueur. Ainsi, on pourrait accéder à la durée moyenne d'un run d'une bactérie, ce qui est une donnée intéressante pour la modélisation.

2.3 Répartition des bactéries dans le volume

Comment la population de bactérie évolue t-elle dans le milieu au cours de la formation d'un biofilm à l'interface eau-air ? Pour répondre à cette question, nous avons mesuré la concentration en bactéries dans le volume de la culture au cours de la dynamique de formation du biofilm. Un biofilm met environ 20 h pour se former à partir du moment où le milieu est inoculé. Pour suivre l'évolution de la concentration dans le milieu pendant une aussi longue période de temps, nous avons construire un système automatisé de mesures. Dans la suite, nous présentons le dispositif expérimental mis au point, puis les observations qui ont été réaliseé.

2.3.1 Dispositif expérimental

2.3.1.1 Culture bactérienne pour la formation d'un biofilm

Voici le protocole suivi pour la formation d'un biofilm de BS. Prendre une colonie monoclonale de BSB168 provenant d'une culture sur gel LB-agar préalablement préparée. Cette colonie est inoculée dans un tube stérile contenant du milieu LB frais, puis incubé pendant une nuit entière à une température de 37°C et une agitation à 240 rpm. Le lendemain matin, la culture est à saturation. Un échantillon de cette culture est dilué mille fois

dans du milieu LB frais et incubé dans les mêmes conditions. Lorsque cette nouvelle culture atteint une densité optique (600 nm, trajet optique de 1 cm) de $0,1$, un échantillon est dilué mille fois dans du milieu LBbiofilm.

Une flasque en plastique rectangulaire (Falcon© 50 mL) est remplie jusqu'à mi hauteur de LB-biofilm. Le contact avec l'air est assuré par un filtre pour empêcher toute contamination. Cette culture de biofilm est alors maintenue à 31 º C dans un bain-marie le temps nécessaire à la réalisation de l'expérience.

2.3.1.2 Mesure de la densité optique (DO)

Afin de quantifier la concentration de bactéries dans le volume, nous avons mesuré la densité optique de la culture bactérienne. Cette méthode présente les avantages d'être rapide et non destructive.

Le montage expérimental doit répondre à plusieurs contraintes. D'abord il doit évaluer efficacement la concentration en bactéries. Ensuite, il doit permettre à un biofilm de se développer et donc maintenir la culture biologique dans les bonnes conditions.

Pour cela, nous avons utilisé une flasque rectangulaire transparente (Falcon 50 mL) contenant une culture de bactéries dans les conditions requises pour la formation d'un biofilm. Pour mesurer le profil vertical (Oz) de la concentration, nous avons fait passer la boîte dans un ensemble faisceau laser - capteur de lumière fixe dans le référentiel du laboratoire. Lors de la mesure du profil de concentration, le dispositif est maintenu dans l'obscurité pour éviter que toute lumière parasite vienne s'ajouter à la lumière du laser dans le système.

Le laser utilisé pour la mesure a un faisceau de section $1\,\mathrm{mm}^2$. Ceci permet de mesurer la concentration moyenne en bactéries localement dans un volume de la flasque de $1\,\mathrm{mm}^2 \times 2\,\mathrm{cm}$, où $2\,\mathrm{cm}$ correspond à l'épaisseur de la flasque. Le laser a une faible puissance ce qui permet de ne pas tuer les bactéries dans le milieu. La longueur d'onde de $600\,\mathrm{nm}$ utilisée est un standard pour la mesure de DO dans une culture bactérienne. En effet, cette longueur d'onde subit peu d'absorption par les éléments du milieu de culture ce qui permet d'optimiser l'effet de la diffusion de la lumière. Le faisceau laser est dirigé perpendiculairement à la surface de la flasque pour optimiser son trajet dans la culture bactérienne et minimiser l'effet des réflexions parasites sur les faces de la boîte.

Après avoir traversé l'échantillon, l'intensité du faisceau est mesurée avec

une photodiode de $1\,\mathrm{cm}^2$ disposée derrière le flacon. La photodiode est polarisée en inverse par une alimentation continue stabilisée à $5,0\,\mathrm{V}$. Nous mesurons le courant produit par la photodiode grâce à une résistance de $51\,\mathrm{k}\Omega$ en série avec celle-ci. Par construction, la tension de la résistance est proportionnelle au courant créé par la photodiode. Le choix de la résistance a été sujette à un compromis. En effet, nous voulons assurer une grande sensibilité au photocourant produit par la photodiode, mais en la maintenant toujours polarisée en inverse. Pour que la photodiode soit polarisée en inverse, on doit avoir selon les conventions du schéma figure 2.10 $Ud < 0$ soit $Ur - E < 0$ ou $Ur < E$ (voir figure pour les notations). Pour ce faire nous mesurons le courant maximal obtenu dans les conditions d'une expériences $Id^{max} = 0,1\,\mathrm{mA}$. La tension de l'alimentation stabilisée est fixée à $5\,\mathrm{V}$. Cela impose la valeur de la résistance R en série de la photodiode $R = \frac{E}{Id^{max}} = 50\,\mathrm{k}\Omega$. Ainsi nous obtenons le plus grand facteur d'amplification possible pour le signal mesuré.

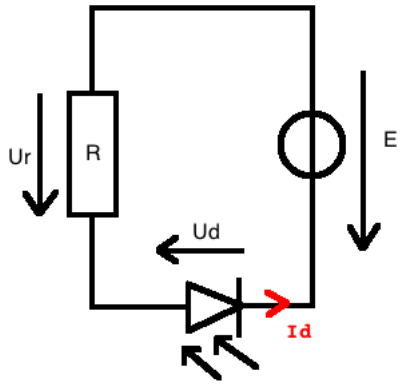


FIGURE 2.10 – Schéma de montage de la photodiode polarisée en inverse. Id est le photocourant généré par la photodiode, Ur et Ud sont respectivement la tension aux bornes de la photodiode et la tension de la résistance en convention récepteur, E est la tension aux bornes de l'alimentation stabilisée en convention générateur. $E + Ud = Ur = R\,Id$..

2.3.1.3 Balayage de la flasque

Pour mesurer la densité optique dans la flasque rectangulaire, nous avons conçu un dispositif de mesure par balayage assurant un positionnement précis et un déplacement régulier. Le dispositif a été dessiné en 3D grâce à SolidWorks© avec une précision millimétrique (figure 2.11). Les pièces spéciales

comme le support de la flasque ou le support du moteur ont été imprimés en 3D à partir de plastique ABS (Acrylonitrile butadiène styrène).

La DO de la culture est mesurée le long d'une tranche verticale de la flasque. Le trajet optique du laser dans le milieu de culture est de 2 cm et nous sondons toute la hauteur de la culture. Pour cela, la flasque doit se déplacer dans le faisceau laser à l'aide d'un ascenseur créé sur mesure. Afin de ne pas perturber la culture du biofilm, le mouvement de l'ascenceur est régulier et doux grâce à l'utilisation d'un moteur à courant continu. La vitesse du moteur est sélectionnée avec la tension appliquée à ses bornes, elle est fixée à $2,5\,\mathrm{mm.s^{-1}}$. Avec cette vitesse du moteur, la carte d'acquisition enregistre 15 points pendant que la boîte s'est déplacée de 1 mm. La polarisation du moteur, qui commande son sens de rotation, est choisie grâce à un interrupteur électronique L293 DNE.

Le moteur est couplé à une tige filetée de pas $1,3\,\mathrm{mm}$ et le support de la flasque est relié à la tige filetée par un écrou. Ainsi, lorsque le moteur tourne il entraine la tige filetée ce qui fait se déplacer l'écrou le long de la tige avec une précision verticale submillimétrique. L'écrou est solidaire d'un patin à recirculation à bille grâce à une pièce spécialement imprimée en 3D (figure 2.11). Afin d'assurer le positionnement horizontal précis de la flasque, la patin coulisse le long d'un guide linéaire de largeur 23 mm et d'épaisseur 22 mm (LAH25ANZ de chez NSK). Le porte-flasque fixé sur le patin peut ainsi se déplacer le long de la verticale, mais demeure fixe dans la direction de l'horizontale. La réversibilité de la rotation du moteur permet de faire monter et descendre la flasque à loisir.

Pour repérer la position de la flasque de manière précise, on utilise un encodeur optique couplé à la tige filetée. La résolution de l'encodeur permet de mesurer 1/500 de tour de l'axe. La précision sur la position est de $2\,\mu$m .

Afin d'éviter toute vibration de l'appareil lors de la formation de biofilm, l'ensemble de l'installation est fixé sur une table à coussin d'air.

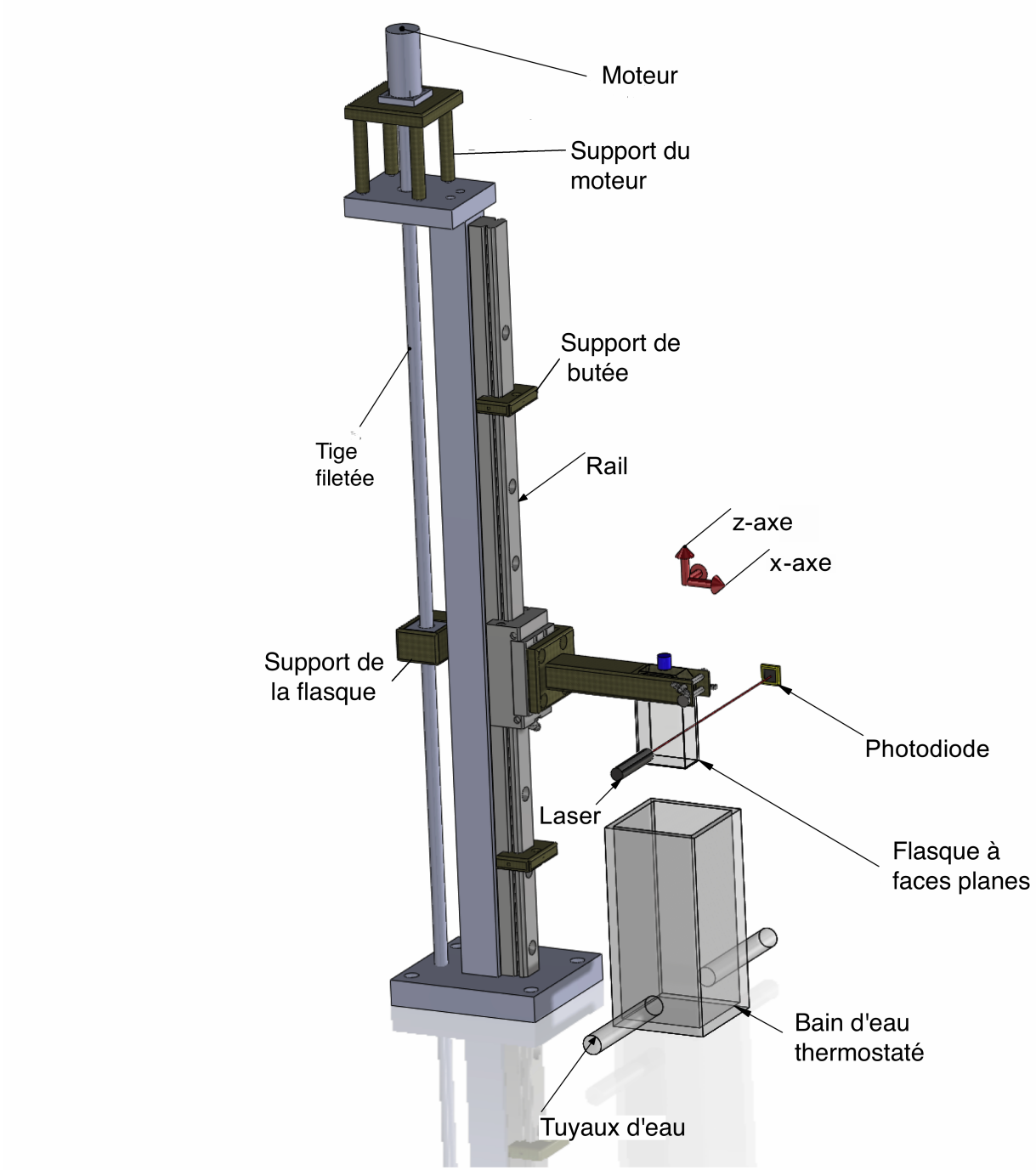


FIGURE 2.11 – Dispositif de mesure de la densité optique le long d'une ligne vertical. Le support de la flasque, du moteur et des butées sont imprimés en 3D avec du plastique ABS. Le bain marie et le flacon rectangulaire sont en plastique transparent.

2.3.1.4 Acquisition vidéo

A chaque mesure de la concentration, la flasque est sortie de son bain-marie grâce à l'ascenseur. Lorsque celui-ci est au plus haut nous prenons quelques photos en noir et blanc de la flasque vue de côté (xOz) avec une camera XCD100 Sony.

Puisque le système est plongé dans le noir par défaut, on éclaire la flasque avec deux petites ampoules d'environ un demi centimètre de diamètre fixées au bout d'un cable flexible. Les ampoules sont placées en dehors du champ de la camera de façon à éclairer la flasque de profil.

Les biofilms de BSB168 sont de couleur blanche ce qui fait qu'il diffuse beaucoup de lumière y compris en direction de la camera. Les paramètres de la caméra sont ajustés pour que l'image ne soit pas saturée, même en présence d'un biofilm. Pour cela, on peut utiliser une flasque qui contient déjà un biofilm pour choisir les réglages.

Pour finir les images sont enregistrées dans un même dossier. Leur nom contient la date de la prise avec une précision à la seconde.

2.3.1.5 Automatisation de la mesure

Un biofilm met plus de deux jours à se former à partir du moment où on a inoculé le milieu de culture. Pour pouvoir suivre l'évolution de la concentration des bactéries avec régularité sur une si longue période de temps, nous avons automatisé le dispositif de mesure. Pour cela on utilise le logiciel Labview© associé à une carte d'acquisition (DAQ) NI USB - 6212©. Toutes les dix minutes le programme Labview© effectue la séquence d'opérations suivantes :

1. Mettre en marche l'alimentation du laser et attendre 30 secondes pour la stabilisation de l'intensité du faisceau .
2. Commencer l'enregistrement de la tension de la résistance en série avec la photodiode dans une mémoire tampon et écrire dans un nouveau fichier.
3. Choisir la polarisation du moteur pour faire monter la flasque.
4. Passer la flasque à travers l'ensemble laser-photodiode puis arrêter l'enregistrement du premier fichier.
5. Allumage des lampes pour les prises de photos lorsque la flasque est au plus haut.

6. Prise d'une série de une ou deux photos avec la camera noir et blanc.
7. Extinction des lampes pour les prises de photos.
8. Renverser la polarisation du moteur pour faire descendre la flasque.
9. Commencer l'enregistrement de la tension de la résistance dans un nouveau fichier.
10. Lorsque le porte flasque atteint le bouton stop situé à la position de départ, le moteur, l'enregistrement de la tension et l'alimentation du faisceau laser sont arrêtés.
11. Attendre 10 minutes à la position de départ où la flasque est plongée dans le bain-marie à 31°C.

Grâce à ce dispositif, nous avons pu enregistrer la tension aux bornes de la résistance tout au long de la formation d'un biofilm. Cette grandeur nous a permis de calculer la DO dans le milieu de culture le long d'un profile vertical. La DO est donc moyennée sur l'épaisseur de la flasque.

2.3.2 Analyse des données du laser

2.3.2.1 Calibration de l'ensemble laser-photodiode

La grandeur mesurée lors de l'expérience est la tension aux bornes de la résistance (schéma 2.10). La grandeur qui nous intéresse est, en revanche, la densité optique locale (DO) à 600 nm dans le milieu de culture. Pour calculer la DO il faut connaitre l'extinction d'intensité que subit le faisceau laser quand il traverse le milieu. Avec un point de mesure, on a accès à l'intensité du faisceau après qu'il ait traversé un volume de $1\,\mathrm{mm}^2 \times 2\,\mathrm{cm}$ de la flasque. L'extinction du faisceau laser est par définition une différence d'intensité prise en deux points. Le premier point est une référence, qui correspond à un endroit où le faisceau passe à travers une partie vide de la flasque (au dessus du milieu de culture). Le deuxième point est celui dont on veut connaitre la valeur de la DO. La différence entre la tension au point de référence et la tension au point considéré, donne une mesure de l'extinction du faisceau.

Pour convertir en DO (620 nm, trajet optique 1 cm) la valeur de l'extinction mesurée en volts, on réalise une calibration. La mesure sur notre dispositif est comparée avec celle d'un spectrophotomètre commercial (Hitachi U-2000) pour une série de dilutions de cultures bactériennes. Chaque dilution est mise dans les mêmes flasques rectangulaires en plastiques utilisées dans les expériences. Nous prenons soin de bien homogénéiser les cultures avant de

mesurer par balayage l'extinction du faisceau laser dans une tranche verticale de la culture. Pour une dilution donnée, la valeur moyenne de l'extinction est tracée en fonction de la DO mesurée avec le spectrophotomètre commercial (620 nm, trajet optique 1 cm). Nous obtenons la courbe de calibration sur la figure 2.12. Pour pouvoir convertir n'importe quelle valeur d'extinction par la suite, cette série de points est ajustée par un ansatz (voir équation figure 2.12).

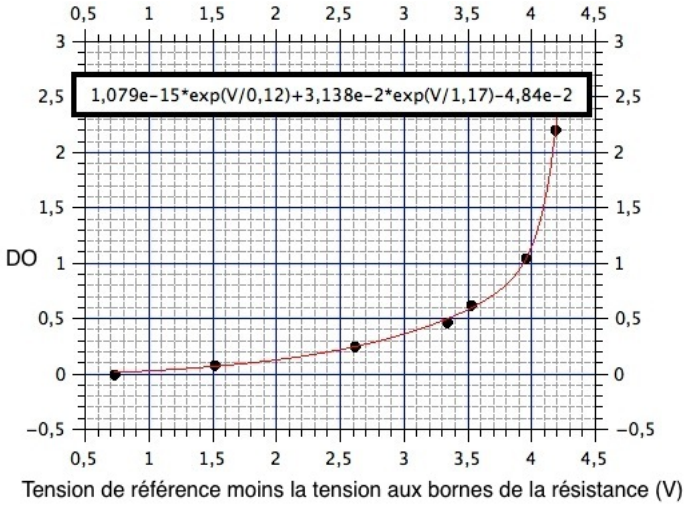


FIGURE 2.12 – Calibration de l'extinction du faisceau laser sur un trajet optique de 2 cm dans la culture pour sa conversion en une DO standard mesurée avec l'appareil commercial Hitachi U-2000. La longueur d'onde utilisée pour mesurer la DO est de 620 nm et le trajet optique de la lumière dans l'échantillon est de 1 cm.

2.3.2.2 Automatisation du traitement des données de la mesure de DO

Le dispositif que nous avons construit mesure la densité optique le long d'une ligne verticale toutes les dix minutes pendant trois jours. On génère donc un grand nombre de fichiers à la fin de l'expérience. Grâce à Matlab, nous avons pu automatiser le traitement de données sur l'ensemble des fichiers. Le script Matlab récupère les données brutes de chaque fichier : la tension aux bornes de la résistance en fonction de la position de la flasque

dans le faisceau laser.

Les données brutes tracées donnent une courbe comme celle de la figure 2.13. Sur chaque courbe il y a six zones qui sont séparées par de grandes variations de l'intensité laser. La première zone correspond au début de l'acquisition où la flasque est sous l'ensemble laser-photodiode. Le premier signal que l'on voit est une tension constante élevée car le laser frappe la photodiode sans obstacle sur son passage. La seconde zone correspond à l'interception du laser par le bouchon de la flasque. Après un court passage dans la partie transparente de la flasque sous le bouchon commence la troisième zone ou le laser est intercepté par la support de la flasque (figure 2.11). Puis le signal remonte brutalement dans la quatrième zone quand le faisceau passe au travers de la moitié supérieure de la flasque où il y a de l'air. Il est à noter qu'au bout d'un certain temps cette zone est en partie envahie par le biofilm. Nous utilisons la première partie de cette quatrième zone (entre 75 mm et 85mm figure 2.13) comme référence pour le calcul de l'extinction du laser. La tension aux bornes de la résistance chute et remonte ensuite brutalement quand le laser est dévié par le ménisque de l'interface air-milieu de culture. On voit alors une cinquième zone où la tension varie à chaque nouvelle mesure et qui correspond au passage du laser dans le milieu de culture (zone d'intérêt donc). Enfin, quand le faisceau passe sur la paroi inférieure de la flasque le signal chute brutalement une nouvelle fois pour remonter ensuite lorsque la flasque est au dessus de l'ensemble laser-photodiode (c'est la sixième zone).

Une fois les positions de la zone de référence et de la zone d'intérêt repérées manuellement, le script calcule la différence entre la tension de cette zone et la tension quand le laser passe à travers le milieu de culture sur tous les fichiers de données. Ensuite, pour avoir une courbe moins bruitée on applique une moyenne glissante avec une fenêtre de 20 points (équivalent à $1,6$ mm). Enfin, grâce à la fonction obtenue avec la calibration on trace la valeur de la DO dans le milieu de culture en fonction de la position du faisceau laser.

Dans les figures 2.14, on trace uniquement la DO dans les parties d'intérêt, c'est à dire quand le laser passe à travers le milieu de culture. Nous prenons comme origine des positions le fond de la flasque (la figure est donc comme retournée par rapport à la figure 2.13. Nous obtenons alors les courbes de la DO le long d'un profil vertical au cours de la formation d'un biofilm (figure 2.14).

2.3.3 Evolution de la concentration en bactéries au cours de la formation du biofilm

Grâce au montage et au protocole présentés précédemment nous sommes en mesure de visualiser l'évolution de la concentration en bactéries au cours de la formation d'un biofilm. Nous pouvons non seulement suivre l'évolution temporelle de la concentration mais aussi son évolution spatiale. Ainsi, nous avons accès à la distribution des bactéries dans le milieu avant, pendant et après la formation d'un biofilm mature.

2.3.3.1 Evolution de la concentration avant l'apparition du biofilm mature

Observons l'évolution de la concentration avant la formation du biofilm mature à la surface du milieu de culture (figure 2.14a). Entre 0h et 24h, la concentration bactérienne augmente globalement dans le milieu de culture. Les observations sont :

1. une augmentation du nombre de bactéries entre 0 h et 8 h.
2. une accumulation des bactéries à l'interface milieu - air après 8 h jusqu'à 22 h. La concentration entre les positions 15 et 20 mm (entre les pointillés marrons) diminue par rapport à celle du fond de la flasque (3 mm). La concentration en bactéries augmente sur quelques millimètres sous la surface entre 20 mm et 23 mm.

L'accumulation à la surface peut être causée par deux phénomènes connus chez *Bacillus subtilis*. La première cause d'augmentation de la concentration peut être la division cellulaire. La seconde cause peut être la migration des bactéries vers la surface. En effet BS est connue pour faire de l'aérotactisme. La source de dioxygène étant localisée ici à la surface, il est probable que BS migre vers cette région du milieu de culture. L'accumulation que observée est probablement causée par ces deux phénomènes.

Il est intéressant de remarquer que l'apparition d'un biofilm à la surface est précédée par l'augmentation du nombre de bactéries à l'endroit où il se forme. Bien qu'il soit difficile de quantifier cette augmentation juste sous la surface à cause du ménisque de l'eau, elle est visible sur plusieurs millimètres (ici, 5 mm).

2.3.3.2 Evolution de la concentration pendant et après l'apparition du biofilm

24 h après l'inoculation, on observe sur la figure 2.14b une diminution globale de la concentration en bactéries. Cette diminution ne se fait pas de manière homogène. Elle commence d'abord à la surface du liquide où on voit parfois se creuser un "trou" dans l'accumulation de bactéries. Sous ce "trou", la concentration dans le reste du volume est homogène et diminue progressivement dans tout le reste du fond de la flasque.

Parallèlement à l'affaissement de la concentration dans une zone localisée sous la surface, on voit un élargissement drastique du pic dans la zone au-dessus du milieu de culture. L'extinction du faisceau laser à cet endroit est due à la montée du biofilm sur les parois verticales émergées de la flasque. Le biofilm se formant d'abord sur le milieu liquide remonte au cours de sa maturation, comme déjà constaté dans les expériences de [4].

2.3.4 Corrélation avec les images

Nous avons ajouté au dispositif de mesures des profils de concentration une caméra qui prend automatiquement des photos de la flasque toute les 10 minutes. Ainsi, nous suivons simultanément l'évolution de la concentration et les différentes étapes de formation du biofilm.

La figure 2.15 présente les différents phénomènes que nous avons identifiés. La première chose que l'on remarque c'est qu'il faut une vingtaine d'heures pour qu'un biofilm se forme dans ces conditions. On parle de biofilm dans le cas d'une pellicule continue semblable à une peau qui recouvre la surface. En suivant la cinétique de formation du biofilm nous identifions plusieurs phases et phénomènes :

— A t=0 h le milieu est transparent et on ne voit rien à la surface.

— A 4 h 40 d'incubation un phénomène dans le volume du milieu apparait. Des filaments de bactéries, visibles à l'échelle macroscopique, sont convectés par le fluide. Ces filaments apparaissent vers 4 h après l'inoculation et disparaissent environ 6 h après (ils sont présents pendant 2 h). La date de leur apparition correspond à peu près au moment où la taille de BS est maximale en début de la phase croissance de la population (figure 2.6). Sur la figure 2.14a nous distinguons des fluctuations sur la courbe de 4h55. Cela correspond bien au fait que la culture est hétérogène sur les photos.

— 7 h 20 après l'inoculation la culture est redevenue homogène bien que plus turbide (confère l'augmentation de la DO sur la figure 2.14a). A cet instant nous voyons du fluide en mouvement juste sous la surface. Cela correspond au moment où on voit une accumulation de bactéries sous la surface à la figure 2.14a. Apparait alors des objets appelés "plume", dans lesquels la concentration en bactéries est plus élevée car la plume est plus turbides que le reste de la culture. Parfois elles se translatent le long de la surface avec une vitesse de quelques dixièmes de millimètres par seconde. Ce phénomène persiste jusqu'à environ 11 h.
— 10 h après l'inoculation, des filaments se forment et pendent depuis la surface comme sur les photos prises à 11h ou à 18h40 (figure 1.2).
— A 26h15 une fine pellicule transparente commence à remonter sur la paroi verticale au-dessus du biofilm déjà formé. Cette pellicule monte sur plus de 1 cm au dessus du niveau du liquide. Sur la figure 2.14b la pseudo-DO mesurée au dessus du milieu de culture augmente drastiquement, ce qui indique que le laser passe bien à travers quelque chose.

2.3.5 Croissance moyenne de la population de bactéries

2.3.5.1 Croissance moyenne de la population de bactéries en conditions biofilm

Grâce aux mesures de profil de concentration on peut également suivre l'évolution moyenne de la DO dans le volume au cours de la formation du biofilm. Pour cela nous calculons la DO moyenne entre la base des deux pics observés sur les figures 2.14a et 2.14b, c'est à dire entre les positions 3 mm et 23 mm. On obtient alors la courbe de la DO moyenne dans le milieu en fonction du temps (figure 2.16).

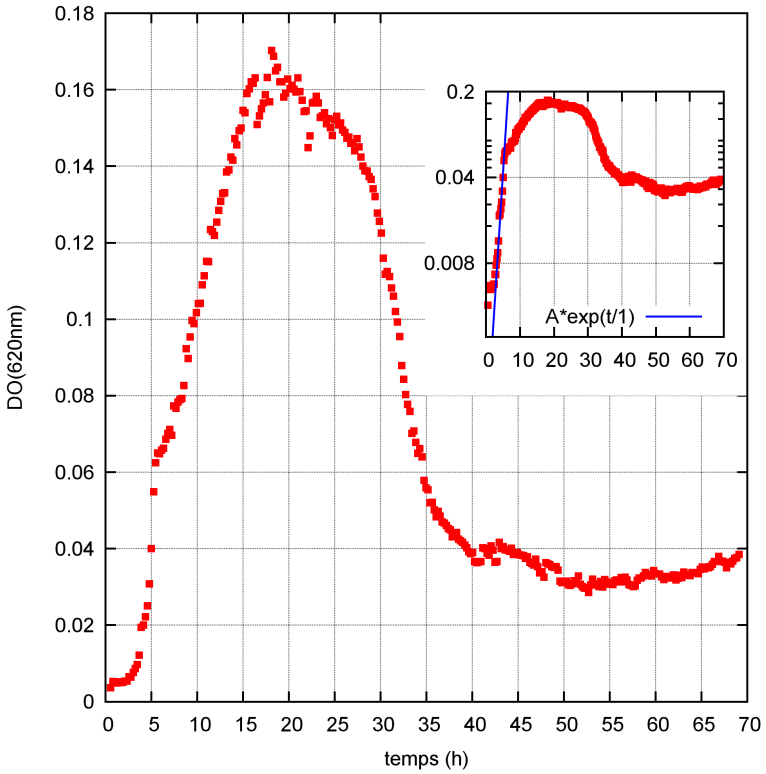


FIGURE 2.16 – DO moyenne le long du profil vertical en fonction du temps au cours de la formation d'un biofilm. Il y a un enchainement de phases. Dans l'ordre chronologique, la première phase correspond à une phase de croissance lente entre 0 h et 2 h après l'inoculation du milieu de culture par BSB168. Vient ensuite une phase de croissance rapide entre 2 h et 6h où la DO passe de presque 0 à 0,06. Pendant cette phase le temps de division des bactéries est de l'ordre de l'heure, comme on peut le voir dans l'encart de la figure. Ensuite commence une phase de croissance plus lente jusqu'à 15h où la densité optique atteint 0,16 ce qui équivaut à une concentration en bactéries de l'ordre de 10^{13} bactéries.m^{-3}. C'est au cours de cette phase qu'on voit apparaitre le biofilm à 10h40. Suit une phase stationnaire de 15 h à 27 h où la DO est stable ou décroit faiblement (diminution de 0,01 en 12 h). Ensuite, entre 27 h et 38 h la DO diminue rapidement (de 0,1 en 11 h). Pour finir, la DO se stabilise à une valeur d'environ 0,04 pendant 32 h du reste de l'expérience. L'encart dans la figure correspond à la même courbe avec une échelle logarithmique des ordonnées. Entre 2 h et 6 h nous constatons que la phase de croissance est exponentielle. L'ajustement de cette portion de la courbe par une exponentielle donne un temps de division de l'ordre de 1 h.

Dans cette expérience, la croissance de la population de bactéries commence d'abord par une phase stationnaire de 2 h. Puis, la concentration augmente de la manière entre 2 h et 15 h après l'inoculation jusqu'à sa valeur maximale. Dans les premières heures de cette phase (entre 2 h et 6 h) le temps de division des bactéries est de l'ordre d'une heure. De 15 h à 27 h, on voit ensuite une phase quasi-stationnaire où la population de bactéries décroit lentement. Ensuite, à partir de 27 h jusqu'à 38 h la concentration en bactéries décroit brusquement jusqu'à une valeur de DO d'environ $0,04$. Enfin la DO reste stable jusqu'à la fin de l'expérience après 70 h de mesure. Cette dernière phase est peut-être due de la subsistance de bactéries ou à la modification du milieu de culture qui serait alors absorbant alors à 600 nm.

Nous pouvons distinguer des morceaux de biofilm sur la surface du milieu à partir de 10 h 40 après l'inoculation. Après cela la culture continue de croître pendant encore 5 h. A 10 h 40 la DO est d'environ $0,1$ ce qui correspond à une concentration d'environ 10^{13} bactéries.m^{-3}. La conversion est faite par comptage du nombre de bactéries avec un microscope. Le biofilm se forme donc pleine phase de croissance de la population de bactérie et non pas lorsque la population commence à décroitre.

2.3.5.2 Conditions non-biofilm

La croissance des bactéries est-elle la même dans une culture standard et dans une culture où un biofilm se forme ?

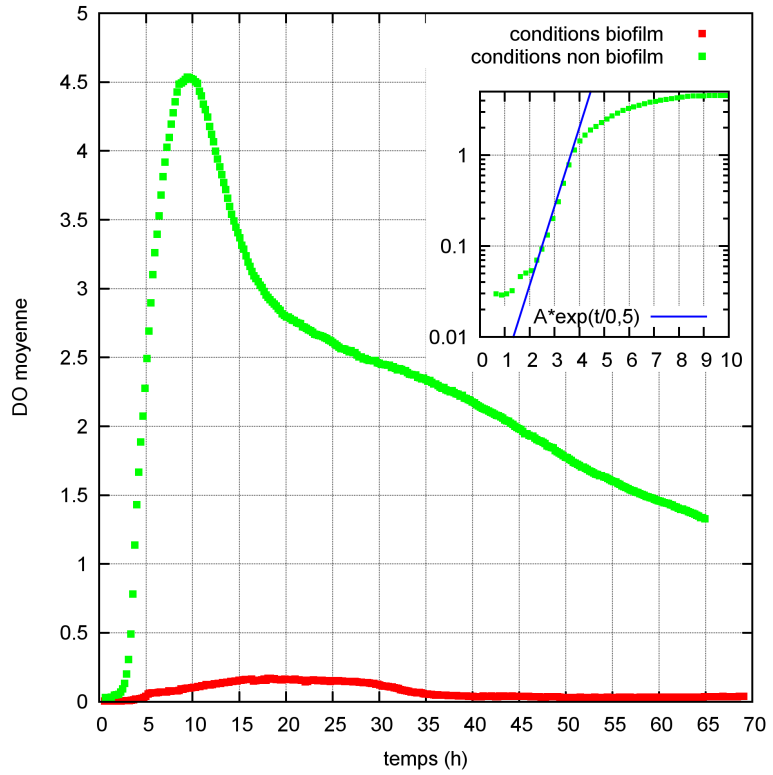


FIGURE 2.17 – Evolution de la concentration moyenne en bactéries dans les conditions de formation d'un biofilm (rouge) et dans les conditions de non formation (vert). La concentration en bactéries augmente beaucoup plus quand un biofilm ne se forme pas, prés de sept fois plus. L'encart de la figure donne l'évolution de la concentration en bactéries avec un axe logarithmique pour les ordonnées. Le temps de division moyen des bactéries de la phase exponentielle est de l'ordre de 30 min.

En se plaçant dans des conditions non propices à la formation d'un biofilm, nous avons à nouveau mesuré l'évolution de la concentration moyenne de BSB168. Le spectrophotomètre automatique GS08-Fluorimeter© est utilisé pour mesurer la DO (620nm) d'une culture de BSBB168. Les conditions sont les suivantes : agitation à 240 rpm, température d'incubation à 37°C. Le volume de liquide d'une culture bactérienne est exactement 600 μL. La culture est versée dans un des 24 puits d'une plaque stérile multi-puits. Chaque puits fait 2 cm de profondeur et $1,6$ cm de diamètre. La plaque est recouverte d'un film plastique afin d'éviter toute évaporation ou contamination.

Nous avons ensuite calibré la DO mesurée avec le spectrophotomètre pour pouvoir la convertir en DO du dispositif utilisé de manière standard (Hitachi U-2000 avec 1 cm trajet optique, à 620 nm).

Le milieu LB utilisé est du LB simple donc aucun biofilm ne se forme. En effet, le glycérol et le manganèse du milieu LBbiofilm sont des promoteurs essentielles à la formation d'un biofilm parce qu'ils stimulent l'activité des gènes de production de matrice extracellulaire dans les bactéries [95].

La figure 2.17 donne l'évolution de la DO (Hitachi U-2000) dans ces conditions. La forme de la courbe reste la même que dans les conditions biofilm, avec une phase stationnaire où la concentration reste faible, puis une phase de croissance rapide jusqu'à une valeur de saturation, suivie d'une phase de décroissance. La phase stationnaire n'est pas atteinte dans ce cas.

Dans la phase exponentielle de croissance les bactéries se divisent en moyennes toute les 30 min (confère l'encart de la figure 2.17).

La concentration augmente beaucoup plus que dans les conditions d'un biofilm ($4,5$ pour $0,16$). BS est connue pour avoir besoin d'oxygène pour son métabolisme. Donc, lorsqu'on approvisionne le milieu en dioxygène (par agitation) la concentration en bactéries peut augmenter énormément. Néanmoins l'expérience décrite ici est effectuée à une température 37°C contrairement au cas de la formation d'un biofilm qui de 31°C. Nous pouvons également nous attendre à une influence de ce paramètre pour expliquer en partie cette différence.

De plus, la composition du milieu de culture est pratiquement la même entre cette expérience et celle qui conduit à la formation d'un biofilm (le milieu biofilm est un peu plus riche car il contient du glycérol). Nous pouvons donc constater que dans le cas de la formation d'un biofilm, ce n'est pas le milieu de culture qui limite la multiplication des cellules puisque la concentration peut augmenter bien plus si le milieu est agité. On peut donc conclure que l'appauvrissement du milieu en dioxygène joue certainement un rôle dans la formation du biofilm par BS.

2.3.6 Conclusions et perspectives

En résumé, la formation d'un biofilm est précédée par l'accumulation des bactéries au niveau de l'interface liquide-air. Ce processus peut être dû à la migration des bactéries vers la source d'oxygène qu'est la surface, mais aussi à la division des bactéries dans un environnement riche en oxygène.

En suivant la concentration moyenne en bactéries au cours de la formation

d'un biofilm, nous nous sommes rendus compte que la formation d'un biofilm intervient pendant la phase de croissance de la population.

Dans les conditions choisies des morceaux de biofilm sont apparus à la surface 10 h après l'inoculation du milieu. Vers 20 h, la totalité de la surface est envahie par une pellicule qui fait quelques centaines de micromètres d'épaisseur. Ces observations sont synchronisées avec l'étude de la concentration en bactéries grâce au dispositif à balayage laser. Celui-ci met en évidence une accumulation des bactéries à la surface 2h avant l'apparition des morceaux de biofilm.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que le milieu nutritif n'est pas ce qui limite la multiplication des bactéries dans le cas de la formation d'un biofilm. En revanche, il semble que le dioxygène dissout joue un rôle.

En perspective, il serait donc intéressant de pouvoir suivre l'évolution de la concentration en oxygène dans le milieu au cours de la formation d'un biofilm. On pourrait imaginer un dispositif muni de plusieurs micro-sondes plongées dans le milieu.

Pour aller plus loin dans l'observation de la migration des bactéries vers la surface, il serait intéressant de pouvoir observer à une échelle plus petite la zone juste sous l'interface eau-air. On pourrait par exemple utiliser un microscope confocal.

De plus, pour déterminer exactement quand le phénotype producteur de matrice commence à apparaitre dans la population de bactérie, il faudrait suivre grâce à des rapporteurs fluorescents l'expression des gènes associés à la production de la matrice.

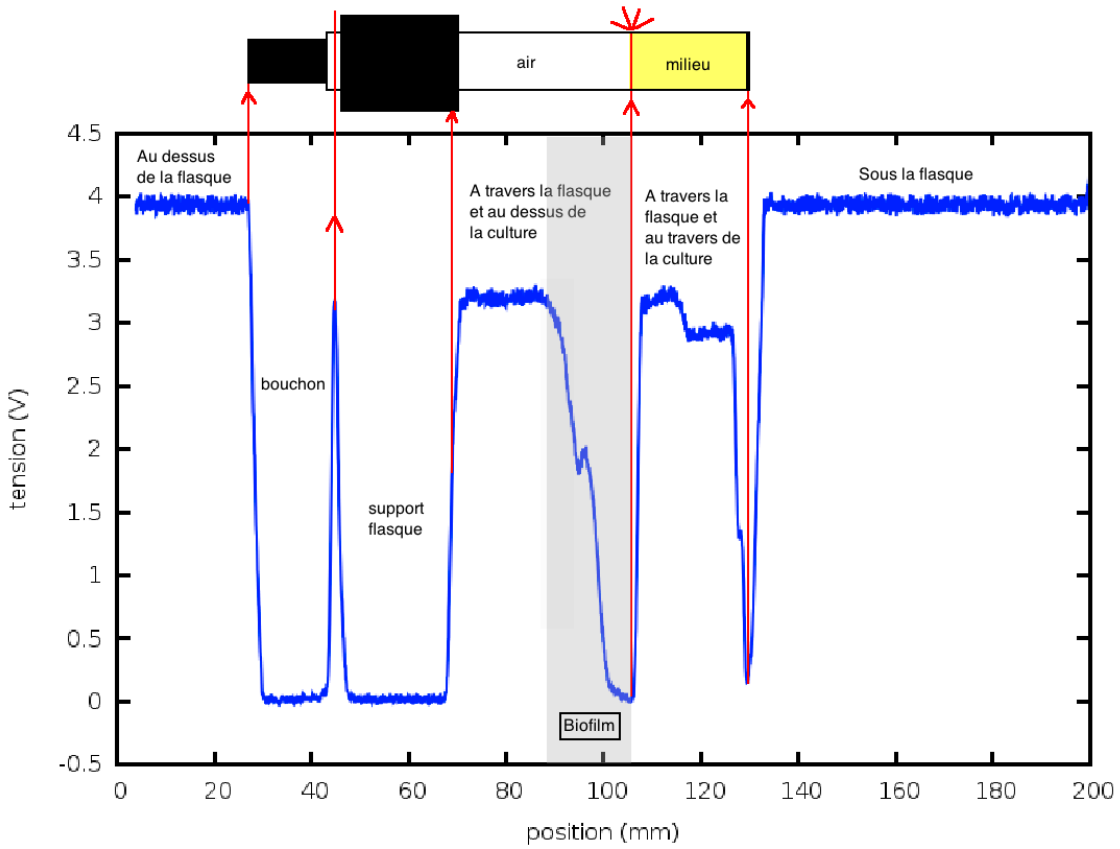
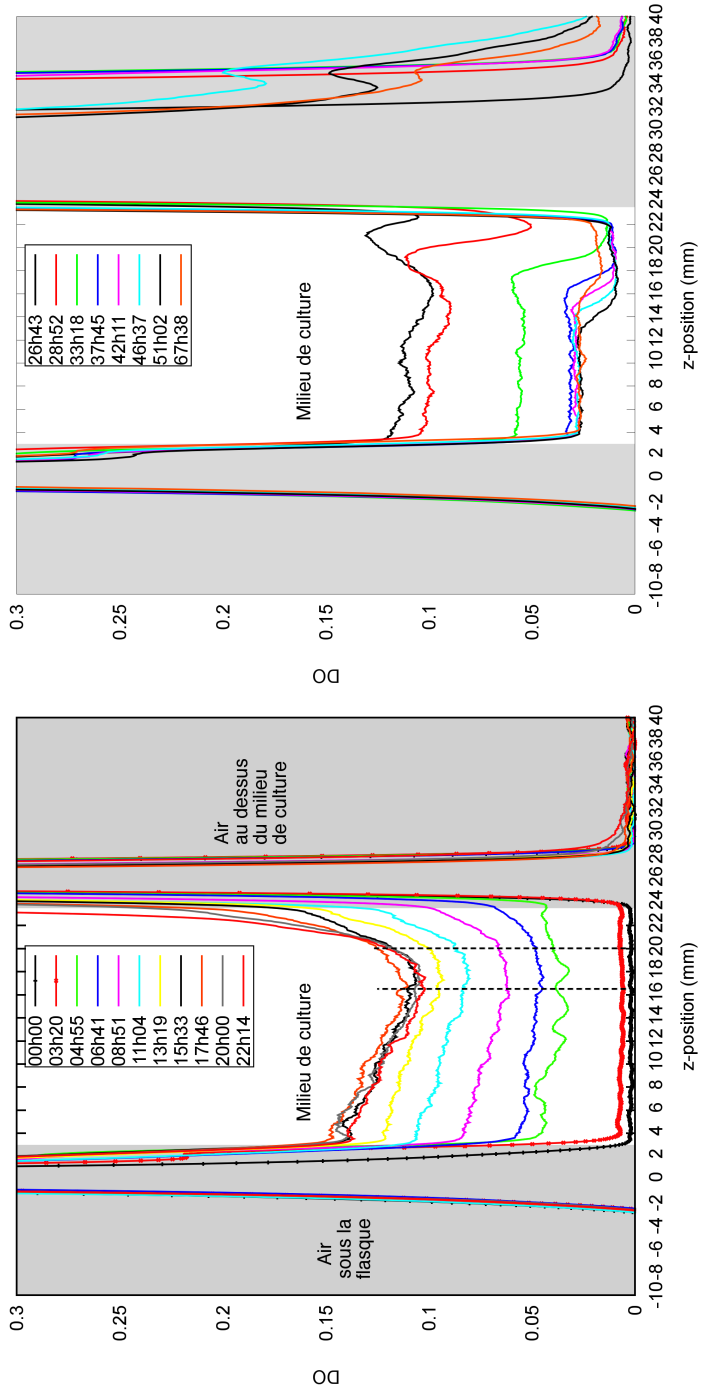


FIGURE 2.13 – Courbes de données brutes mesurées par le dispositif au cours de la formation d'un biofilm. La tension aux bornes de la résistance en série de la photodiode est tracée en fonction de la position de la boîte par rapport au laser. Au dessus de la courbe est représentée la flasque à l'horizontale vue de profil (yOz). La tranche (en réalité verticale) est balayée par le laser. Les parties noires ne sont pas transparentes (le bouchon de la flasque et le support de la flasque). Les traits rouges représentent le laser en certains points caractéristiques de la courbe. Pour mémoire, en réalité c'est la boîte qui bouge et le laser qui reste immobile. Il y a donc six zones caractéristiques sur la courbe. Il commence par passer au dessus de la flasque. Puis est arrêté par le bouchon et par le support de la flasque. Il passe ensuite à travers la flasque, d'abord dans l'air puis dans le milieu. Enfin, le laser passe dans le vide sous la flasque. La partie qui nous intéresse est là où le laser passe à travers le liquide de la flasque. Le début de la zone où le laser passe dans l'air est utilisé comme référence pour l'extinction. La zone où le laser passe dans le milieu est celle que nous voulons mesurer.



(a) Avant l'apparition du biofilm

(b) Pendant et après l'apparition du biofilm

FIGURE 2.14 – Profils de concentration bactérienne dans le milieu de culture le long de la verticale au cours de la formation d'un biofilm. La quantification est effectuée par la mesure de DO. Les profils présentent deux grands pics qui correspondent à la déviation du faisceau lorsqu'il passe sur la paroi inférieure de la boîte (position 0 mm) et sur le ménisque milieu-air (position 25 mm). A ces positions, le laser ne frappe pas la photodiode ce qui est artificiellement interprété comme une zone avec une très grande DO (zones grises). On repère grâce à la base des pics le fond de la flasque à l'abscisse 3 mm et la surface du milieu de culture à 23 mm. La zone blanche correspond donc au milieu de culture. Différents profils spécifiques sont présentés. L'origine des temps correspond à l'inoculation du milieu avec des bactéries.

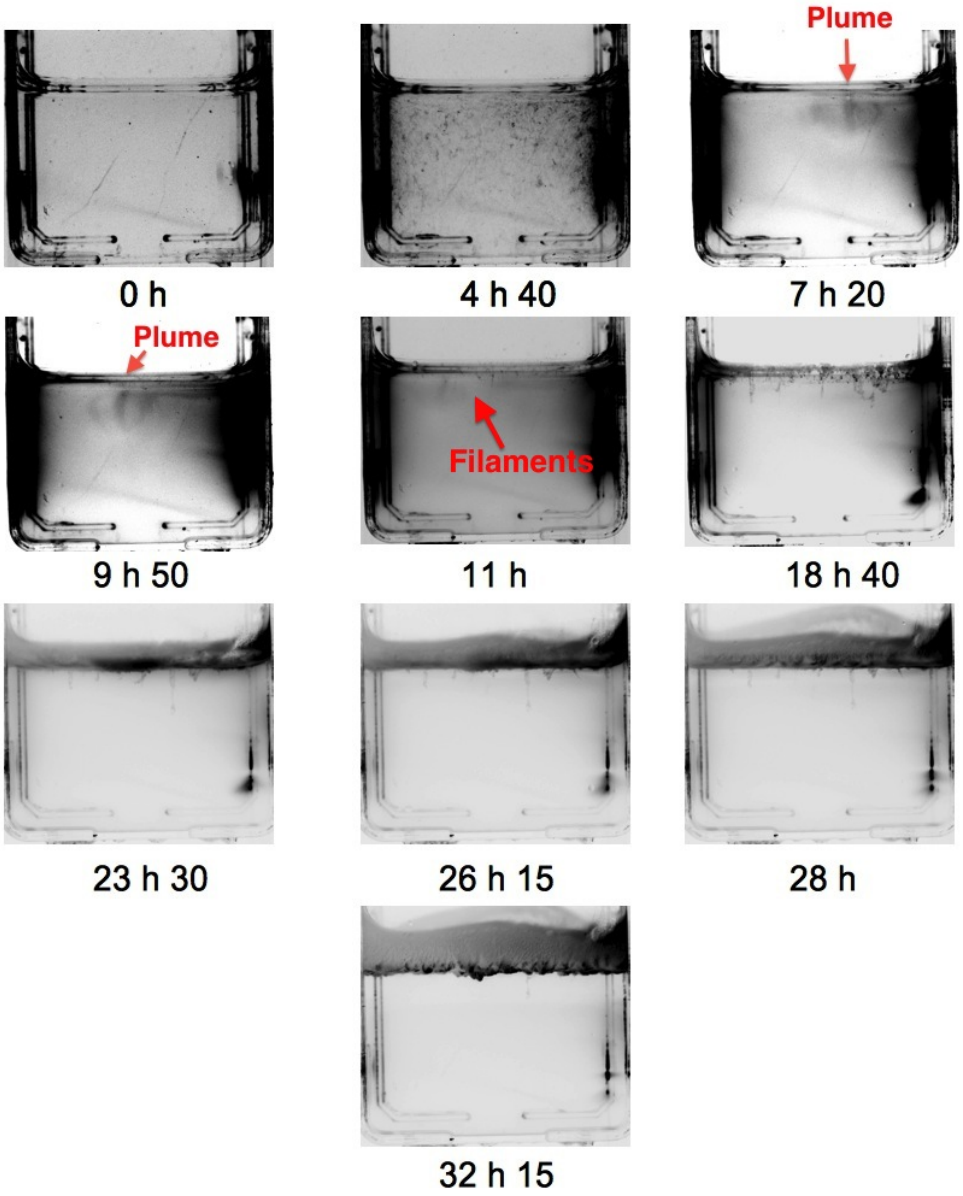


FIGURE 2.15 – Etapes de formation d'un biofilm : les phénomènes observés. La largeur de la boîte fait 4 cm. Le contraste de l'image est inversé et ajusté pour faire apparaitre nettement les phénomènes. La sélection des contrastes à t=0h révèle quelques rayures sur la flasque.

Chapitre 3

Modèle de continuum

Dans les expériences présentées précédemment nous avons pu identifier différents phénomènes qui interviennent lors de la formation d'un biofilm : l'apparition d'une accumulation de bactéries à l'interface eau-air et la présence de bioconvection. L'enjeu est de trouver quels sont les mécanismes qui en sont la cause. L'approche numérique est pour cela judicieuse car elle permet de tester la concordance entre un modèle théorique et des expériences.

Nous avons énoncé un ensemble minimal de lois (des hypothèses) qui visent à expliquer et reproduire les phénomènes observés lors de la formation d'un biofilm. Le modèle est construit pas à pas afin de tenir compte dans un premier temps du phénomène d'accumulation, puis, dans un second de la bioconvection. Notre modèle repose sur des équations aux dérivées partielles (EDP) couplée entre elles.

Le système dont nous souhaitons décrire l'évolution est semblable à celui des expériences : c'est une boîte, remplie d'un milieu de culture, contenant à l'instant initial quelques bactéries. Nous avons cependant procédé à des simplifications pour être en mesure de le simuler avec des temps raisonnables, tout en gardant sa généralité. Pour expliquer l'accumulation des bactéries à l'interface eau-air, nous utilisons une approximation mono-dimensionnelles du système. Puis, la prise en compte des mouvements du fluide pour l'étude de la bioconvection est faite par des simulations bi-dimensionnelles (2D).

3.1 Accumulation

Dans cette partie nous tenterons d'expliquer l'accumulation des bactéries à la surface du milieu de culture (interface eau-air). Nous avons vu dans l'introduction que le dioxygène peut influencer le mouvement des bactéries. En effet, BS montre une motilité particulière (aérotactisme) qui la dirige vers les zones riches en cet élément [119]. Notre hypothèse est que l'accumulation est corrélée à la concentration de dioxygène dissout dans le milieu. Dans un premier temps, nous nous attacherons à formuler mathématiquement les hypothèses de notre théorie, puis dans un second temps nous utiliserons l'outil numérique pour les étudier.

3.1.1 Le modèle de réaction-diffusion

Dans un modèle continu les grandeurs qui évoluent sont décrites par leurs champs de concentration. Dans le cas d'un modèle minimal, nous souhaitons décrire uniquement les concentrations de bactéries et de dioxygène dissous dans le milieu.

A l'échelle microscopique, une bactérie se déplace dans son environnement comme un marcheur aléatoire. A l'échelle d'une population cela se traduit par un phénomène de diffusion. De la même manière, le mouvement brownien des molécules de dioxygène se traduit par de la diffusion. Ce mécanisme tend à homogénéiser les concentrations.

L'évolution de la concentration de dioxygène est affectée par les bactéries qui le consomment. De même, la concentration en bactéries est influencée par le dioxygène à cause de l'aérotactisme. Les évolutions au cours du temps de ces concentrations sont donc couplées entre elles.

Le modèle de Keller-Segel [54] est un modèle classique d'équations de réaction-diffusion qui permet justement de décrire l'évolution d'une population de bactéries à l'aide de champs continus couplés entre eux. Ce modèle a notamment déjà servi à décrire l'affinité des bactéries pour certaines molécules (chemotactisme) [91, 105], et nous l'avons adapté afin de reproduire les expériences décrites précédemment.

Les sources de flux pour ces concentrations peuvent s'écrire selon la modélisation de la diffusion basée sur la loi phénoménologique de Fick. Pour le dioxygène la seule contribution au flux $\vec{j_c}$ que l'on considère est le flux diffusif :

$$\vec{j_c} = -D_{O_2} \vec{\nabla} c \,,$$

D_{O_2} étant le coefficient de diffusion du dioxygène dans l'eau ($D_{O_2} = 10^{-9}\, m^2{\cdot}\mathrm{s}$) et c la concentration en dioxygène.

Le flux de concentration en bactéries $\vec{j}_n$ doit tenir compte du mouvement actif de diffusion des bactéries et de leur migration vers les régions riches en dioxygène. On suppose pour ce dernier phénomène que les bactéries sont capables de sentir le gradient local de dioxygène auquel elles sont exposées. On suppose de plus que le flux de bactéries est proportionnel à ce gradient $\vec{\nabla} c$. Plus il y a de bactéries dans le gradient, plus le flux sera fort. Ainsi nous posons que le flux de bactéries qui migrent dans le gradient de dioxygène ($\vec{\nabla} c$) est proportionnel à la concentration locale de bactéries n. Le facteur de proportionnalité α calibre la réponse aérotactique de la population bactérienne et le flux s'écrit :

$$\vec{j}_n = -D_n \vec{\nabla} n + \alpha n \vec{\nabla} c \; .$$

On reconnait à nouveau un terme de diffusion appliqué à la concentration n de bactéries de coefficient $D_n = 10^{-10}\, m^2{\cdot}\mathrm{s}$. Le coefficient de diffusion dépend de la marche aléatoire active des bactéries (il ne dépend donc pas de leur taille). Le deuxième terme décrit leur dérive active selon les gradients locaux de dioxygène. Ce terme a la même direction et le même sens que le gradient de c, ce qui explique que les bactéries vont préférentiellement vers les zones toujours plus riches en dioxygène. De plus, afin d'éviter une accumulation non physique des bactéries au delà de leur concentration d'empilement compacte n_c, on introduit une saturation adhoc du flux $f(n) = \left(\frac{n}{n_c} - 1\right)^2$ qui vient annuler le flux de bactéries quand n tend vers n_c. On a alors :

$$\vec{j}_n = \left(\frac{n}{n_c} - 1\right)^2 \left(-D_n \vec{\nabla} n + \alpha n \vec{\nabla} c\right) \; .$$

Les équations d'évolution des concentrations dans le temps s'obtient à partir de l'équation de conservation de la matière. Celle-ci fait intervenir des termes de source et de perte. Considérant la concentration des bactéries, le terme de source essentiel est leur multiplication par division cellulaire. On pose que les bactéries se divisent avec un taux β qui est l'inverse du temps de division moyen d'une bactérie, ce qui aboutit dans un milieu homogène à une croissance exponentielle.

Pour limiter cette croissance exponentielle, on considère que les bactéries se divisent moins vite quand leur concentration approche n_c. Pour cela, on utilise encore une fois la fonction $f(n)$ pour annuler le taux de division β quand n égal n_c.

De plus, *Bacillus subtilis* a besoin de dioxygène pour son métabolisme car elle est aérobique stricte [71]. On pose alors que le taux de division des bactéries dépend de la concentration en dioxygène. Lorsque la concentration en dioxygène est grande, le taux effectif de division est indépendant de la concentration. En revanche, si la concentration de dioxygène devient faible le taux effectif de division dépend linéairement de la concentration en dioxygène. Ces deux conditions sont assurées par le terme bien connu de Michaelis-Menten $\frac{c}{c+K}$. La constante K peut être vue comme un seuil de transition d'un régime à l'autre. Quand c est égal à K, le taux de croissance est divisé par deux.

Le dioxygène, lui, est consommé par les bactéries. En supposant que ce processus est semblable à une réaction enzymatique, on pose que la consommation de dioxygène suit aussi une loi de Michaelis-Menten de constante de Michaelis K et de taux γ. On obtient alors le jeu d'équations :

$$\left\{ \begin{array}{ll} \frac{\partial n}{\partial t} & = \overrightarrow{\nabla}\left[f(n)\left(D_n\overrightarrow{\nabla}n - \alpha n\overrightarrow{\nabla}c\right)\right] + n\beta\frac{c}{c+K}f(n) \\ \frac{\partial c}{\partial t} & = D_{O_2}\triangle c - \gamma n\frac{c}{c+K} \end{array} \right. \tag{3.1}$$

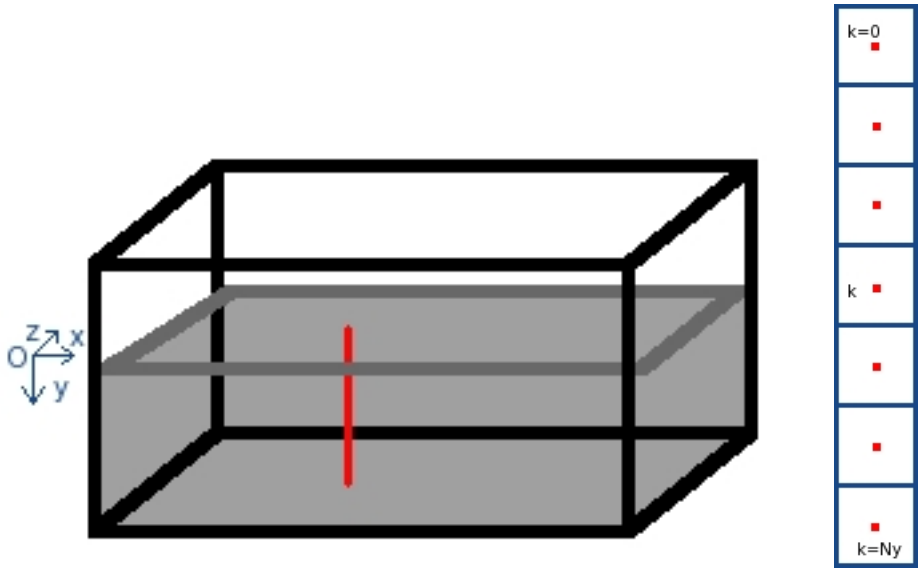
avec $f(n) = \left(\frac{n}{n_c} - 1\right)^2$.

Pour finir, on doit spécifier les conditions aux bords utilisées dans ce modèle. Le système étudié est un milieu ouvert sur l'air à un de ces bords et fermé aux les autres. Sur les murs de la boîte, ni le dioxygène ni les bactéries ne peuvent sortir. On impose donc que les flux de concentration aux murs doivent s'annuler. Il en est de même pour les bactéries à la surface du milieu (interface eau-air). En revanche, le dioxygène pénètre dans le milieu de culture par la surface. Il y a donc une source à cet endroit. On fixe sa valeur à celle de la concentration de saturation du dioxygène dissout dans l'eau (condition au bords de Dirichlet), soit $C_0 = 1,5.10^{23}$ molecules.m^{-3}.

3.1.2 Simulation en une dimension

Nous souhaitons maintenant résoudre le jeu d'équations (3.1), c'est à dire calculer la valeur de n et c en fonction du temps. Considérons à présent la boîte utilisée dans les expériences, remplie à moitié de milieu de culture. Dans cette configuration, le milieu liquide atteint une hauteur de L_y.

Avec une concentration de départ homogène en bactéries et en dioxygène, le système est invariant selon les translations d'axe (Ox) et (Oz). En effet, les conditions aux bords en $x = 0$ et $x = L_x$ ainsi que $z = 0$ et $z = L_z$ sont identiques. La seule source d'inhomogénéité provient de la condition



(a) (b)

FIGURE 3.1 – La figure 3.1a est un schéma de la boîte utilisée dans les expériences. Le milieu de culture est représenté en gris. On souhaite simuler l'évolution des concentrations en bactéries et en oxygène selon un segment vertical (axe Oy) représenté en rouge. Le segment va du fond de la boîte jusqu'à la surface du milieu. La figure 3.1b montre un schéma de la discrétisation de la ligne 1D. Le segment est découpé en N_y éléments de taille dy. Chaque élément est repéré par son centre à la position $k \times dy$.

aux bords du dioxygène à la surface en $y = 0$. Dans un premier temps, nous résoudrons le jeu d'équations sur un segment vertical d'axe (Oy) de longueur $[0, L_y]$.

Pour résoudre les équations (3.1) nous commençons par adimensionner le système. On utilise les grandeurs $\tilde{c} = \frac{c}{C_0}$ et $\tilde{n} = \frac{n}{n_c}$ (ou n_c est la concentration d'empilement compact des bactéries et C_0 la concentration à saturation du dioxygène dans l'eau). Seuls les termes non linéaires du système d'équations (3.1) s'en trouvent modifiés. Notamment $\alpha n \overrightarrow{\nabla} c$ qui donne après simplification par n_c : $\alpha C_0 \tilde{n} \overrightarrow{\nabla} \tilde{c}$.

L'évolution de n et c le long de ce segment est calculée grâce à la méthode numérique des différences finies et un schéma temporel de type Euler explicite (annexe 6.2 ou [125]). Cette méthode est intéressante pour sa commodité, sa rapidité et sa faible demande en ressources mémoire qu'elle nécessite. Le calcul du flux de bactéries donne :

$$\begin{aligned} j_{\tilde{n}}[y - \tfrac{dy}{2}, t] \quad = \quad & f\left(\tilde{n}[y,t]\right) \Big(D_n \tfrac{\tilde{n}[y,t] - \tilde{n}[y-dy,t]}{dy} \\ & - \alpha C_0 \tfrac{\tilde{n}[y,t] + \tilde{n}[y-dy,t]}{2} \tfrac{\tilde{c}[y,t] - \tilde{c}[y-dy,t]}{dy} \Big) \end{aligned}$$

La nouvelle concentration en bactéries calculée en tenant compte du flux et du processus de division est :

$$\tilde{n}(y, t{+}dt) = \tilde{n}(y,t){+}dt \left\{ \frac{j_{\tilde{n}}[y + \frac{dy}{2}, t] - j_{\tilde{n}}[y - \frac{dy}{2}, t]}{dz} + f\left(\tilde{n}[y,t]\right) \tilde{n}[y,t] \beta \frac{\tilde{c}[y,t]}{\tilde{c}[y,t] + K/C_0} \right\} .$$

De même pour la concentration en dioxygène, on calcule le flux

$$j_{\tilde{c}}[y - \frac{dy}{2}, t] = D_{O_2} \frac{\tilde{c}[y,t] - \tilde{c}[y - dy, t]}{dz} ,$$

et la concentration normalisée

$$\tilde{c}(y, t{+}dt) = \tilde{c}(y,t){+}dt \left\{ \frac{j_{\tilde{c}}[y + \frac{dy}{2}, t] - j_{\tilde{c}}[y - \frac{dy}{2}, t]}{dy} - \gamma n_c \tilde{n}[y,t] \frac{\tilde{c}[y,t]}{\tilde{c}[y,t] + K/C_0} \right\} .$$

On remarque que les flux et les concentrations ne sont pas définis aux mêmes endroits. Les flux sont définis entre les petits éléments de taille dy tandis que les concentrations sont définis en leur centre (voir figure 3.1). Les flux de bactéries doivent être nuls en haut et en bas de la ligne, le flux d'oxygène est nul en bas de la ligne et la concentration d'oxygène et fixée en

haut de la ligne. La frontière physique du segment est donc située là où les flux sont défini en $L_y + \frac{dy}{2}$ et $-\frac{dy}{2}$ comme on peut le voir sur la figure 3.1b. Pour imposer ces conditions on utilise des points virtuels qui se trouvent après chaque extrémité de la ligne, aux positions $(-dy)$ et $(L_y + dy)$. Ainsi, en posant que

$$\tilde{c}(-dy, t) = 2 - \tilde{c}(0, t)\,,$$

on assure que la concentration en dioxygène est constante à la surface du milieu en $y = -\frac{dy}{2}$. En écrivant que :

$$\tilde{c}(L_y + dy, t) = \tilde{c}(L_y, t)\,,$$

on respecte les conditions aux bords de flux nul pour le dioxygène au fond de la boîte. Et

$$\tilde{n}(L_y + dy, t) = \tilde{n}(L_y, t)\,,$$

$$\tilde{n}(0, t) = \tilde{n}(-dy, t)\,,$$

impliquent qu'aucune bactérie ne s'échappe du milieu.

Maintenant que le modèle et l'algorithme utilisés sont décrits, nous allons discuter les valeurs des paramètres utilisés.

3.1.3 Choix des paramètres

Il y a différents types de paramètres à choisir : les paramètres physiques et les paramètres numériques. D'abord, nous discuterons du choix du coefficient associé à l'aérotactisme α et à la concentration maximale n_c. Ensuite, nous verrons que compte tenu des valeurs des paramètres physiques, les paramètres numériques dy et dt doivent respecter certaines contraintes.

3.1.3.1 Choix du coefficient d'aérotactisme

Le coefficient α est le paramètre qui module la réponse aérotactique des bactéries. Selon sa valeur, les bactéries migreront plus ou moins rapidement vers les zones riches en oxygène. La valeur de α n'est pas connue expérimentalement. Pour la choisir, nous allons étudier l'influence de ce paramètre sur le système par analyse dimensionnelle. Le terme $\alpha\vec{\nabla}c$ dans l'équation (3.1) est homogène à une vitesse. Cette vitesse correspond en loi d'échelle à la vitesse macroscopique de dérive des bactéries v_d dans un gradient d'oxygène

($\overrightarrow{\nabla} c$). Puisqu'une population de bactéries ne peut pas aller plus vite qu'une bactérie individuelle, cela impose donc une limite à la valeur de $\alpha \overrightarrow{\nabla} c$. C'est à dire pour *Bacillus subtilis* (B168) une vitesse de propulsion de l'ordre de $20\,\mu\text{m.s}^{-1}$.

Si on cherche la valeur extrémale de α, il faut connaitre la valeur maximale du gradient de dioxygène. Nous verrons dans la section 3.1.4 que le gradient maximal d'oxygène ($\overrightarrow{\nabla} c$) observé dans les simulations est de $C_0/1\text{mm} \sim 10^{26}\,\text{molecule}\cdot\text{m}^{-4}$. Ainsi, on obtient que $\alpha < 10^{-31}\,\text{m}^5 \cdot \text{s}^{-1}\cdot\text{molecule}^{-1}$.

On prend alors une valeur typique pour α de $3,3.10^{-33}\,\text{m}^5\cdot s^{-1}.\text{molecule}^{-1}$. Cela implique que la vitesse de dérive dans un gradient de $10^{26}\,\text{molecule}\cdot\text{m}^{-4}$ sera de l'ordre de $v_d = 1\,\mu\text{m} \cdot s^{-1}$.

3.1.3.2 Choix de la concentration n_c

La concentration d'empilement compact des bactéries n_c correspond à la concentration où les bactéries n'ont plus de place ni pour se diviser ni pour bouger. Dans la nature, la taille typique de *Bacillus subtilis* est de 4μm de long dans une culture concentrée (partie 2.2.2). Si on considère que ces bactéries sont des cubes de côtés 4μm la valeur d'empilement compacte est $n_c = 1/(4.10^{-6})^3 \sim 10^{16}\,\text{bacteries} \cdot \text{m}^{-3}$.

3.1.3.3 Choix du pas de temps

Les paramètres d'une simulation utilisant la méthode des différences finies avec un schéma de calcul FTCS ((*forward Time Centered Space*) ne sont pas indépendants les un des autres. Notamment en fixant le pas spatial dy et les coefficient de diffusion D_{O_2} et D_n on impose une limite supérieure pour le pas de temps dt. Si on ne respecte pas cette condition, le calcul incrémental avec le temps de c et de n devient instable. Pour plus d'explications voir l'annexe 6.3.

Donc pour que la simulation ne diverge pas on doit imposer que $dt < \frac{dy^2}{2\times max(D_{O_2},D_n)}$. Pour $D_n = 10^{-10}\,\text{m}^2 \cdot s^{-1}$, $D_{O_2} = 10^{-9}\,\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $dy = 10^{-5}\,\text{m}$ on choisit $dt = 10^{-2} < 5.10^{-2}\,\text{s}$.

3.1.3.4 Tableau récapitulatif

Le tableau (3.1) récapitule la valeur des paramètres dont nous avons discutés et donne celles des paramètres physiques qu'on peut trouver dans la

littérature.

Paramètres	symboles	valeurs	unités
Coefficient de diffusion des bactéries [22]	D_n	10^{-10}	$\mathrm{m.s}^{-2}$
Coefficient d'aérotactisme des bactéries	α	$3,3.10^{-33}$	$\mathrm{m}^5.s^{-1}.\mathrm{molecule}^{-1}$
Temps de division des bactéries	$1/\beta$	100	min
Coefficient de diffusion de l'oxygène	D_{02}	10^{-9}	$\mathrm{m.s}^{-2}$
taux de consommation d'oxygène [33]	γ	10^6	$\mathrm{molecule.bacterium}^{-1}.\mathrm{s}^{-1}$
Constant de Michaelis de la consommation d'oxygène	K	10^{20}	$\mathrm{molecule.m}^{-3}$
Concentration d'empilement compacte des bactéries	n_c	10^{16}	$\mathrm{bacteries.m}^3$
Concentration d'oxygène dissout dans l'eau à saturation	C_0	$1.5.10^{23}$	$\mathrm{molecule.m}^{-3}$
Concentration en bactériesà l'instant initiale	$n(t=0)$	10^8	$\mathrm{bacteries.m}^3$

TABLE 3.1 – Paramètres du modèle

3.1.4 Résultats

3.1.4.1 Evolution temporelle de la concentration en bactéries et en dioxygène

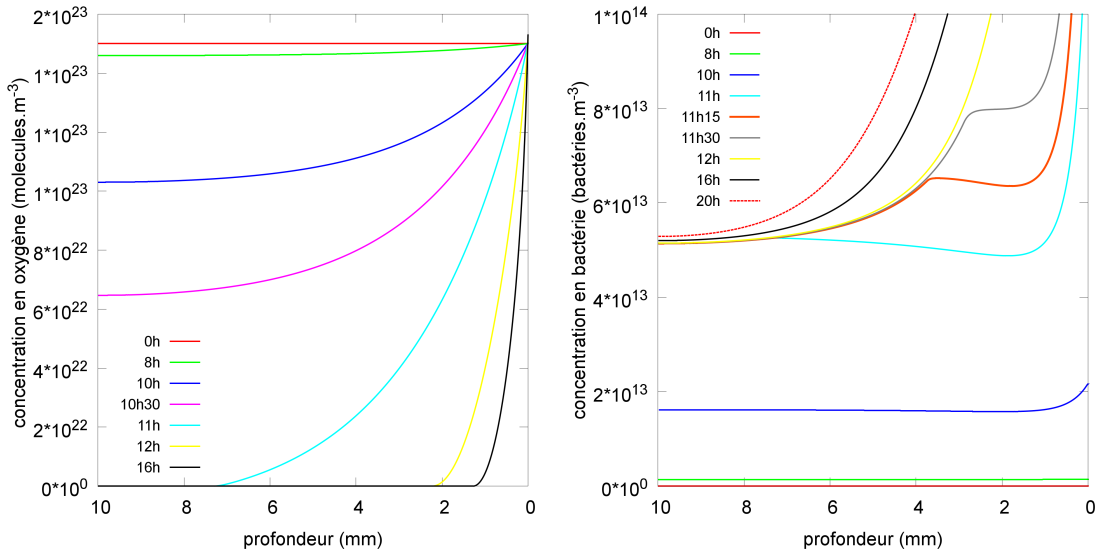
La méthode numérique permet de calculer l'évolution des concentrations de dioxygène et de bactéries modélisées par le système d'équations (3.1). La figure 3.2a montre l'évolution de la concentration en dioxygène le long de la ligne verticale. L'interface eau-air se trouve en $y = 0\,\mathrm{mm}$, et le fond de la boîte en $y = 10\,\mathrm{mm}$. Les différentes courbes de couleur sont des profils tracés à différents instants. L'origine des temps correspond à une concentration en bactéries homogène très diluée ($n(t = 0) = 10^8\,\mathrm{bacteries.m}^{-3} = 10^{-10}\,\mathrm{bacteries.}\mu\mathrm{m}^{-3}$) ; le dioxygène est quant à lui partout à sa valeur de saturation C_0.

Nous constatons que la concentration de dioxygène diminue au cours du temps, principalement dans le fond de la boîte. Elle ne commence à chuter de manière significative qu'à partir de 8h quand la concentration en bactéries est d'environ 10^{11} bactéries.m^{-3}.

A l'interface eau-air, la concentration en dioxygène reste égale à C_0. Au cours du temps, apparait un gradient de la concentration en dioxygène. Ce gradient est fort sous la surface et devient plus faible avec la profondeur du milieu.

Au bout d'environ 14 h, la distribution du dioxygène dans la boîte se stabilise. La concentration varie alors de C_0 à zéro entre la surface et 1 mm de profondeur, et elle reste nulle après 1 mm.

Parallèlement à l'apparition d'un gradient d'oxygène, la concentration en bactéries évolue. Dans la figure 3.2b sont reportées à différents instants les profils de la concentration en bactéries issus de la simulation. Dans l'ordre chronologique, la concentration augmente de manière homogène tout le long du profil. Puis, vers 10h (courbe bleue figure 3.2b) on voit une accumulation de bactéries apparaitre sous l'interface eau-air ($y = 0$ mm). La concentration continue d'augmenter à la surface tandis que, comme le montre la courbe de 11h (figure 3.2b ligne violette), une zone de déplétion devient visible à la base de l'accumulation ($y = 1$ mm) comparativement à la concentration du fond de la boîte ($y = 10$ mm). La zone de déplétion est ensuite comblée en moins d'une heure. On voit alors une marche à la base de l'accumulation. Peu a peu cette marche s'estompe pour se fondre dans l'accumulation qui s'étend sur 8 mm après 20h simulées.



(a) (b)

FIGURE 3.2 – Simulation 1D du modèle d'équation réaction diffusion décrivant la concentration de bactérie et d'oxygène au cours du temps.

Les étapes d'évolution de la concentration en bactéries correspondent à ce

que nous observons dans les expériences avant la formation d'un biofilm. De plus, la cinétique de l'évolution est également en accord avec les expériences (voir la figure 2.14a).

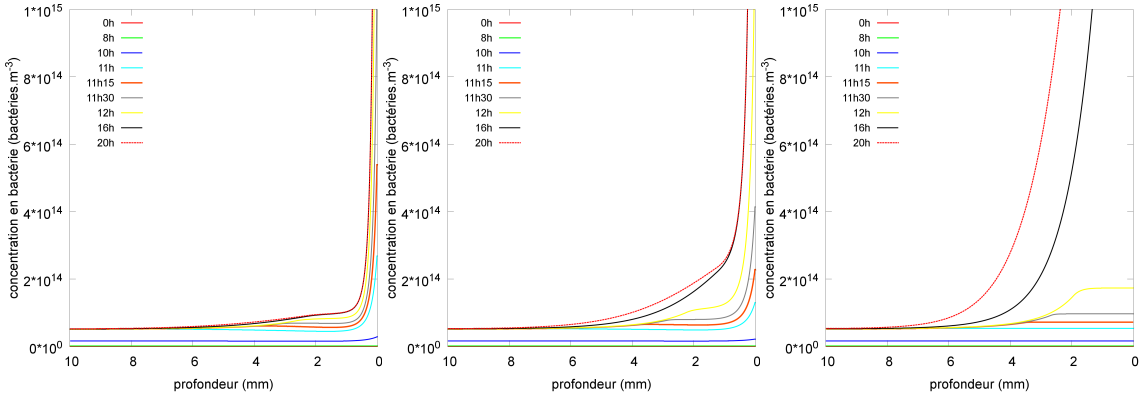
Dans la suite, nous étudierons les influences de l'aérotactisme et de la division des bactéries.

3.1.4.2 Influence de α et de la division sur l'accumulation des bactéries

Les figures 3.3a, 3.3b et 3.3c permettent de comparer l'évolution de la concentration en bactéries pour différentes valeurs du coefficient d'aérotactisme $\alpha = 1,5.10^{-33}\,\mathrm{m}^5 \cdot s^{-1} \cdot \mathrm{molecule}^{-1}$, $\alpha = 7,5.10^{-33}\,\mathrm{m}^5 \cdot s^{-1} \cdot \mathrm{molecule}^{-1}$, $\alpha = 0$ respectivement. La figure 3.3b provient de la même simulation que la figure 3.2, seul un changement d'échelle a été opéré. Dans ce cas, la concentration de bactéries à la surface augmente plus rapidement avec aérotactisme que sans. Par exemple la courbe représentant la concentration à 11h (figure 3.3a) montre qu'avec aérotactisme la concentration en bactéries est d'environ $3.10^{14}\,\mathrm{bacteries} \cdot \mathrm{m}^{-3}$ tandis que sans aérotactisme, à la surface, la concentration est de moins de $1 \cdot 10^{14}\,\mathrm{bacteries.m}^{-3}$ (figure 3.3c). Par ailleurs, dans les cas où il y a migration des bactéries, (figures 3.3a et 3.3b) on voit naitre à partir de 10h une accumulation. Le terme de α qui calibre la migration des bactéries dans un gradient de dioxygène est essentiel pour rendre compte d'une augmentation rapide de la concentration à l'interface eau-air. Sur les figures 3.3 l'épaisseur de l'accumulation dépend de la valeur de α. Plus ce coefficient est grand plus l'accumulation est fine.

Enfin, il y a formation d'une marche à la base du pic même sans aérotactisme (figure 3.3c). L'apparition de cette marche sur la figure 3.3b s'explique donc uniquement par le mécanisme de division des bactéries. Dans les équations (3.1), on utilise une fonction de type Michaelis-Menten pour moduler le taux de croissance de bactéries. Cette fonction vaut 1 quand il y a assez de dioxygène et décroit vers zéro quand il n'y en a pas assez. Donc tant qu'il y a assez de dioxygène les bactéries se divisent. A 11 h (figure 3.2a) il y a du dioxygène jusqu'à 6 mm de profondeur. Les bactéries continuent donc de se diviser dans la région entre 0 et 6 mm sous la surface et ne se divisent plus au delà de 6 mm. Apparait alors une marche de concentration entre ces deux régions. La zone de déplétion observée à 10 h (figure 3.2b) de 2 mm sous la surface est comblée par la division.

Pour conclure, la valeur de α conditionne l'apparition rapide d'une ac-



(a) (b) (c)

FIGURE 3.3 – Comparaison de simulation 1D du modèle avec et sans aérotactisme. La figure 3.3b présente la même simulation que la figure 3.2b seule l'échelle en ordonnée est changée ($\alpha = 7,5.10^{-33}\,\mathrm{m}^5.s^{-1}.\mathrm{molecule}^{-1}$). Dans les simulations présentées sur les figures 3.3a et 3.3c tous les paramètres sont identiques à la simulation de la figure 3.2 excepté le coefficient d'aérotactisme qui est égal à $\alpha = 1,5.10^{-32}\,\mathrm{m}^5.s^{-1}.\mathrm{molecule}^{-1}$ et $\alpha = 0\,\mathrm{m}^5.s^{-1}.\mathrm{molecule}^{-1}$, respectivement. .

cumulation à la surface du milieu de culture. Plus α est grand, plus l'accumulation sera localisée sous la surface. Enfin, la division des bactéries joue également un rôle et vient épaissir l'accumulation dans un second temps après l'effet de l'aérotactisme.

3.1.4.3 Conclusions et perspectives

Le modèle simple que nous avons développé reproduit une accumulation des bactéries sur quelques millimètres d'épaisseur à l'interface eau-air en des temps de l'ordre de la dizaine d'heures. Il semble donc accréditer le mécanisme suivant pour la formation d'une accumulation de bactéries à la surface : les bactéries consomment le dioxygène dissout dans l'eau, cela produit un gradient de dioxygène dirigé vers la surface. Comme elles sont également sensibles à ce gradient, elles migrent vers la surface, cela fait augmenter la concentration des bactéries à cet endroit.

De la valeur du coefficient d'aérotactisme α dépend l'épaisseur de l'accumulation et la vitesse à laquelle augmente la concentration de bactéries à l'interface eau-air.

Ce modèle réussit à imiter qualitativement le phénomène observé expérimentalement d'accumulation des bactéries à la surface du milieu de culture. Nous allons donc poursuivre l'étude des étapes de la formation d'un biofilm à partir de celui-ci.

Pour raffiner le modèle et le rendre plus réaliste nous allons ajouter un autre processus de transport de la matière : la convection du fluide. Dans la section suivante nous rechercherons les causes de la convection du fluide ainsi que les conséquences de phénomène sur la répartition des bactéries et l'oxygène dans le milieu.

3.2 Bioconvection

3.2.1 Introduction

Après avoir modélisé la migration des bactéries et décrit leur accumulation à la surface, nous nous intéressons desormais à un autre mécanisme qui pourrait contrebalancer ce phénomène. L'une des observations expérimentales que nous avons pu faire dans une culture de bactéries est l'apparition de convection du fluide. Il a déjà été constaté [51, 47, 46] que cette convection est due à une répartition instable (du point du vue hydrodynamique)

des micro-organismes dans le fluide. Ce phénomène s'appelle bioconvection. Nous simulerons la bioconvection dans le cadre du modèle déjà décrit pour la migration des bactéries.

3.2.2 Modélisation

Jusqu'à maintenant, le modèle prennait en compte deux champs (les concentrations de dioxygène et de bactéries), nous allons en ajouter deux autres afin de décrire le fluide. Le mécanisme supposé déclencher la convection du fluide est le suivant : les bactéries s'accumulent à l'interface eau-air, cela crée une stratification hydrodynamique instable du fait de leur densité légèrement supérieure à celle de l'eau. Les couches supérieures du fluide tombent alors dans les couches inférieures.

Les questions que nous nous posons sont : est-ce le bon mécanisme ? Si oui, combien de temps faut-il pour que de la bioconvection apparaisse dans le système ? Et enfin, comment évolue t-elle au cours du temps ?

3.2.2.1 Modélisation du fluide

Dans un premier temps, les équations qui régissent les concentrations de dioxygène et de bactéries eq. (3.1) section 3.1 sont modifiées pour tenir compte du transport par convection. Dans un second temps, nous avons modélisé le fluide. D'un point de vue strict, ce système est constitué de deux fluides, c'est une émulsion entre de l'eau et des bactéries. Cependant, les bactéries sont diluées dans l'eau et leur densité massique n'est supérieure que de 3% à celle de l'eau (C. Douarche). Il est alors rigoureux de décrire le système dans l'approximation de Boussinesq pour un fluide incompressible comme un seul fluide de densité constante (égale à celle de l'eau). On ne tient compte de la différence de densité que dans les termes liés à la gravité [43]. L'équation de Navier Stokes fait intervenir habituellement deux champs : le champ de vitesse du fluide (vectoriel) $\overrightarrow{u}$ et le champ de pression du fluide (scalaire) P. Elle s'écrit :

$$\frac{\partial \overrightarrow{u}}{\partial t} + \left(\overrightarrow{u} \cdot \overrightarrow{\nabla}\right) \overrightarrow{u} = \nu \Delta \overrightarrow{u} - \frac{\overrightarrow{\nabla} P}{\rho} + \frac{\rho_n - \rho}{\rho} V_n n \overrightarrow{g} \,. \tag{3.2}$$

Le terme de gauche est la dérivée Lagrangienne de la vitesse. Le premier terme de droite modélise la diffusion de la quantité de mouvement dans le fluide grâce à sa viscosité. Le deuxième terme décrit la pression dans le fluide.

Le troisième traduit l'effet de la compétition entre la poussée d'Archimède et le poids agissants sur une particule mésocopique du fluide contenant un nombre $V_n n$ de bactéries (V_n étant le volume d'une bactérie). La densité des bactéries est notée ρ_n. Le vecteur $\overrightarrow{g}$ représente l'accélération gravitationnelle.

L'équation de conservation de la matière s'écrit :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \overrightarrow{\nabla}(\rho \overrightarrow{u}) = 0\,.$$

L'hypothèse de fluide incompressible (dans l'approximation de Boussinesq) implique que ρ est constant et donc que :

$$\overrightarrow{\nabla}\overrightarrow{u} = 0\,.$$

Nous avons donc posé les hypothèses utilisées pour la description du fluide. Le système est modélisé par des quantités continues. Le fluide est considéré comme incompressible et nous calculons son évolution dans l'approximation de Boussinesq. Dans la suite, nous verrons dans quelle configuration nous choisissons de calculer l'évolution du système.

3.2.2.2 Simplification du modèle

Contrairement au modèle 1D précédent, il faut tenir compte des bords latéraux de la boîte. En effet, ceux-ci jouent un rôle important dans le mouvement du fluide. En tenant compte des bords nous pouvons simplifier la géométrie du système pour le modéliser plus aisément. Ainsi, à partir de maintenant, on modélise le système en deux dimensions selon un plan vertical (Oxy). Cela permet de simplifier drastiquement la description du fluide.

Dans un système à deux dimensions, il est judicieux de décrire le fluide non pas avec les champs de vitesse et de pression (équation (3.2)) mais avec ceux de la vorticité (ω) et de la fonction courant (ψ). La vorticité est le rotationel de la vitesse $\overrightarrow{\omega} = \overrightarrow{\nabla} \times \overrightarrow{u}$ et, le rotationnel de la fonction courant donne la vitesse $\overrightarrow{u} = \overrightarrow{\nabla} \times \overrightarrow{\psi}$.

La description du fluide avec ces deux quantités offre deux avantages. Le premier vient du fait que par construction la vorticité et la fonction courant sont orthogonales à la vitesse du fluide. En deux dimensions, ces deux grandeurs se réduisent donc à deux scalaires *In fine* (pour les détails, voir l'annexe) nous obtenons l'équation suivante projetée sur l'axe (Oz) pour la vorticité :

$$\frac{\partial \omega}{\partial t} + \left(\overrightarrow{v} \cdot \overrightarrow{\nabla}\right)\omega = \nu \Delta \omega + \frac{\rho_n - \rho}{\rho} V_n \frac{\partial n}{\partial x} \overrightarrow{g} . \overrightarrow{e}_y$$

Le deuxième avantage est l'absence du terme de pression. Cela veut dire que la condition d'incompressibilité du fluide est respectée de manière intrinsèque. En fait, la fonction courant qui tient compte de cette hypothèse intervient lors du calcul, c'est à dire :

$$\overrightarrow{\omega} = \overrightarrow{\nabla} \times \overrightarrow{v} = \overrightarrow{\nabla} \times (\overrightarrow{\nabla} \times \overrightarrow{\psi}) = \overrightarrow{\nabla}(\overrightarrow{\nabla} . \overrightarrow{v}) - \Delta \overrightarrow{\psi}$$

soit en projection sur (Oz)

$$\triangle \psi = -\omega \, .$$

3.2.2.3 Forme finale du modèle de la bioconvection et conditions aux bords

Le modèle complet tient compte des équations sur n et c dans lesquelles nous avons ajouté le transport convectif. Le système d'équations à résoudre est :

$$\left\{ \begin{array}{lcc} \frac{\partial n}{\partial t} + \left(\overrightarrow{u} \cdot \overrightarrow{\nabla}\right) n & = & \overrightarrow{\nabla}\left[f(n)\left(D_n \overrightarrow{\nabla} n - \alpha n \overrightarrow{\nabla} c\right)\right] + n\beta \frac{c}{c+K} f(n) \\ \frac{\partial c}{\partial t} + \left(\overrightarrow{u} \cdot \overrightarrow{\nabla}\right) c & = & D_{O2} \triangle c - \beta n \frac{c}{c+K} \\ \frac{\partial \omega}{\partial t} + \left(\overrightarrow{u} \cdot \overrightarrow{\nabla}\right) \omega & = & \nu \Delta \omega + \frac{\rho_n - \rho}{\rho} V_n \frac{\partial n}{\partial x} \overrightarrow{g} \cdot \overrightarrow{e}_y \\ \triangle \psi & = & -\omega \\ \overrightarrow{u} & = & \overrightarrow{\nabla} \times \psi \end{array} \right. \tag{3.3}$$

Les conditions aux bords de la vitesse et de la fonction courant (celles sur la vorticité sont dérivées de la vitesse) sont les suivantes : Au niveau des murs, le fluide ne peut ni sortir (il n'y a pas de fuite) ni glisser, la vitesse y est donc nulle. En revanche, la surface du liquide est une surface libre où le fluide peut glisser librement le long de la surface. Pour des raisons de simplicité, on pose que l'interface reste parfaitement plane. La composante normale de la vitesse est donc définie comme nulle et nous posons une condition de friction

nulle pour la composante tangentielle de la vitesse. Cette denière s'écrit :

$$\frac{\partial u_x}{\partial y} = 0$$

Les conditions aux bords pour la fonction courant sont simples. La dérivée tangentielle de la fonction courant est proportionnelle à la composante normale de la vitesse, elle est donc nulle partout sur les bords. Ainsi, la fonction courant est constante sur la frontière, sa valeur est fixé à zéro. Quant à la vorticité sur les bords, elle est calculée par différence avale ou amont de la vitesse [85].

3.2.3 Simulations

3.2.3.1 Résolution des équations

Pour résoudre le nouveau système d'équations (3.3), nous utilisons la même méthode des différences finies que dans la section 3.1.2. Le système bi-dimensionnel est découpé en petits éléments carrés dans lesquels on peut définir les champs de concentrations d'oxygène et de bactéries ainsi qu'une valeur moyenne de la vitesse, de la vorticité et de la fonction courant du fluide. Chaque élément est repéré par la position de son centre (x,y). En reliant les centres de chaque élément, l'espace est maillé comme sur la figure 3.4.

Le système étant bidimensionnel, il faut calculer deux composantes pour les termes de flux $\vec{j_n}$ et $\vec{j_c}$. Les flux sont définis sur les traits reliants chaque point du maillage présenté sur la figure 3.4. Afin de simplifier le calcul de ces flux nous allons d'ailleurs utiliser une petite subtilité. Comme la fluide est incompressible $\vec{\nabla}.\vec{v} = 0$ on peut écrire $(\vec{v}\cdot\vec{\nabla})n = \vec{v}\cdot\vec{\nabla}n + n\vec{\nabla}.\vec{v} = \vec{\nabla}\cdot(\vec{v}n)$. Ce qui donne pour la composante horizontale (Ox) du flux des bactéries :

$$\begin{aligned} j_{xn}[x-\tfrac{dx}{2},y,t] = \Big(&-D_n\tfrac{n[x,y,t]-n[x-dx,y,t]}{dx} \\ &+\alpha\left(\tfrac{n[x,y,t]+n[x-dx,y,t]}{2}\right)\left(\tfrac{c[x,y,t]-c[x-dx,y,t]}{dx}\right) \\ &+\left(\tfrac{n[x,y,t]+n[x-dx,y,t]}{2}\right)\left(\tfrac{u_x[x,t]+u_x[x-dx,y,t]}{2}\right)\Big) . \end{aligned}$$

Nous calculons de la même manière j_{yn} la concentration en bactéries n peut alors être évaluée avec :

$$\begin{aligned} n[x,y,t+dt] = n[x,y,t] - dt\Big\{&\tfrac{j_{xn}[x+\frac{dx}{2},y,t]-j_{xn}[x-\frac{dx}{2},y,t]}{dx} \\ &+\tfrac{j_{yn}[x,y+\frac{dy}{2},t]-j_{yn}[x,y-\frac{dy}{2},t]}{dy} + f\left(n[x,y,t]\right)n[x,y,t]\beta\tfrac{c[x,y,t]}{c[x,y,t]+K}\Big\} . \end{aligned}$$

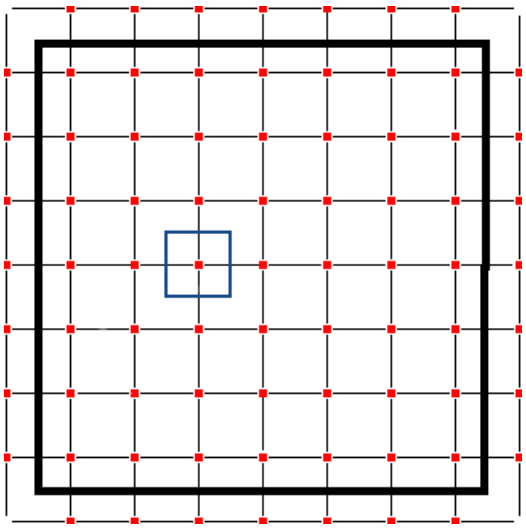


FIGURE 3.4 – Représentation du système 2D dans lequel l'évolution des bactéries, de l'oxygène et du fluide sont simulés. La boîte a une dimension $L_x \times L_y$ et ses bords sont marqués par un trait noir en gras. Les bords de gauche, de droite et du bas (appelé aussi fond de la boîte) sont des murs rigides. Le bord du haut (appelé aussi surface) est une surface libre ouverte sur l'air. On peut voir sur ce schéma la grille de discrétisation de l'espace 2D que nous utilisons pour résoudre les équations (3.3) à chaque pas de temps. Les points rouges correspondent aux centres des petits carrés dans lesquels sont définis les grandeurs moyennes (n, c, $\overrightarrow{u}$, ω, ψ). A titre d'exemple un de ces carrés a été tracé en bleu. Ce distingue deux types de points : ceux qui sont à l'intérieur des frontières de la boîte et ceux qui sont à l'extérieur. Ces derniers sont des points virtuels qui sont utilisés pour imposer les conditions aux bords.

Comme pour n on calcule l'évolution de la concentration en oxygène c (détail en annexe).

On définit les bords du système 2D en $x = dx/2$, $x = L_x - dx/2$, $y = dy/2$ et $y = L_y - dy/2$. Les points virtuels en dehors du système ($x = 0$, $x = L_x$, $y = 0$, $y = L_y$) sont utilisés pour assigner les conditions de flux nul de c et de n sur les bords. Par exemple pour n au fond de la boîte, on annule le flux j_{yn} et on pose :

$$n[x,0,t] = n[x,dy,t]\times \left(\frac{D_n-(\frac{u_y[x,dy,t]+u_y[x,0,t]}{4})\times dy-\frac{\alpha}{2}\times(c[x,dy,t]-c[x,0,t])}{D_n+(\frac{u_y[x,dy,t]+u_y[x,0,t]}{4})\times dy+\frac{\alpha}{2}\times(c[x,dy,t]-c[x,0,t])}\right)$$

Les calculs de n et c font maintenant intervenir la vitesse du fluide u. Une fois de plus nous allons utiliser la méthode des différences finies dans un schéma d'Euler explicite pour calculer l'évolution des champs $\overrightarrow{u}$ (vitesse), ω (vorticité) et ψ (fonction courant) [85].

Dans un premier temps la vitesse du fluide est supposée connue. Le calcul de la vorticité se fait en fonction de la vitesse du fluide. Cela permet de générer la vorticité qui est engendrée notamment par la condition de friction sur les bords rigides de la boîte. Pour les points à l'intérieur de la grille on utilise :

$$\omega[x,y,t] = -\frac{u_x[x,y+dy,t]-v_x[x,y-dy,t]}{2dy} + \frac{u_y[x+dx,y,t]-v_y[x-dx,y,t]}{2dx}.$$

Pour les points situés sur la frontière de la boîte (figure 3.4) on utilise une dérivée de la vitesse (aval ou amont en fonction des cas) sauf à la surface du liquide où la vorticité est nulle. De plus, comme la vitesse est identiquement nulle sur les murs le calcul de la vorticité peut être simplifié. Voir en annexe les détails du calcul.

On calcule ensuite l'évolution de la vorticité d'après l'équation de Navier-Stokes. On tient ainsi compte des sources de vorticité due à la répartition hétérogène de bactéries.

$$\begin{aligned}\omega[x,y,t+dt] &= \omega[x,y,t] + dt\left\{-v_x[x,z,t]\frac{\omega[x+dx,y,t]-\omega[x-dx,y,t]}{2dx}\right.\\ &\quad -v_y[x,z,t]\frac{\omega[x,y+dy,t]-\omega[x,y-dy,t]}{2dy}\\ &\quad +\nu\left(\frac{\omega[x+dx,y,t)]+\omega[x-dx,y,t]-2\omega[x,y,t]}{dx^2}\right.\end{aligned}$$

$$+\frac{\omega[x,y+dy,t]+\omega[x,y-dy,t]-2\omega[x,y,t]}{dy^2}\Bigg)$$
$$-V_n g\frac{(\rho_n-\rho)}{\rho}\frac{(n[x+dx,y,t]-n[x-dx,y,t])}{2dx}\Bigg\}$$

Connaissant la valeur de la vorticité ω, nous pouvons calculer la fonction courant ψ. Pour cela nous utilisons la méthode de sur-relaxation successive (*SOR* pour *Successive Over Relaxation* en anglais) avec l'accélération de *Chebyshev* [125]. Nous résolvons ainsi rapidement l'équation de Poisson. Pour plus de détail sur cette méthode voir[125] chapitre 19.5.

$$\triangle\psi = -\omega\,. \tag{3.4}$$

Enfin, la nouvelle vitesse dans les points intérieurs de la boîte est calculée par :

$$v_x[x,y,t] = \frac{\psi[x,y+dy,t]-\psi[x,y-dy,t]}{2dy}$$

$$v_y[x,y,t] = -\frac{\psi[x+dx,y,t]-\psi[x-dx,y,t]}{2dx}$$

Sur les bords rigides (figure 3.4) la vitesse est nulle :

$$\begin{array}{cc} u_x[x=0,y,t]=0 & u_y[x=0,y,t]=0 \\ u_x[x,y=0,t]=0 & u_y[x,y=0,t]=0 \\ u_x[x=L_x,y,t]=0 & u_y[x=L_x,y,t]=0 \end{array}$$

Sur la surface libre la composante normale de la vitesse (u_y) est nulle car le fluide ne fait pas de vague et la composante tangentielle (u_x) ne subit pas de friction :

$$u_x[x,y=L_y,t]=u_x[x,y=L_y-dy,t] \quad u_y[x,y=L_y,t]=0 \quad .$$

3.2.3.2 Algorithme de résolution

Dans la section précédente nous avons présenté en détail la résolution des équations (3.3) avec la méthode des différences finies. En résumé, l'algorithme utilisé pour résoudre le système d'équation pour chaque pas de temps dt est :

1. Calcul de la vorticité par dérivation de la vitesse.

2. Evolution de la vorticité avec l'équation de NS.
3. Calcul de la fonction courant grâce aux valeurs de la vorticité.
4. Calcul du champ des vitesses avec les valeurs de la fonction courant.
5. Evolution de la concentration des bactéries et du dioxygène.

3.2.3.3 Choix des paramètres

Paramètres	symbole	valeurs	unités
coefficient de diffusion des bactéries	D_n	10^{-10}	m.s^{-2}
coefficient d'aérotactisme des bactéries	α	$3,3 \times 10^{-33}$	$m^5.s^{-1}$.molecule^{-1}
taux de division des bactéries	β	10^{-2}	min^{-1}
concentration de saturation	n_c	10^{16}	bactérie.m^{-3}
coefficient de diffusion de l'oxygène	D_{02}	10^{-9}	m.s^{-2}
taux de consommation de l'oxygène	γ	10^6	molecule.bacterie.s^{-1}
constante de Michealis de la consommation d'oxygène	K	10^{20}	molecule.m^{-3}
Densité massique des bactéries	ρ_n	1.08×10^3	kg.m^{-3}
Densité massique de l'eau à 31ºC	ρ	9.95×10^2	kg.m^{-3}
Viscosité de l'eau avec du glycérol [**?**]	ν	$9,0 \times 10^{-7}$	$m^2.s^{-1}$
Volume d'une bactérie	V_n	3×10^{-18}	m^3
Accélération gravitationnelle	g	9.81	m.s^{-2}
pas spatial	dx	10^{-4}	m
pas de temps	dt	10^{-3}	s

TABLE 3.2 – Paramètres du modèle 2D

Ici, nous réutilisons les paramètres physiques que nous avons déjà introduits à la section 3.1. Nous allons simplement discuter des nouveaux paramètres relatifs au fluide.

Dans les expériences, le fluide est principalement constitué d'eau avec 3% de glycérol en volume soit $3,95\%$ en masse à 30ºC. A cette température la densité de l'eau est de $9,94.10^2\,\text{kg}.m^{-3}$ [115]. D'après [94] la viscosité dynamique de l'eau à 30ºC est de $8,007.10^{-4}\,\text{kg}\cdot m^{-1}\cdot s^{-1}$ alors que celle d'une solution de glycérol concentrée à 10% en masse est de $1,03.10^{-3}\,\text{kg}\cdot m^{-1}\cdot s^{-1}$. Par régression linéaire on obtient qu'une solution de glycérol à $3,95\%$ en masse a une viscosité dynamique de $8,9.10^{-4}\,\text{kg}.m^{-1}\cdot s^{-1}$, soit une viscosité cinématique de $9,0 \times 10^{-7}\,m^2\cdot s^{-1}$

La densité des bactéries ($B.subtilis$) donnée dans la bibliographie est d'environ 10% supérieure à celle de l'eau [22]. Selon C. Douarche les mesures

donnent une valeur de $1.03 \times 10^3\,\mathrm{kg}{\cdot}m^{-3}$ que nous utiliserons ici. Pour finir, le volume de la bactérie *B.subtilis* peut être approché par un cylindre de section $1\,\mu$m et de longueur $4\,\mu$m soit un volume de $6,3\,\mu m^3 = 6,3.10^{-18}\,m^3$

Concernant les paramètres numériques, plusieurs critères sont à respecter. Conformément à l'eq. (6.1) la dimension des petits éléments ($dx \times dy$) qui pavent l'espace impose une contrainte sur le pas de temps dt :

$$dt < \frac{dx^2}{4 \times max(D_n, D_{02}, \nu)}$$

pour $dx = 1.10^{-4}\,m$ et $max(D_n, D_{02}, \nu) = \nu = 9.10^{-7}\,m^2 \cdot s^{-1}$ on a que $dt < 3.10^{-3}\,s$. Ici nous utiliserons la valeur de $dt = 10^{-3}\,s$.

L'utilisation de la technique SOR fait intervenir deux paramètres : le paramètre de relaxation et le paramètre de tolérance. Nous avons procédé à une optimisation de la valeur du paramètre de tolérance (voir annexe 6.7). A l'issue de cette optimisation, nous avons choisi une valeur de tolérance de $0,2\%$.

Enfin, d'après [125] le paramètre de relaxation doit être inférieur et aussi proche que possible de la valeur 2. La valeur que l'on doit précisément choisir est une question délicate. Pour notre part, on choisi empiriquement la valeur 1.8. Celle-ci assure que le SOR ne diverge pas, tout en étant assez proche de 2 pour être rapide.

3.2.4 Résultats

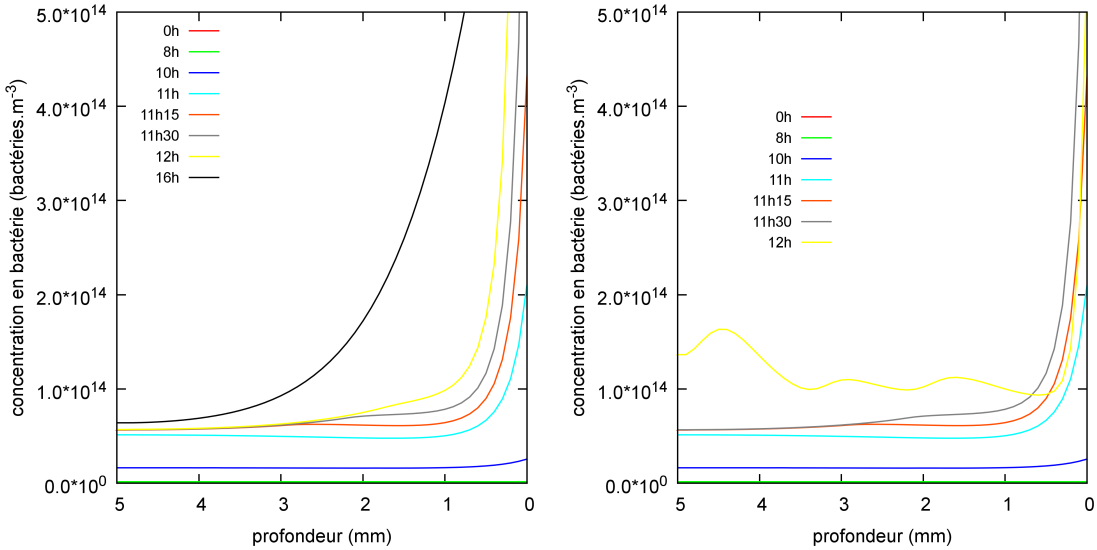
Le modèle décrit l'évolution d'une culture bactérienne en tenant compte du couplage entre le dioxygène du milieu et la concentration en bactéries. Nous avons tenu compte des interactions qui ont lieu entre le fluide et ces deux concentrations.

3.2.4.1 Accumulation des bactéries

La figure 3.5 présente l'évolution de la concentration en bactéries au cours du temps. Chaque point correspond à la moyenne de la concentration sur une ligne horizontale de la tranche 2D simulée. On visualise donc un profil de concentration comparable à celui mesuré dans les expériences et dans les simulations 1D. La figure 3.5a montre l'évolution de la concentration dans le cas où on impose à la vitesse du fluide de rester nulle. Il n'y a donc pas de convection, comme dans le cas 1D (figure 3.2). Les bactéries se divisent et

colonisent peu à peu le système. La concentration augmente de manière homogène dans le milieu. Au bout de 8h, une accumulation se forme à l'interface eau-air (profondeur 0mm).

La figure 3.5b montre l'évolution de la concentration en bactéries le long d'un profil 1D en tenant compte des mouvement du fluide. Comme dans le cas sans convection, la concentration en bactéries augmente de manière homogène dans un premier temps, puis forme une accumulation. Cependant, sur la courbe de 12h on voit clairement que quelque chose se passe dans le milieu. Des fluctuations de la concentration en bactéries apparaissent en plein milieu de la boîte. La concentration augmente dans la partie inférieure de la boîte, à l'inverse de la concentration dans l'accumulation qui diminue.



(a) (b)

FIGURE 3.5 – Profile 1D issu de la simulation 2D. Comparaison entre une simulation avec (3.5b) et sans convection du fluide (3.5a). Les deux simulations démarrent avec une concentration moyenne de 10^8 bactéries.m^{-3} avec des variations spatiales de l'ordre de 1%. Les dimensions de la tranche sont de $L_x = 1\,\text{cm}$ en largeur et $L_y = 0,5\,\text{cm}$ en profondeur.

3.2.4.2 Advection du fluide

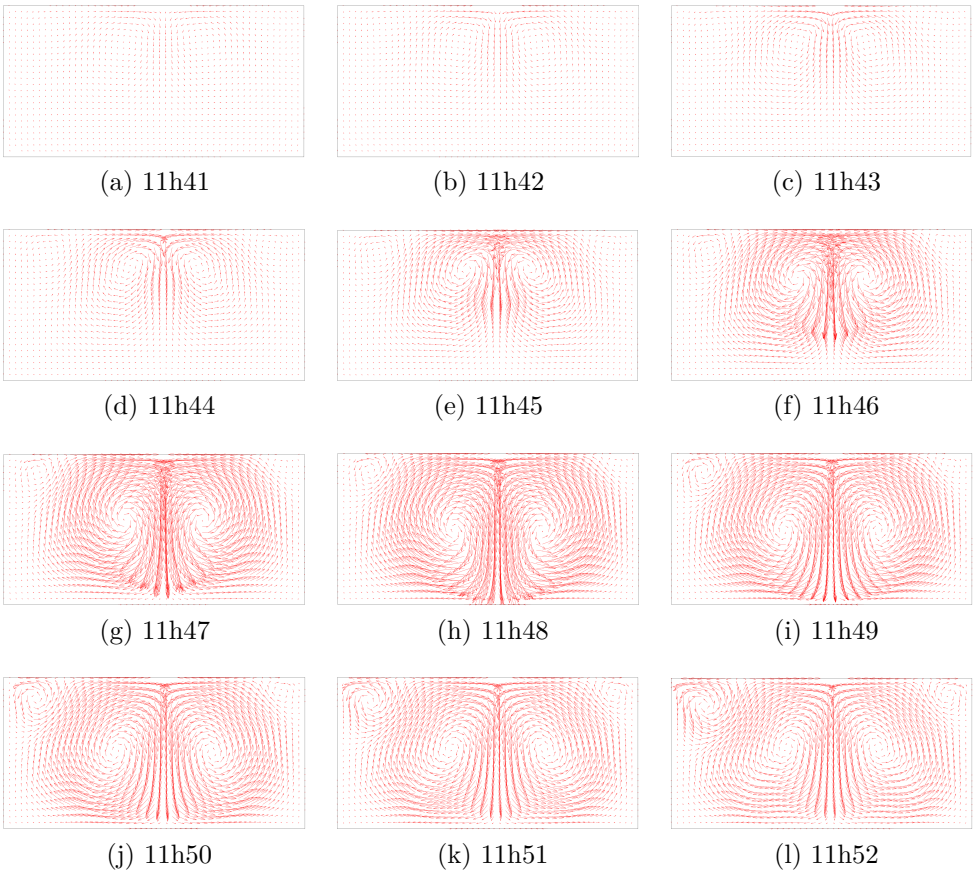


FIGURE 3.6 – Evolution d'un système avec concentration initiale de 10^8 bacteries$\cdot m^{-3}$. Les bactéries ont un temps de division de 50 min. La largeur de la boîte est $L_x = 1$ cm et sa profondeur $L_y = 0,5$cm. Chaque vecteur représente le vecteur de la vitesse moyenne dans un petit élément de dimension $dx \times dy$. L'interface eau-air se trouve en haut. On voit à 11h40 figure 3.6a que le fluide est en mouvement sous la surface, et des rouleaux de convection se forment.

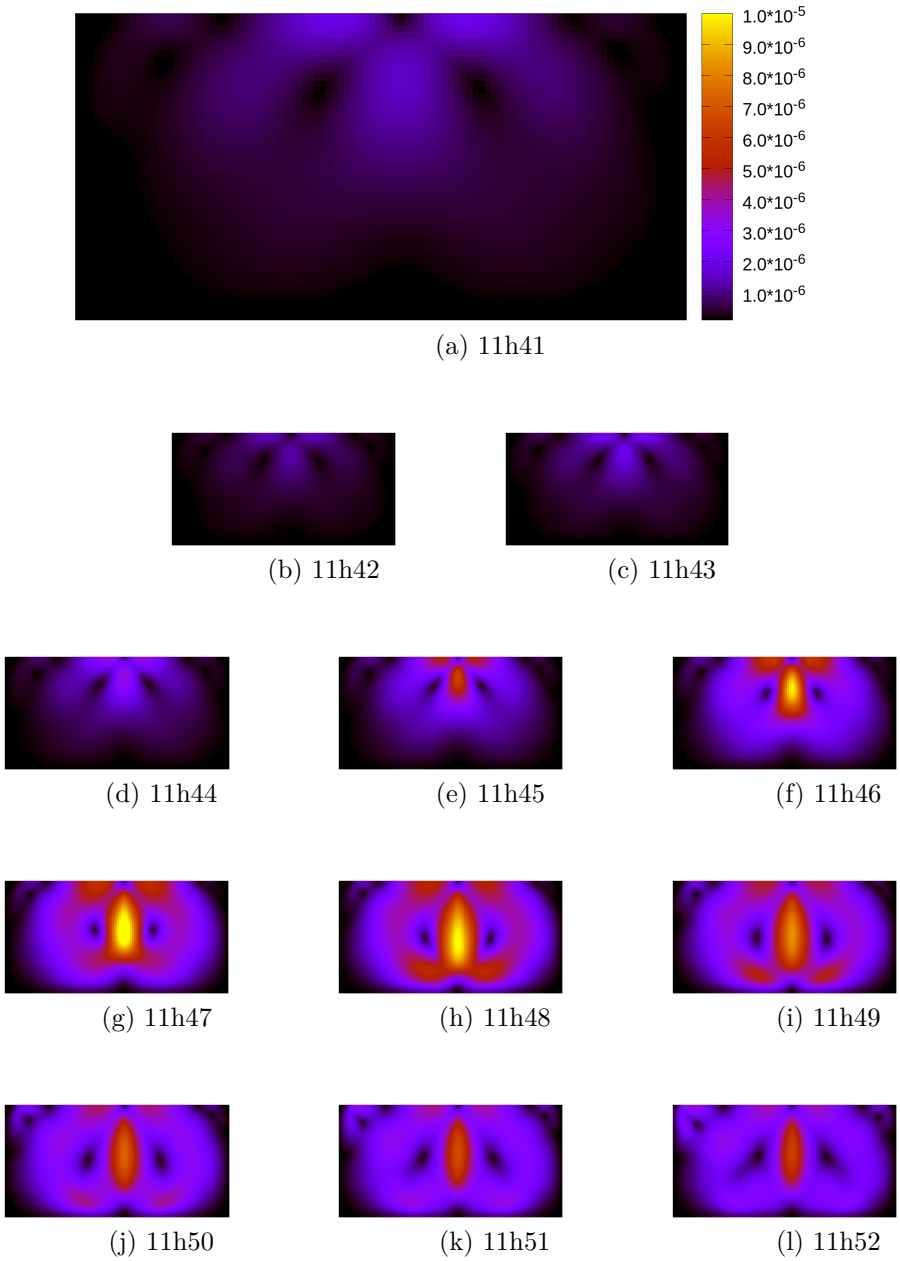


FIGURE 3.7 – Evolution d'un système de concentration initiale avec 10^8 bacteries$\cdot m^{-3}$. Le temps de division des des bactéries et de 50 min. La largeur de la boîte est de $L_x = 1$ cm et sa profondeur de $L_y = 0,5$cm. On visualise la norme de la vitesse du fluide en échelle de couleur. L'interface eau-air se trouve en haut. A 11h40 figure 3.7a la vitesse du fluide augmente drastiquement sous la surface. A 11h47 elle atteint une valeur de l'ordre de $20\,\mu$m$\cdot s^{-1}$.

La figure 3.6 présente le champ de vitesse du fluide. A partir de 11h40 (figure 3.6a) une instabilité hydrodynamique se développe au niveau de l'interface eau-air (haut). Des rouleaux de convection apparaissent à la surface du fluide et se propagent vers le fond de la boîte. La figure 3.7 montre que la vitesse dans un rouleau est de l'ordre d'une dizaine de micromètres par seconde, ce qui n'est pas négligeable comparé à la vitesse de migration des bactéries estimé section 3.1 à $20\,\mu\mathrm{m}\cdot s^{-1}$. La répartition des bactéries comme sur la figure 3.5a est instable hydrodynamiquement. Une couche dense en bactéries est plus lourde que de l'eau. Donc, la couche d'accumulation à la surface subissant l'effet de la gravité tombe au fond de la boîte. C'est le mécanisme bien connu de l'instabilité de Rayleigh Taylor qui apparait à l'interface entre un fluide dense placé au dessus d'un fluide moins dense.

3.2.4.3 Transport des bactéries

La figure 3.8 montre la distribution de la concentration en bactéries dans la boîte. Celle-ci est transportée par le fluide. Des larmes de fluide concentrées en bactéries (jusqu'à 4.10^{14} bactéries$\cdot\mathrm{m}^{-3}$) apparaissent à l'interface eau-air et coulent dans le fond de la boîte. Cela à pour effet de diminuer la concentration à la surface comme sur la figure 3.5a. Ce mécanisme, qui contrebalance la migration des bactéries en direction de la surface, peut avoir des conséquences importantes pour la formation d'un biofilm.

Le phénomène de bioconvection que l'on observe ici correspond à celui des expériences de Czirok et al et Janosi et al [51, 28]. Leur système d'étude est une boîte de 8 mm de largeur par 4 mm de hauteur et $1,2$ mm de profondeur contenant une culture de BS concentrée à 6.10^{14} bacteries$\cdot\mathrm{m}^{-3}$. Ils observent également la formation de larmes d'un millimètre de large qui tombent sur une distance de quelques millimètres. Ici, le même phénomène est le même dans une tranche de profondeur de 5 mm. Une larme parcourt environ 5 mm en 13 min, ce qui donne une vitesse de chute de l'ordre de $6\,\mu\mathrm{m}\cdot s^{-1}$.

La figure 3.8 est une séquence choisie au moment (11h41) où la première larme se forme dans le système. A partir de là, la bioconvection n'a de cesse d'exister et de transporter les bactéries vers le fond de la boîte. La figure 3.9 montre une séquence au temps de 15h : les larmes sont devenues plus fines avec le temps et apparaissent à n'importe quel endroit de la surface.

Dans les cas où on utilise une boîte plus profonde, les larmes ne tombent pas plus profondement que 5 mm sous de la surface. Au fur et à mesure de leur descente elles se dissipent dans le milieu.

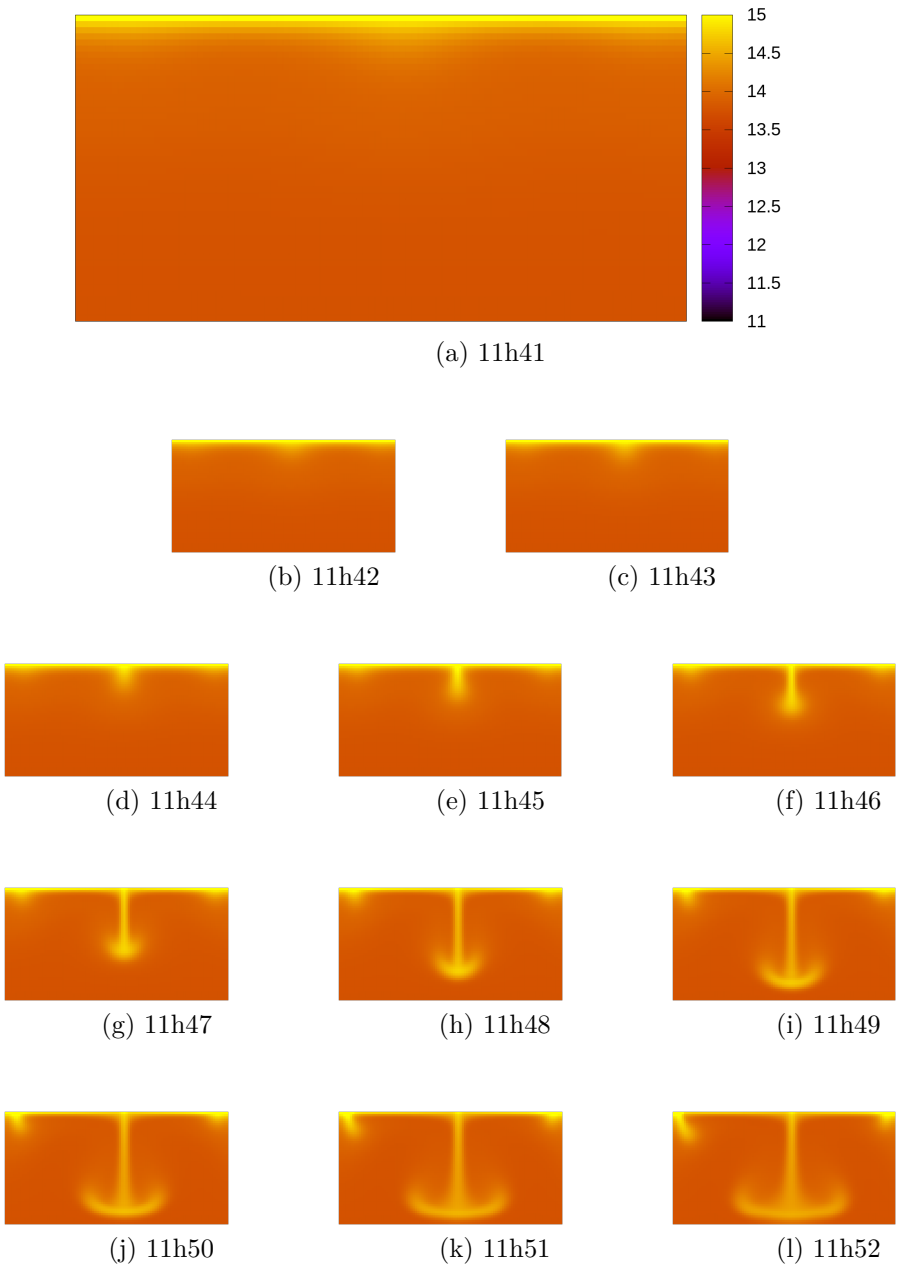


FIGURE 3.8 – Evolution d'un système avec une concentration initiale de 10^8 bacteries$\cdot m^{-3}$ qui se multiplie avec un temps de division de 50 min. La largeur de la boîte fait $L_x = 1$ cm et sa hauteur $L_y = 0,5$ cm. La concentration en bactéries est visualisée avec une échelle de couleur logarithmique. Dans un premier temps les bactéries migrent vers la surface. Puis, dans un second, la bioconvection s'active et fait couler des "larmes" concentrées en bactéries vers le fond de la boîte.

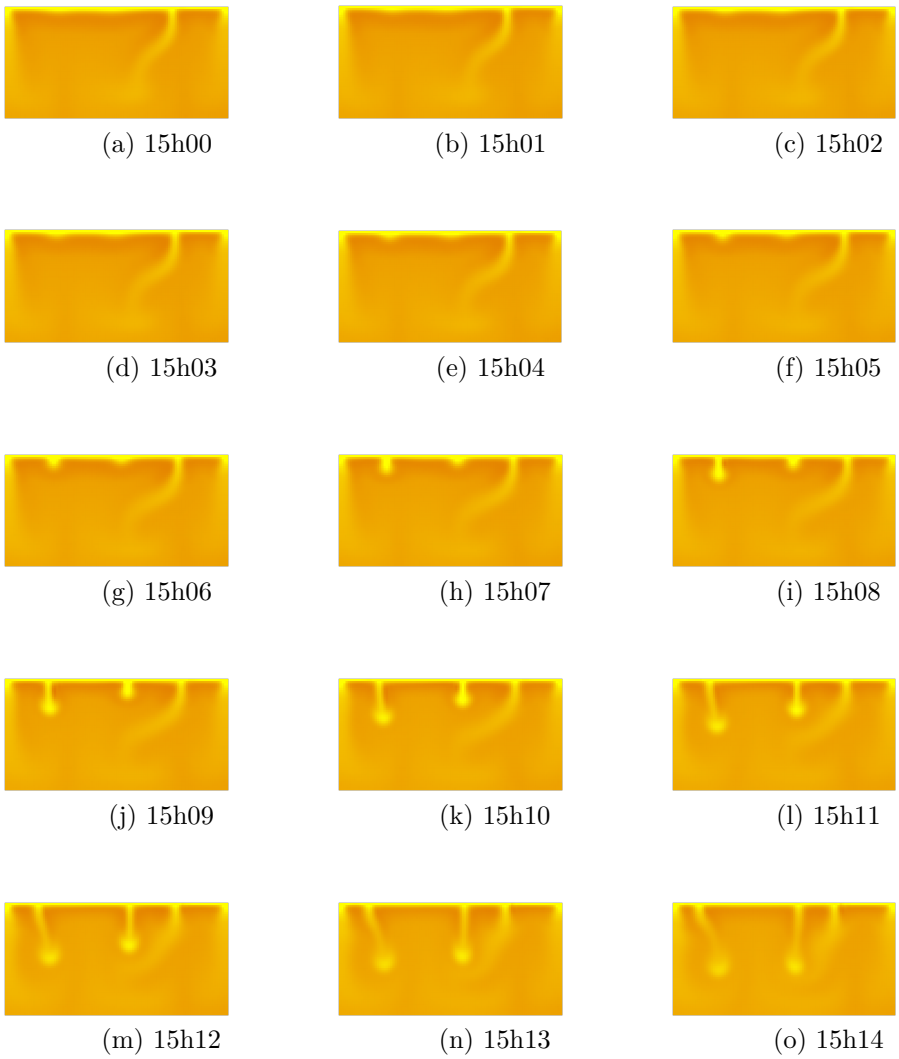


FIGURE 3.9 – Bioconvection à 15h. Les larmes sont plus fines. Elles se détachent à tous les endroits de la surface

La concentration en bactéries est donc mélangée par le fluide. Qu'observe t-on quant à la concentration en dioxygène ?

3.2.4.4 Transport du dioxygène

En plus de la concentration en bactéries, on peut suivre l'évolution de la concentration en dioxygène. Cette donnée n'est pas accessible expérimentalement, c'est donc un avantage de la simulation.

La concentration en dioxygène dissout dans le milieu commence à décroitre significativement à partir de 11h06. A cette instant, la concentration moyenne est de 5.10^{13} bactéries$\cdot$m^{-3}. Un gradient de dioxygène apparaît en direction de la surface sur une longueur de pénétration d'environ 2 mm. Le gradient maximal observé va de $1,5.10^{23}$ molecules$\cdot$m^{-3} à 0 molecules$\cdot$m^{-3} sur une longueur de l'ordre du millimètre, il a donc une valeur de 10^{26} molecules$\cdot$m^{-4}.

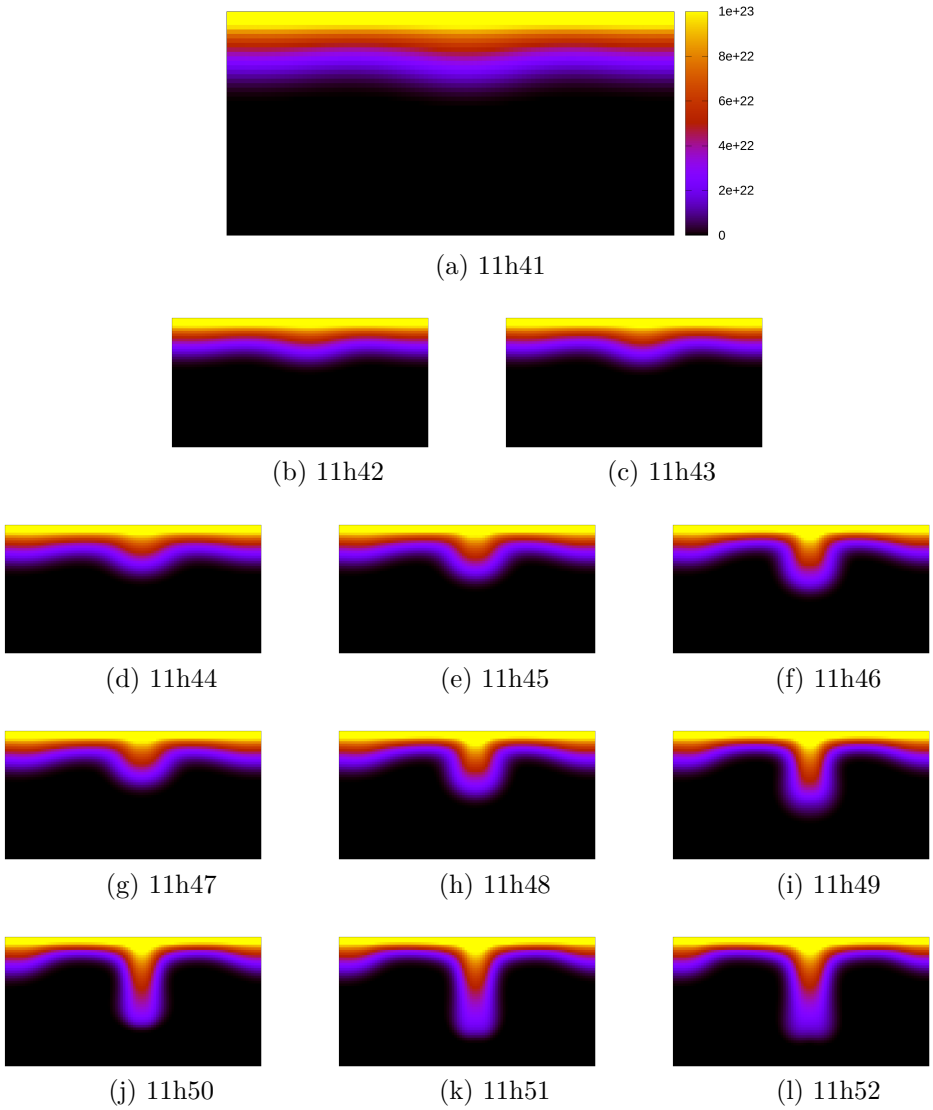
Quand la bioconvection apparait (vers 11h40), du dioxygène provenant de la surface est entrainé vers le fond de la boîte. Par conséquent, la profondeur du milieu (à plus de 2 mm de la surface) sont approvisionnées en dioxygène. Cependant, la consommation des bactéries fait rechuter la concentration de dioxygène dans le milieu à zéro après quelques dizaines de minutes.

Plus le temps passe, plus les larmes de dioxygène parviennent de moins en moins à descendre profondément dans le milieu. On peut le voir figure 3.11 où le dioxygène reste confiné dans une épaisseur d'environ 1 mm. On observe la formation d'un début de larme, mais celle-ci ne tombe pas au fond car les bactéries consomment rapidement le dioxygène.

Pour conclure, malgré la bioconvection, il semble que la concentration de dioxygène soit constamment nulle dans les profondeurs du milieu de culture. La convection n'est pas assez intense pour contre balancer la consommation des bactéries.

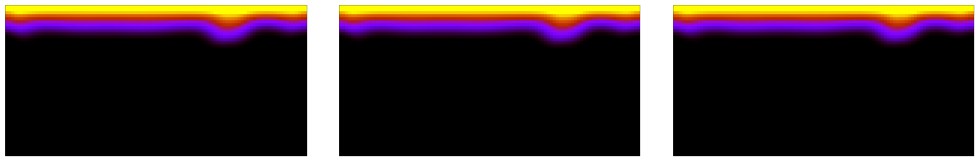
3.2.4.5 Bifurcation

Afin de mieux comprendre l'apparition de la bioconvection, nous avons réalisé des simulations à concentration moyenne en bactéries constante (nombre fixe de bactéries dans le système). En effet, dans toutes les expériences qui étudient ce phénomène, la concentration en bactéries est élevée [51]. Mais, y a t-il une concentration moyenne minimale à partir de laquelle la bioconvection apparait ?



(a) 11h41 (b) 11h42 (c) 11h43 (d) 11h44 (e) 11h45 (f) 11h46 (g) 11h47 (h) 11h48 (i) 11h49 (j) 11h50 (k) 11h51 (l) 11h52

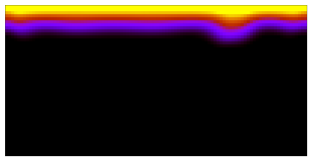
FIGURE 3.10 – Evolution d'un système avec une concentration initiale de 10^{14} bacteries$\cdot m^{-3}$, la largeur de la boîte fait $L_x = 1\,\text{cm}$ et sa hauteur $L_y = 0,5\,\text{cm}$. On trace la concentration en dioxygène selon une échelle de couleur qui va de 0 à $1,5.10^{23}$ molecules$\cdot m^{-3}$. Chaque figure montre la répartition de cette concentration à un pas de temps donnée.



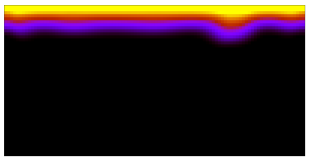
(a) 15h00

(b) 15h01

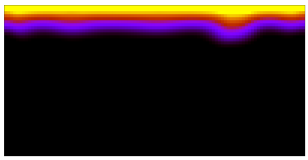
(c) 15h02



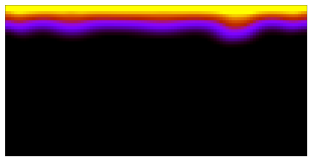
(d) 15h03



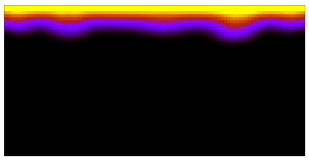
(e) 15h04



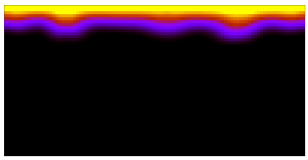
(f) 15h05



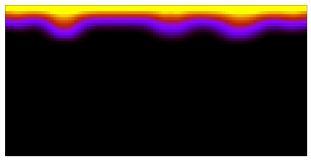
(g) 15h06



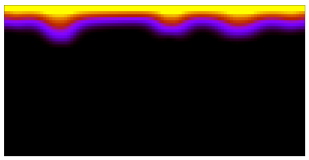
(h) 15h07



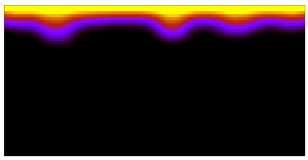
(i) 15h08



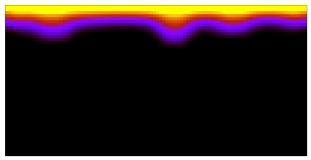
(j) 15h09



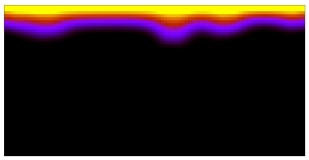
(k) 15h10



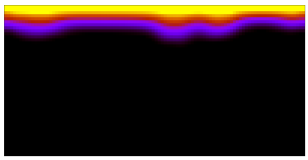
(l) 15h11



(m) 15h12



(n) 15h13



(o) 15h14

FIGURE 3.11 – Bioconvection du dioxygène après 15h de simulation. Les larmes de dioxygène descendent moins profondément.

Pour cela on utilise le modèle précédent sans la division des bactéries. La quantité totale de bactéries reste donc constante au cours de la simulation.

Si on étudie la valeur de la vitesse maximale instantanée du champs de vitesse en fonction de la concentration initiale en bactéries, on constate qu'il y a trois régimes de bioconvection. Dans la figure 3.12, on voit que la vitesse maximale évolue au temps long de trois manières différentes :

— Elle décroit vers zéro.
— Elle augmente brusquement et décroit ensuite vers un palier (de l'ordre de $1\,\mu\text{m}\cdot s^{-1}$).
— Elle augmente brusquement, décroit ensuite vers un palier (de l'ordre de $1\,\mu\text{m}\cdot s^{-1}$) et présente des soubresauts erratiques par rapport à ce palier.

On distingue trois régimes. Dans le premier, le fluide est au repos. C'est à dire qu'il n'y a pas de bioconvection. Dans le second, le fluide est en mouvement mais sa vitesse maximale ne varie pas. C'est régime laminaire où le système exhibe des rouleaux de convection stables. Le troisième, le fluide est turbulent, c'est à dire que de nouveaux rouleaux de convection apparaissent et disparaissent de manière chaotique dans le système.

On mesure la vitesse maximale moyenne au temps longs, après le premier pic (quand il y a en un) que l'on voit sur les figures de la figure 3.12. On trace ensuite la figure 3.13. On voit que la bioconvection n'apparait qu'à partir d'une certaine valeur de la concentration initiale. Il y a donc une bifurcation, au sens physique du terme, dans l'évolution du champ de vitesse du fluide. Le paramètre de contrôle mis en évidence ici est la concentration initiale en bactéries (ou autrement dit la concentration moyenne au cours de la simulation). Chaque point de la figure 3.13 représente la vitesse maximale observée au temps long de la vitesse du fluide. A partir de 2.10^{12} bactéries$\cdot m^{-3}$ on observe que la vitesse du fluide devient non nulle et non négligeable par rapport à la vitesse de migration ($1\,\mu\text{m}\cdot s^{-1}$).

En conclusion ces résultats sont cohérents avec la théorie de l'instabilité de Rayleigh-Benard qui a été étudié par Hillesdon dans le cas de l'aérotactisme de BS. En effet, plus la concentration en bactéries dans le système est élevée, plus il y a de rouleaux de convection dans le système. Mathématiquement, on excite des modes de convection du fluide avec une longueur d'onde selon l'axe (Ox) de plus en plus petite à mesure qu'on augmente la

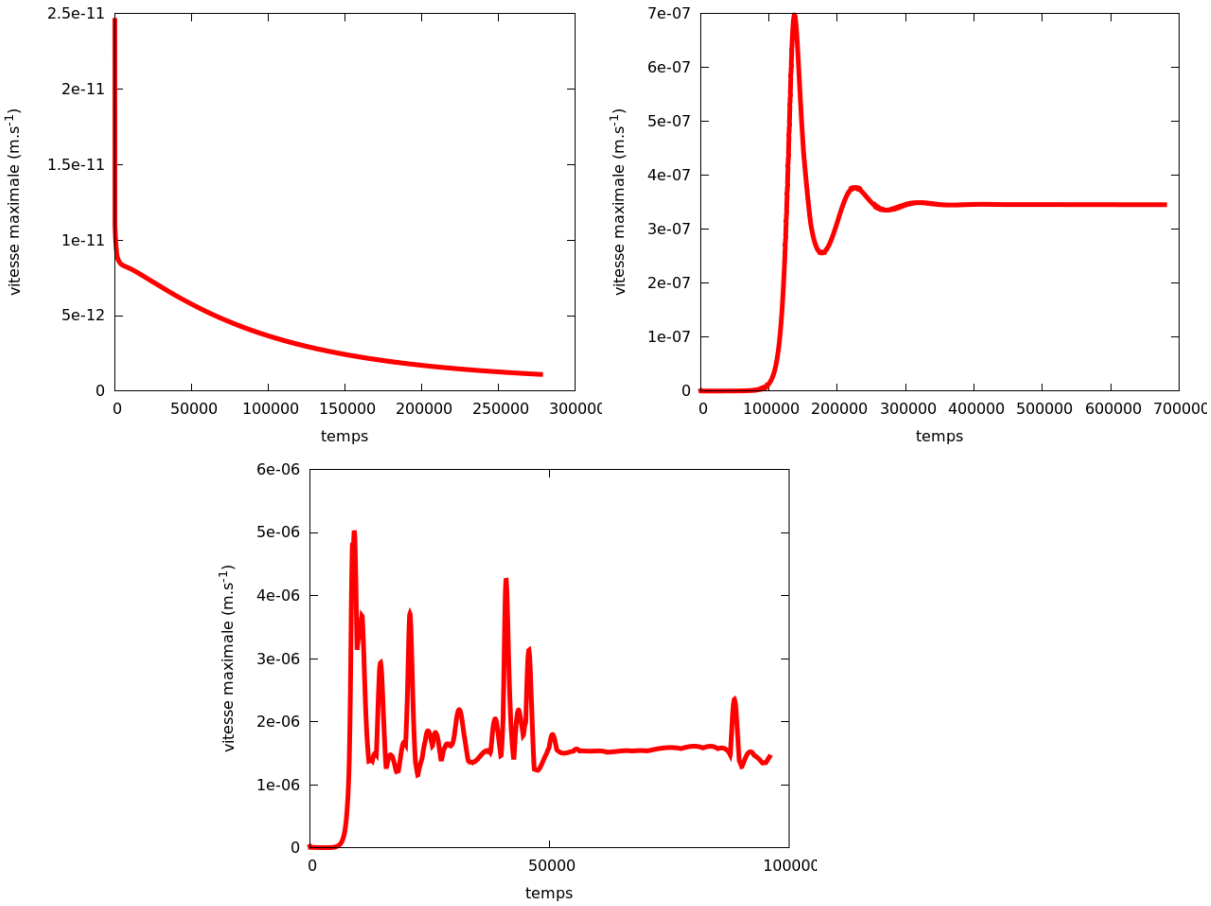


FIGURE 3.12 – Les trois régimes de bioconvection : évolution de la vitesse maximale du fluide en fonction du temps. Pour les concentrations environ inférieures à 10^{12} bactéries$\cdot m^{-3}$ la vitesse initialement nulle à 10^{-11} m.s^{-1} continue de décroitre. On distingue donc un régime où la vitesse du fluide est nulle. Pour les concentrations environ supérieures à 10^{12} bactéries$\cdot m^{-3}$ la vitesse initialement nulle à 10^{-11} m$\cdot s^{-1}$ devient non nulle. Elle augmente brusquement et reste constante par la suite. C'est cette vitesse maximale au temps long (après les oscillations) que l'on représente dans le figure 3.13. Passé la concentration d'environ 5.10^{13} bactéries$\cdot m^{-3}$ la vitesse maximale au temps long devient erratique. Cela correspond à un régime turbulent où de nombreuses larmes concentrées en bactéries se forment.

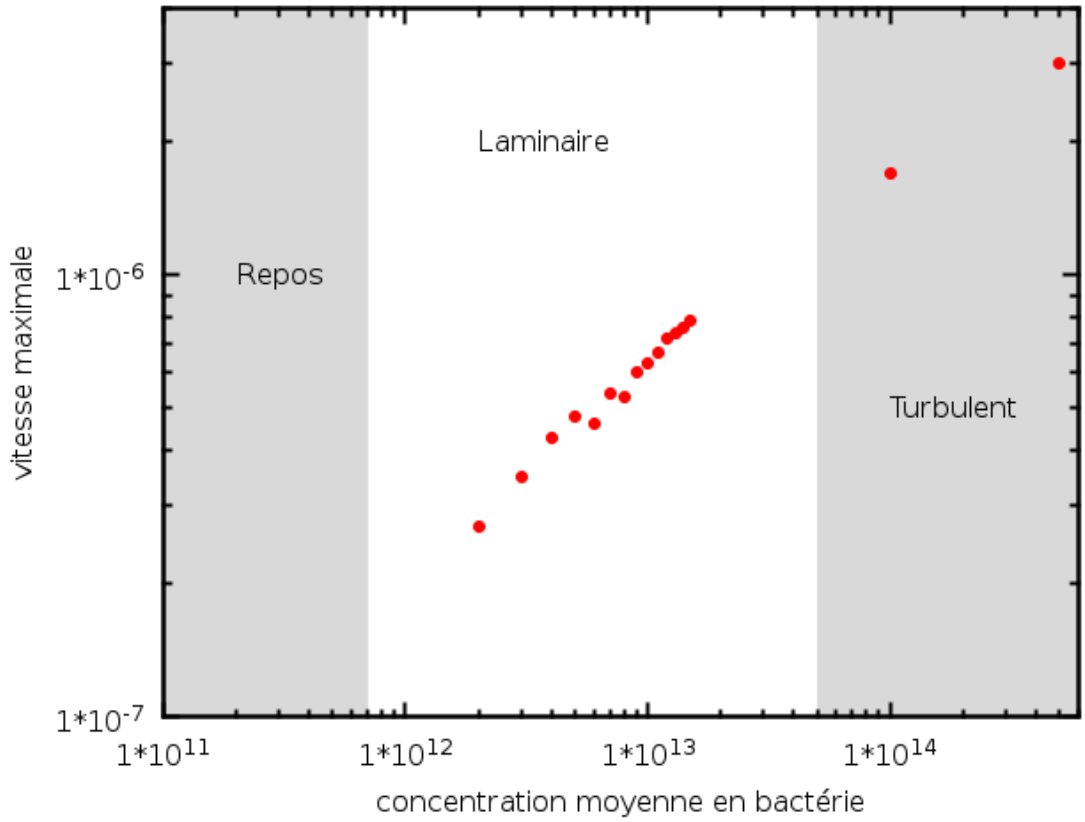


FIGURE 3.13 – Diagramme de bifurcation . La vitesse du fluide devient non nulle pour une concentration de bactérie d'environ 2.10^{12} bactéries$\cdot m^{-3}$. On trace de manière approximative les trois zones où le régime de bioconvection sont différents. Passé une concentration de 5.10^{13} bactéries$\cdot m^{-3}$, la bioconvection devient turbulente.

concentration. Autrement dit, la composante de la vitesse verticale le long d'une ligne parallèle à (Ox) change plus fréquemment de signe.

En faisant varier la quantité de bactéries, nous faisons varier le paramètre Γ de [46] qui est relatif à la bioconvection dans l'équation de NS. Plus ce paramètre est grand, plus les modes excités sont élevés (petits rouleaux). N.A Hill a montré que de la turbulence apparaissait dans des systèmes analogues à celui de Hillesdon ou au notre. Cependant, il s'est essentiellement intéressé à l'influence de la profondeur du système.

Ici, nous avons montré que la concentration en bactéries contrôle l'apparition de la bioconvection. Et on comprend mieux pourquoi les expériences de bioconvection sont toujours avec des concentrations en bactéries élevées puisque, par construction, elles depassent le seuil d'enclenchement de la bioconvection.

3.3 Conclusions et perspectives

Nous avons développé un modèle simple à 1D qui prend en compte les interactions entres le dioxygène et les bactéries. Celui-ci nous a permis de reproduire la migration des bactéries vers la surface de l'eau. Le mécanisme d'accumulation que nous avons vérifié est le suivant : les bactéries consomment le dioxygène dans le volume du milieu de culture ; comme l'interface eau-air approvisionne le milieu de culture on voit apparaitre un gradient de concentration de dioxygène en direction de la surface ; les bactéries sont sensibles à ce gradient, le suivent pour aller dans les zones plus concentrée en ce nutriment ; elles se dirigent donc vers la surface et s'y accumulent.

On a vu que le modèle proposé faisait intervenir deux paramètres encore inconnus : la constante de Michaelis de la consommation de dioxygène et le coefficient d'aérotactisme α. L'étude 1D a permis d'étudier l'influence de ce dernier paramètre et a montré qu'il a un effet direct sur l'épaisseur de la couche d'accumulation ainsi que sa rapidité de formation.

Nous avons ensuite développé une approche à deux dimensions pour étudier l'effet du fluide sur la migration des bactéries. Grâce à ce modèle, nous sommes arrivés à reproduire le phénomène de bioconvection que l'on voit apparaitre dans les suspensions concentrées de *B. subtilis*. Au bout d'un certain temps (environ 11h) la bioconvection s'enclenche à cause de la stratification instable du fluide plus concentré en bactéries au niveau de la surface. Cela a pour effet d'homogénéiser la concentration en bactéries et de casser la couche

d'accumulation à la surface. De plus, la bioconvection permet d'approvisionner de temps à autre les couches inférieures du fluide en dioxygène sur une courte longueur (inférieure au millimètre).

Nous avons vu que la bioconvection apparait pour une valeur seuil de la concentration moyenne des bactéries dans la boîte. Cette observation est en accord avec le fait qu'il faille attendre un certain temps pour que la convection s'enclenche et s'amplifier lorsqu'on tient compte de la division des bactéries dans un système initialement faiblement concentré en bactéries. Il faut alors attendre que les bactéries se divisent suffisamment pour atteindre le seuil d'instabilité.

Les modèles d'équations continues aux dérivées partielles que nous avons utilisés permettent de reproduire certains phénomènes collectifs observés dans les expériences. Cependant, cette approche n'est valable que dans le cas où les bactéries restent dans un même état biologique, ici la phase planctonique. Pour décrire la formation d'un biofilm, il faut être capable de décrire la transition entre des bactéries en phase planctonique (semblable à un gaz) vers une phase où elles sont liées les unes aux autres (un solide). La modélisation de ce phénomène par des équations continues pose de nombreuses difficultés notamment pour définir l'interface solide-gaz.

Afin de parvenir à reproduire la formation d'un biofilm une nouvelle approche a donc été développée pour passer outres ces difficultés. En restant dans le cadre du modèle continu pour le dioxygène et le fluide, nous utilisons une description alternative pour les bactéries.

Chapitre 4

Modèle hybride continu-discret

4.1 Originalité du travail

Nous avons conçu un nouveau modèle pour décrire la transition entre des bactéries solitaires dans un milieu de culture (comme les particules d'un gaz) vers des bactéries connectées entre elles (comme les atomes d'un solide). Il s'appuie en partie sur le modèle continu que nous avons exposé précédemment. Son originalité réside en une nouvelle approche pour la description des bactéries. En effet, pour reproduire aisément cette transition, nous avons choisi de modéliser chacune des bactéries par une particule individuelle.

Ce type de modèle s'inscrit dans la lignée de ceux développés par J. Xavier et al [121]. Cependant un tel modèle n'a pas encore été développé (ou appliqué) pour décrire la formation des biofilms à la surface d'un milieu liquide, à notre connaissance. De plus, les modèles développés jusqu'à présent ne tiennent pas compte de la toute première étape de la formation d'un biofilm : la migration des bactéries vers la surface.

Comme expliqué dans l'introduction, l'ensemble de ces modèles se placent à l'échelle de la couche de biofilm (la centaine de micromètre) et le considèrent immergé dans un réservoir de nutriments infinie. Ici, au contraire, nous tenons compte de la taille finie du système dans lequel se développe le biofilm. Nous modélisons le système de la flasque qui contient les bactéries c'est à dire à une échelle de quelques centimètres.

Le but est de comprendre pourquoi le biofilm de BS se forme à l'interface eau-air, et quelles sont les règles nécessaires et suffisantes pour reproduire sa formation.

4.2 Hypothèses sur la formation d'un biofilm et mise en œuvre

Cette partie présente notre théorie de la formation d'un biofilm, c'est à dire l'ensemble des lois et des règles supposées expliquer sa formation. La plupart de ces règles concernent le comportement des bactéries en réponse à leur environnement. Pour cela, nous allons nous appuyer sur ce qu'on connait des deux organismes modèles *Bacillus subtilis* et *Escherichia Coli*. Nous commencerons par définir le système d'étude, puis nous verrons dans les détails comment nous le modélisons et simulons numériquement son évolution.

4.2.1 Définition du système

Le système que nous considerons est une boîte, semblable à celle de nos expériences, remplie d'un fluide jusqu'à mi hauteur. Comme dans le chapitre précédent, nous modélisons l'environnement des bactéries par deux champs : la concentration en dioxygène et la vitesse du fluide. Les autres nutriments qui peuvent exister dans le système réel ne sont pas pris en compte car nous avons constaté dans les expériences (section 2.3.5.2) qu'ils ne sont pas un facteur limitant. On suppose donc qu'ils jouent un rôle de second ordre dans le système.

La réelle nouveauté réside dans la description des bactéries sous forme de particules individuelles. Chaque particule mime le comportement d'une bactérie (BS). Elle possède donc les caractéristiques de BS que nous supposons être essentielles pour la formation d'un biofilm.

Bien que *Bacillus subtilis* ait la forme d'un bâtonnet, nous faisons l'hypothèse simplificatrice que les particules représentants les bactéries sont des sphères. Nous prennons pour rayon typique de cette sphère $r_0 = 5.10^{-6}$ m. En effet, calculer les contacts entre des particules non sphériques est nettement plus difficile et aurait un coût considérable en temps de simulations. Afin de décrire l'agrégation des bactéries à une échelle macroscopique (centimètre) cette hypothèse semble raisonnable. Pour une description plus fine de la structure interne du biofilm, il faudrait certainement la revoir.

Comme dans le chapitre précédent, nous décrivons le système comme une tranche verticale de la boîte utilisée dans les expériences. Nous modélisons donc un espace à deux dimensions (2D) caractérisé par une hauteur $L_y = 1$ cm et une largeur $L_x = 1$ cm. L'épaisseur de la tranche considérée est de $dz =$

10^{-5} m. Ainsi, nous réutilisons le modèle et le code développé dans le chapitre précédent qui décrit correctement l'évolution du fluide et du dioxygène dans la flasque. Cette simplification permet aussi de traiter beaucoup moins de particules, et donc de faire des simulations plus rapides.

La simplification du système est une bonne étape pour commencer l'étude de la transition qui nous intéresse. C'est à dire celle de bactéries nomades à bactéries sédentaires. Elle n'enlève rien au phénomène de transition. Bien sûr, pour une description plus détaillée de la morphologie du biofilm, il faudrait passer à un modèle à trois dimensions.

4.2.2 Modélisation de l'environnement

4.2.2.1 Evolution du fluide et du dioxygène

Nous décrivons l'environnement comme dans le chapitre précédent. Son évolution est modélisée par des équations aux dérivées partielles qui dépendent de la concentration en bactéries.

Nous avions alors écrit l'équation d'évolution du fluide dans l'approximation de Boussineq :

$$\frac{\partial \omega}{\partial t} + \left(u.\overrightarrow{\nabla}\right)\omega = \nu \triangle \omega - \frac{\rho_n - \rho}{\rho} V_n \frac{\partial n}{\partial x} g \tag{4.1}$$

$$\triangle \psi = -\omega \,, \tag{4.2}$$

$$u_x = \frac{\partial \psi}{\partial y} \,,\; u_y = -\frac{\partial \psi}{\partial x} \,, \tag{4.3}$$

avec des conditions aux bords pour les murs impénétrabilité et adhérence du fluide, et impénétrabilité et absence de frottement à la surface libre.

L'équation sur le dioxygène était :

$$\frac{\partial c}{\partial t} + u.\overrightarrow{\nabla} c = D_{O_2} \Delta c - \gamma n \frac{c}{c+K} \,, \tag{4.4}$$

avec une condition d'impénétrabilité sur les murs et une source constante de dioxygène sur la surface libre.

Or, dans ce nouveau modèle les bactéries ne sont pas définies par un champ de concentration $n$comme celui que l'on voit apparaitre dans les équations.

4.2.2.2 Lien entre description discrète et continue des bactéries

Pour passer de la description discrète des bactéries à une description continue on calcule le champ de concentration en bactéries n à partir de la position des bactéries individuelles.

Pour résoudre les équations d'évolution du dioxygène et de la vitesse on utilise la même méthode qu'au chapitre précédent. Cette méthode donne leur valeur sur les points d'une grille qui maille l'espace total de dimension $L_x \times L_y \times dz$. La figure 4.1 est un schéma de la boîte et de son maillage. Le trait pointillé à mi hauteur correspond à l'interface eau-air et les points carrés représentent les particules qui modélisent les bactéries.

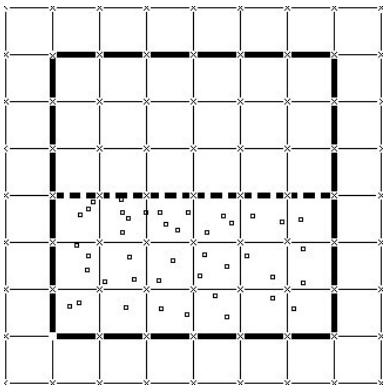


FIGURE 4.1 – Maillage de la couche 2D. On voit les frontières solides de la boîte en traits pointillés longs, l'interface eau-air à mi hauteur en pointillés courts. Les bactéries sont des particules individuelles représentées par des carrés vides.

Chaque point de la grille est centré sur un volume de dimension $dx \times dy \times dz$. Ce volume définit le voisinage du point. La figure 4.2 montre un schéma de la définition du voisinage d'un point dans le corps du maillage et dans un coin. Nous voyons que la surface 2D (et donc le volume) que les points couvrent n'est pas la même en fonction de leur position. Si les points sont dans un coin du maillage le volume « couvert » par le point vaut un quart du volume « couvert » par un point du corps. De la même façon, un point du bord couvre la moitié de son équivalent dans le corps.

Pour calculer la valeur de la concentration en bactéries n associée à un point de la grille, nous comptons simplement le nombre de particules individuelles qui se trouvent dans le voisinage du point et nous divisons ce nombre

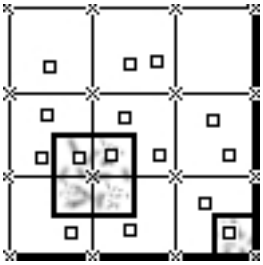


FIGURE 4.2 – Schéma du voisinage d'un point. Les points du maillage sont représentés par des croix et les particules individuelles par des petits carrés. Le voisinage de deux de ces points est représenté par des traits continus gras. Le voisinage d'un point dans le coin du maillage correspond à un quart du voisinage d'un point dans le corps du maillage.

par le volume $dx \times dy \times dz$.

Des questions d'ordre statistique se posent lorsqu'on calcul une concentration à partir du comptage d'un nombre de particules individuelles. Comme dans le chapitre précédent pour le fluide, la concentration de bactéries joue un rôle uniquement lorsqu'elle a une valeur élevée (5.10^{12} bactéries.m^{-3}). A ce stade, dans nos simulations, il y a environ 5000 particules dans la moitié inférieure de la boîte. Pour un maillage typique de $N_x = N_y = 20$ cela fait en moyenne 25 particules dans le voisinage de chaque point. Les fluctuations statistiques dans le calcul d'une concentration sont alors de l'ordre de $\frac{1}{\sqrt{25}} = 20\%$, ce qui donne des résultats satisfaisants pour le *quorum sensing* et la vitesse du fluide.

Enfin, nous faisons une interpolation linéaire entre les trois points de la grille qui sont les plus proches de la bactérie pour calculer la valeur des champs de concentration en bactéries n, ou de dioxygène c, ou la vitesse du fluide, à la position d'une bactérie individuelle.

Une méthode d'interpolation classique est utilisée. Par exemple, pour avoir la vitesse du fluide à la position de la particule, on trouve le point le plus proche de la particule, indicé (k,l), en faisant un arrondi sur les coordonnées de la particule x et y divisée respectivement par le pas d'espace dx, dy.

$$k = round(x/dx)$$

$$l = round(y/dy)$$

Puis selon la position de la particule par rapport à ce point on trouve les

deux autres points les plus proches (

$$(k \pm 1, l) = (k', l)$$

et

$$(k, l \pm 1) = (k, l')\,.$$

On calcule ensuite la vitesse du fluide comme ceci :

$$\overrightarrow{u}(x,y) = \overrightarrow{u}_{kl}\left(\frac{x}{k-k'} + \frac{y}{l-l'} - \frac{k'l' - kl}{(k-k')(l-l')}\right) + \left(\frac{x-k}{k'-k}\right)\overrightarrow{u}_{k'l} + \left(\frac{y-l}{l'-l}\right)\overrightarrow{u}_{kl'}\,.$$

4.2.3 Modélisation et simulation des caractéristique bactériennes

Alors que l'environnement est décrit par des champs continus, les bactéries, elles, sont décrites par des particules individuelles. Chaque bactérie possède ses caractéristiques propres :

- position
- vitesse
- phénotype
- taille
- mémoire de la concentration en dioxygène vue au cours de la trajectoire
- liens établis avec d'autres bactéries

Toutes ces caractéristiques sont stockées dans des variables internes et nous allons maintenant décrire comment nous les faisons évoluer.

4.2.3.1 La marche aléatoire

Bacillus subtilis enchaine des phases de runs de $1\,s$ avec des phases de réorientation (ou tumbles) rapides par rapport à $1\,s$. Puisqu'elle évolue dans un environnement très visqueux (nombre de Reynolds de $Re = 10^{-5}$), la friction dissipe l'énergie cinétique de la bactérie quasi instantanément. Les bactéries n'ont donc pas d'inertie. Ainsi, dès que ses flagelles ne la propulsent plus, la bactérie s'arrête. Cela signifie également que la force de propulsion $\overrightarrow{f}_p$ fournie par les flagelles compense exactement la friction $\overrightarrow{f}_d$ lorsque la bactérie avance. Le bilan des forces lors d'un run de la bactérie s'écrit :

$$\overrightarrow{f}_p + \overrightarrow{f}_d = \overrightarrow{0}$$

La friction sur une particule sphérique de rayon r allant à la vitesse $\overrightarrow{v_0}$ peut être modélisée par la force de Stokes :

$$\overrightarrow{f}_d = -6\pi\eta r\overrightarrow{v_0}$$

avec η la viscosité dynamique du fluide. On connait alors la valeur de la force de propulsion : $\overrightarrow{f}_p = -\overrightarrow{f}_d = 6\pi\eta r\overrightarrow{v_0}$. Nous négligeons les autres interactions hydrodynamiques qui peuvent intervenir entre deux bactéries [22].

Les bactéries culbutent parfois (phase de tumble), et réalise ainsi une marche aléatoire. Cette phase du mouvement est reproduite en changeant la direction de la force de propulsion à certains instants t. La durée entre chaque instant t suit une loi de probabilité de Poisson. A chaque pas de temps dt de la simulation une particule a un probabilité constante de faire une tumble. On définit cette probabilité P_c comme :

$$P_c = \frac{dt}{\tau_{bal}}\,.$$

τ_{bal} est alors le temps moyen entre deux tumbles.

Dans la simulation, à un pas de temps donné, nous tirons un nombre aléatoire dans l'intervalle $[0, 1]$ pour chaque bactérie. Si ce nombre est inférieur à la valeur de P_c, nous changeons la direction de la force de propulsion de la bactérie. La nouvelle direction est alors choisie de la manière suivante : un autre nombre aléatoire est tiré dans l'intervalle semi-ouvert $[0, 1[$, et il est multiplié par 2π. Cette valeur donne l'angle entre la nouvelle direction et l'axe fixe (Ox). L'introduction d'un angle de persistance ne modifiera pas qualitativement le modèle, nous préférons donc ne pas en tenir compte pour garder un modèle le plus simple possible.

La marche aléatoire régulière n'a lieu que quand les bactéries sont dans un environnement homogène en dioxygène. Nous complétons donc ce modèle pour tenir compte de la faculté des bactéries à biaiser leur mouvement vers les zones riches en ce nutriment.

4.2.3.2 L'aérotactisme

Pour mesurer le gradient de dioxygène, les bactéries utilisent un mécanisme à mémoire [66]. En se rappelant la concentration de dioxygène qu'elles ont « senti » le long de leur trajectoire, elles peuvent savoir si la concentration qu'elles sentent à l'instant t est plus grande ou plus petite que celle qu'elles ont vu précédemment.

Pour modéliser ce mécanisme, nous attribuons à chaque particule deux variables internes m_l et m_c. m_l est équivalente à une moyenne glissante sur une *longue* fenêtre de temps de la concentration en dioxygène c senti par la particule le long de la trajectoire. De la même manière m_c correspond à une moyenne glissante sur une *courte* fenêtre de temps.

On écrit que :

$$\frac{dm_c}{dt} = \frac{c(\overrightarrow{x}(t), t) - m_c}{\tau_c} \,,$$

et

$$\frac{dm_l}{dt} = \frac{c(\overrightarrow{x}(t), t) - m_l}{\tau_l} \,.$$

où $\overrightarrow{x}(t)$ est la position des bactéries à l'instant t, τ_l et τ_c sont les temps typiques sur lesquels nous moyennons la concentration en dioxygène.

Etudions comment évoluent $m_c(t)$ et $m_l(t)$ si on admet que la bactérie est plongée dans un gradient de dioxygène constant $\overrightarrow{G_0}$ dirigé selon l'axe (Oy). On peut écrire la concentration vue par la bactérie comme

$$c = c_0 + G_0 y \,,$$

où y est la position de la bactérie selon (Oy) et c_0 la concentration à l'origine du repère. Si la bactérie remonte le gradient avec une vitesse v selon (Oy) constante, on peut écrire que, au temps t

$$c = c_0 + G_0 v t \,,$$

si on pose que, à $t = 0$ la bactérie est à l'origine du repère. Les solutions m_l et m_c pour une telle évolution de la concentration sont :

$$m_l = G_0 v[t - \tau_l(e^{-t/\tau_l} - 1)]$$

et

$$m_c = G_0 v[t - \tau_c(e^{-t/\tau_c} - 1)] \,.$$

Soit aux temps long $m_l = G_0 v\,(t + \tau_l)$ et $m_c = G_0 v\,(t + \tau_c)$. Ce qui implique que :

$$m_l - m_c = G_0 v(\tau_l - \tau_c)$$

Ainsi, grâce à ce modèle, la valeur de $m_l - m_c$ est proportionnelle à la valeur du gradient de dioxygène G_0. Dans le cas où les bactéries sont soumises à un

pulse de dioxygène ($c(t<0)=0$, $c(t>0)=C_0$) les solutions de m_l et m_c deviennent :

$$m_l = C_0(1-e^{-t/\tau_l})$$

et

$$m_c = C_0(1-e^{-t/\tau_c})\,.$$

La concentration m_c prendra la valeur de C_0 en un temps typique de τ_c, tandis que m_l mettra un temps τ_l. Il faudra donc à la particule une durée τ_c pour tenir compte de la nouvelle valeur de la concentration. Puis, au bout d'un temps long devant τ_l, la différence $m_l - m_c$ devient nulle et la particule retrouve une motilité normale de marcheur aléatoire non biaisé. Compte tenu de la littérature [119], le temps τ_c est de l'ordre du dixième de seconde et le temps τ_l de l'ordre d'une dizaine de seconde.

Comme on le verra ci dessous, la quantité $m_l - m_c$ permet de mesurer les gradients de dioxygène vu par une bactérie pendant le temps $\tau_l - \tau_c$. Dans le cas où $m_c(t) - m_l(t) < 0$ pour une bactérie, cela signifie qu'elle s'éloigne d'une source de dioxygène. Dans notre modèle, on pose que la probabilité de tumble est alors égale à :

$$P_c = \frac{d\mathrm{t}}{\tau_{bal}}\,.$$

Dans le cas où $m_c(t) - m_l(t) > 0$ la bactérie va au contraire en direction d'une source de dioxygène.

Pour tenir compte de l'aérotactisme des bactéries, il faut que les particules augmentent la durée de leur phase de run en fonction de l'augmentation de la concentration en dioxygène qu'elle resentent. Autrement dit, il faut qu'elles tumblent moins souvent. On fait donc dépendre la probabilité de tumble de la quantité $m_l(t) - m_c(t)$ et on pose que :

$$P_c = \frac{d\mathrm{t}}{\tau_{bal}} \frac{1}{1+\lambda(m_c(t)-m_l(t))}$$

avec λ un coefficient constant.

Nous allons montrer que dans certaines conditions, λ peut être relié à au coefficient d'aérotactisme α que nous avons utilisé dans le modèle continu. Prenons une nouvelle fois le cas où une bactérie est dans un gradient de dioxygène constant dirigé selon (Oy). La probabilité qu'une particule tumble, moyennée à l'échelle d'une population, permet de calculer $\mathcal{P}_c$. $\mathcal{P}_c$ est la fraction des particules allant dans la direction θ qui tumble au temps t. Autrement dit, c'est la probabilité de trouver une particule allant dans la direction θ en train de tumbler. On peut l'écrire comme :

$$\mathcal{P}_c(\theta) \approx \frac{dt}{\tau_{bal}} \frac{1}{1 + \lambda \xi G_0 v \cos\theta}\,, \tag{4.5}$$

ξ est un paramètre d'échelle homogène à un temps. Comme on choisi qu'il n'y ait pas d'angle de persistance lors d'un tumble, nous pouvons écrire l'équation d'évolution de population se déplaçant dans la direction θ comme :

$$\partial_t \mathcal{N}_\theta(\theta) = -\mathcal{N}_\theta(\theta)\mathcal{P}_c(\theta) + \frac{1}{2\pi}\int_{-\pi}^{+\pi} \mathcal{N}_\theta(\theta')\mathcal{P}_c(\theta')d\theta'\,. \tag{4.6}$$

Dans l'état stationnaire :

$$\partial_t \mathcal{N}_\theta(\theta) = -\mathcal{N}_\theta(\theta)\mathcal{P}_c(\theta) + \frac{1}{2\pi}\int_{-\pi}^{+\pi} \mathcal{N}_\theta(\theta')\mathcal{P}_c(\theta')d\theta' = 0\,.$$

Ce qui signifie que $\mathcal{N}_\theta(\theta)\mathcal{P}_c(\theta)$ est constant car

$$\mathcal{N}_\theta(\theta)\mathcal{P}_c(\theta) = \frac{1}{2\pi}\int_{-\pi}^{+\pi} \mathcal{N}_\theta(\theta')\mathcal{P}_c(\theta')d\theta' = \text{constante}\,.$$

De plus, avec

$$1 = \int_{-\pi}^{+\pi} \mathcal{N}_\theta(\theta')d\theta' \tag{4.7}$$

nous obtenons que

$$\mathcal{N}_\theta(\theta) = \left(\int_{-\pi}^{+\pi} \frac{1}{\mathcal{P}_c(\theta')}d\theta'\right)^{-1} \frac{1}{\mathcal{P}_c(\theta)}\,. \tag{4.8}$$

Si on injecte l'équation 4.5 dans l'équation 4.8 on a :

$$\mathcal{N}_\theta(\theta) = \frac{1}{2\pi}(1 + \lambda \xi G_0 v \cos\theta)\,. \tag{4.9}$$

On calcule alors la vitesse de dérive selon l'axe (Oy) en moyennant la vitesse de la population de bactéries en projection sur (Oy) :

$$v_d = \frac{1}{2\pi}\frac{\int_{-\pi}^{+\pi} vcos(\theta')\mathcal{N}_\theta(\theta')d\theta'}{\int_{-\pi}^{+\pi} \mathcal{N}_\theta(\theta')d\theta'} = \int_{-\pi}^{+\pi} vcos(\theta')\mathcal{N}_\theta(\theta')d\theta'\,, \tag{4.10}$$

et on obtient :

$$v_d = \frac{1}{2}\lambda G_0 \xi v^2\,. \tag{4.11}$$

Cette analyse donne une loi d'échelle sur la vitesse de dérive de la population de bactéries en fonction des paramètres significatifs, du système : G_0, v et λ. Il est à noter que ce calcul est valable pour toute forme de probabilité de tumble d'une bactérie allant dans la direction θ du type $\mathcal{P}_c(\theta) = 1/(1+f(\theta))$.

Pour valider ces résultats nous avons simulé 10000 bactéries dans un espace infini contenant un gradient de dioxygène constant. Les simulations sont faites pour différentes valeurs de G_0 et λ. Nous voyons sur la figure 4.3 que la vitesse de dérive augmente linéairement avec le gradient de dioxygène jusqu'à la valeur maximale de $v_d = v = 2.10^{-5}\, m.s^{-1}$. L'augmentation linéaire de la

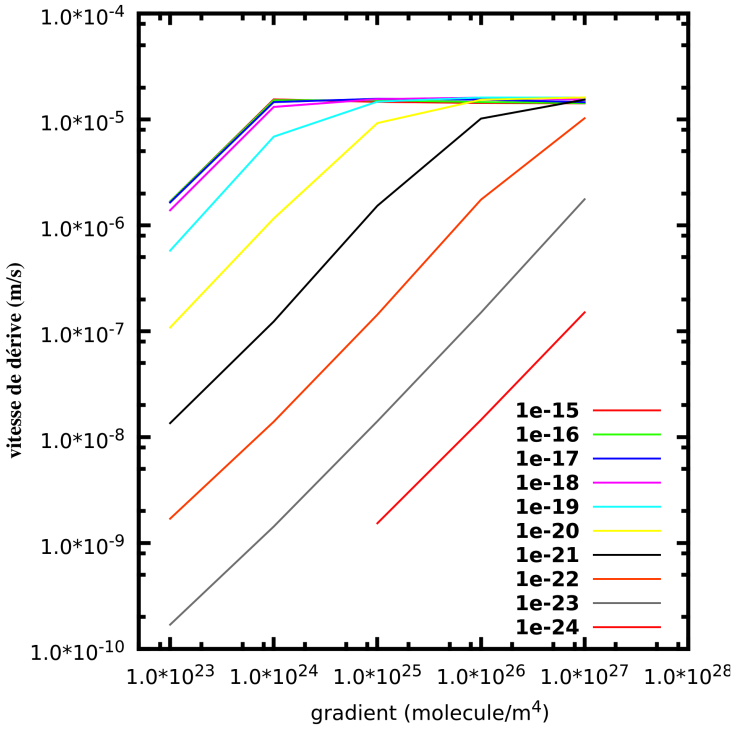


FIGURE 4.3 – Vitesse de dérive v_d calculée par simulation en fonction de G_0 pour différentes valeurs du coefficient d'aérotactisme λ. La vitesse de dérive augmente linéairement avec le gradient de dioxygène jusqu'à un plateau. L'abscisse du début du plateau dépend de λ. Plus λ est petit plus la valeur de G_0 à laquelle commence le plateau est petite.

vitesse de dérive avec le gradient est cohérente avec les résultats analytiques et valide donc cette dépendance dans l'équation (4.11). L'abscisse du point où le plateau commence dépend de la valeur de λ. Plus λ est grand, plus

cette abscisse est petite. Dans la région du plateau ni la loi de puissance ni la probabilité P_c ne sont valables. En effet, si la population dérive à la vitesse de propulsion d'une bactérie individuelle (v), cela signifie que les particules de la population ne font plus de marche aléatoire, au contraire elles se déplacent toutes dans la direction du gradient. Cela nous a conduit à choisir une valeur de λ compatible avec les gradients de dioxygène observés dans les simulations. Nous avons vu dans le chapitre précédent que la valeur maximale du gradient de dioxygène était de l'ordre de 10^{26} molecule.m^{-4}. Cela donne une gamme acceptable de la valeur de λ. Nous choisissons une valeur λ au maximum de 10^{-20} m^3.molecule^{-1}.

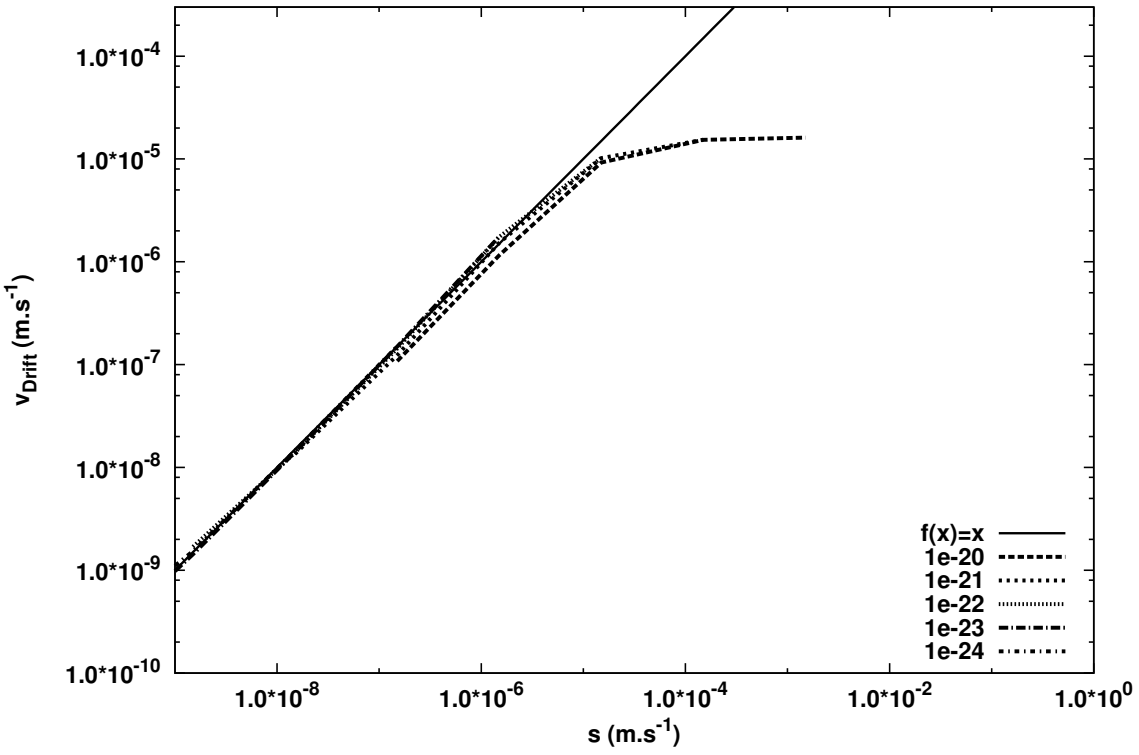


Figure 4.4 – Vitesse de dérive de la population de bactéries en fonction $s = G_0\lambda\xi v^2/2$. Les simulations faites pour différentes valeurs de λ et G_0 se superposent sur la même droite de pente 1.

Pour aller plus loin dans la validation de la loi de puissance, nous traçons dans la figure 4.4 la vitesse de dérive en fonction de $s = G_0\lambda\xi v^2/2$ en prenant

$\xi = \tau_{bal}/2 = 0,5\,s$.

Chaque point du graphique correspond à la valeur de la vitesse de dérive pour un couple (G_0,α) avec $G_0 \in [10^{23} - 10^{27}]$ et $\lambda \in [10^{-24} - 10^{-20}]$. Nous voyons sur la figure 4.4 en échelle log-log que toutes les courbes se superposent. Cela nous conforte dans le choix de ce modèle. Celui-ci permet de paramétrer la vitesse de dérive des particules en fonction de la valeur de λ. Autrement dit λ paramètre la sensibilité des particules au gradient de dioxygène.

En conclusion, l'expression de la probabilité de tumble d'une particule donnée dans l'équation (4.5) convient pour simuler l'aérotactisme des bactéries dans toute la gamme des gradients de dioxygène accessibles dans le sysème (0-10^{26} molecule.m^{-4}). Pour $\lambda < 10^{-20}$ m^3.molecule^{-1} la dérive des bactéries est doucement couplée avec le gradient de dioxygène. Nous resterons donc dans cette gamme de valeur pour λ et nous prenons pour expression de P_c :

$$P_c = \begin{cases} \frac{d\mathrm{t}}{\tau_{bal}} \frac{1}{1+\lambda(m_c(t)-m_l(t))} & \text{si} \quad m_c(t) - m_l(t) > 0 \\ \frac{d\mathrm{t}}{\tau_{bal}} & \text{si} \quad m_c(t) - m_l(t) < 0 \end{cases}$$

4.2.3.3 Transition vers la formation d'un biofilm : Le *quorum sensing*

Comme vu en introduction, toutes les particules ne font pas de marche aléatoire. En effet, les particules qui ont transité dans l'état producteur de matrice n'ont plus de force de propulsion $\overrightarrow{f}_p$.

La formation d'un biofilm chez *BS* est conditionné par le changement du phénotype des bactéries. Chez *Bacillus subtilis,* les bactéries qui sont initialement motiles changent de comportement quand elles produisent les éléments constitutifs du biofilm, la matrice. Deux phénotypes sont distingués : le phénotype motile et le phénotype producteur de matrice.

Le changement de phénotype dépend de l'environnement de chaque bactérie. En effet, celui-ci est piloté par la capacité des bactéries à communiquer avec ses voisines. Nous avons vu en introduction 1.3.2 que les bactéries communiquent de différentes façons. Toutes ces interactions ont pour conséquence que le déclenchement de la formation d'un biofilm est un phénomène complexe. Notre approche cherche à extraire les lois essentielles de la formation d'un biofilm. Nous devons donc tenir compte de la communication

entre bactéries, mais la prise en compte de toutes les voies d'actions connues introduirait une multitude de paramètres inconnus (fonction de réponse à un stimulus, paramètres de cette fonction...). Nous resumons l'ensemble des interactions en une seule : la mesure de la concentration locale de voisines (quorum sensing).

Nous savons (section 1.4.2) que la transition des bactéries de l'état motile à l'état producteur dépend d'un mécanisme à seuil. Donc, nous modélisons la transition d'une particule d'un état à l'autre grâce à une fonction à seuil. Aussi, si une particule se trouve dans une région avec une concentration dépassant le quorum, elle transite dans l'état productrice de matrice. De plus, nous supposons que ce changement est irréversible.

Dans les expériences, la concentration en bactéries dans le milieu lors de l'apparition des premiers morceaux de biofilm est d'environ 10^{13}bacteries.m^{-3}. Nous prendrons donc une valeur du seuil n_{ph} égal ou supérieur à 10^{13}bactéries.m^{-3}.

Nous attribuons à chaque particule une variable interne de phénotype. Si la concentration locale en bactéries n calculée à la position de la particule dépasse la concentration seuil n_{ph}, la particule transite vers l'état producteur de matrice. Nous définissons une probabilité de transition P_{ph} de la façon suivante :

$$P_{ph} = \frac{d\mathrm{t}}{\tau_{ph}} \Theta \left(n - n_{ph} \right) \ ,$$

où Θ est la fonction Heaviside (0 si $n < n_{ph}$, 1 si $n > n_{ph}$). P_{ph} donne la probabilité qu'une particule passe de l'état motile l'état producteur de matrice pendant le temps dt. La durée τ_{ph} est le temps moyen que met une particule à transiter lorsqu'elle est dans un environnement qui dépasse le seuil de concentration. Ce paramètre est inconnu mais nous allons le prendre de l'ordre d'une fraction de seconde car c'est le temps caractéristique que peut mettre une bactérie pour détecter un changement de son environnement (comme dans le cas de l'aérotactisme).

Une fois qu'une particule a transité vers l'état sédentaire, elle demeure dans cette état, produit alors de la matrice extracellulaire et devient capable d'établir des liens avec d'autres bactéries.

4.2.3.4 Augmentation du volume des bactéries

Le volume des bactéries motiles et producteur de matrice augmentent tous les deux au cours du temps jusqu'à une valeur maximale. Dans l'état motile les bactéries augmentent leur volume avant de se diviser. Pour BS nous avons

vu que le temps de division τ_d dans des conditions qui mènent à la formation d'un biofilms est de l'ordre de l'heure. Nous prendrons donc la valeur de $\tau_d = 50\,\text{min}$ pour paramétrer le processus de division des particules. De plus, BS ayant besoin de dioxygène pour son métabolisme, nous supposerons que le taux de division d'une particule dépend de la concentration locale en dioxygène. Si le dioxygène vient à manquer, les particules ne se divisent plus.

On pose que le volume d'une bactérie motile augmente selon la loi :

$$\frac{dV}{dt} = \frac{V_d - V}{\tau_d} \frac{c}{c + K_c}\,.$$

Le taux de croissance dépend de la concentration en dioxygène selon un terme de Michealis-Menten bien connu.

La taille d'une particule est paramètrée par son rayon stocké dans une variable interne. Avec $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ le rayon qui évolue au cours du temps selon l'équation :

$$\frac{dr}{dt} = \frac{r_d^3 - r^3}{3\tau_d\, r^2} \frac{c}{c + K_c}\,.$$

Le rayon limite d'une bactérie r_d correspond au rayon pour lequel la volume de la bactérie est doublé par rapport au rayon standard r_0 d'une bactérie. On a donc $r_d = \sqrt[3]{2}\, r_0$.

Dans l'état producteur de matrice, les bactéries augmentent également de volume mais ne se divisent pas. De plus, nous modélisons le processus de production de matrice comme la formation d'une coque de matrice extracellulaire autour d'elle. Comme on l'a vu en introduction, la masse de matrice extracellulaire dépend beaucoup de conditions expérimentales. Elle peut être trois fois plus grande que la masse de la bactérie ou cent fois plus petite. Par conséquent, il est difficile de définir clairement quel est le volume maximal d'une particule qui produit de la matrice. Nous faisons alors l'hypothèse que la particule ne produit que quelques fois le volume standard d'une particule $\frac{4}{3}\pi r_0^3$.

Comme nous l'avons observée, la formation d'un biofilm mature s'étale sur une dizaine d'heures à partir du moment où se forment les morceaux sur la surface. On pose que le temps typique de production de la matrice extracellulaire vaut $\tau_m = 10$ h. De plus on suppose que lorsque les bactéries sont dans un environnement pauvre en dioxygène elles arrêtent de produire de la matrice extracellulaire. On utilise alors, à nouveau un terme de Michealis Menten qui réduit le taux de production de matrice quand la concentration de dioxygène est faible. L'évolution du rayon suit donc la loi :

$$\frac{dr}{dt} = \frac{r_m^3 - r^3}{3\tau_m r^2} \frac{c}{c + K_c} .$$

Ici, le rayon maximal de la bactérie est paramétré par son rayon r_m.

4.2.3.5 Densité massique des bactéries

Dans notre modèle, les particules motiles représentent des bactéries individuelles, et les particules productrices de matrice, des bactéries entourées d'une gangue de matrice extracellulaire. Leur masse volumique (densité) n'est donc pas la même.

Concernant la densité des bactéries productrices de matrice, nous avons fait plusieurs observation intéressantes. D'abord, le biofilm qui se forme à la surface de l'eau n'est pas un matériau homogène. Si on casse la pellicule d'un biofilm mature, certains morceaux flottent, d'autres tombent dans le liquide, d'autres encore surnagent. Ensuite, si on conserve la pellicule intègre mais qu'on la détache simplement des bords de la flasque de culture, le biofilm se maintient sur la surface. Nous pouvons alors envisager plusieurs mécanismes pour assurer la flottaison du biofilm sur la surface liquide (tension de surface, densité). Ici, nous avons fait l'hypothèse simplificatrice de n'en considérer qu'une seule. On suppose que la densité des particules qui produisent de la matrice extracellulaire est égale à celle de l'eau.

Lors du calcul de la masse volumique pour resoudre l'équation (4.1) d'évolution du fluide il y a deux contributions différentes. L'une des particules motiles de densité égale à 103% celle de l'eau, comme dans le chapitre précédent, et celle des particules productrice de matrice égale à celle de l'eau.

En outre, l'équation (4.1) fait intervenir le volume V_n d'une particule. Bien que celui-ci varie au cours du temps pour chaque particule, nous n'en tenons pas compte, et nous considèrons que V_n est constant.

4.2.3.6 Divisions des particules

Les bactéries dans l'état motile se divisent. Lorsque c'est le cas, une particule mère donne deux particules filles. Si nous voulions strictement conserver le volume de la particule mère, les particules filles devraient hériter de la moitié du volume de leur mère. Leur rayon des particules filles devrait donc

être donc égale à

$$r_{fille} = \frac{r_{mère}}{\sqrt[3]{2}} \,.$$

Cependant, dans le contexte d'une simulation où l'on tient compte des contacts entre particules, il est compliqué de conserver le volume. En effet, si on conserve le volume lors d'une division, cela implique que les deux particules filles vont se former comme sur le schéma de la figure 4.5b.

(a) (b)

FIGURE 4.5 – Schéma d'une division qui conserve le volume de la particule mère. La particules mère est grise et les particules filles sont en noir. Les deux particules filles poussent dans une direction (ici Ox).

Il peut alors survenir des situations comme sur la figure 4.5. En gris on représente deux particules sur le point de se diviser (figure 4.5a). Lorsque l'une d'elle se divise, une de ses filles (en noir) chevauche brutalement la particule voisine. Dans ce cas la distance centre à centre entre la particule voisine et la fille peut être égale à 70% du rayon de la fille. Cette situation n'est pas réaliste car la force de répulsion entre ces deux particules est alors colossale, ce qui rend la simulation très instable.

Nous choisissons donc d'utiliser une méthode qui évite ce problème. Pour cela, nous faisons en sorte que les particules filles ne dépassent pas les limites de la mère lorsqu'elle apparaissent. Ainsi, nous choisissons un processus de division comme celui représenté sur la figure 4.6, où le rayon des particules filles correspond à la moitié du rayon de la particule mère.

$$r_{fille} = \frac{r_{mère}}{2} \,.$$

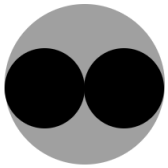


FIGURE 4.6 – Schéma de division utilisé dans les simulations. Les particules filles ne sortent pas du périmètre de contact de la mère. La simulation reste stable.

Pour finir, on précise que la direction de l'axe qui relie les centre des particules filles est choisi de manière aléatoire.

Cette division intervient avec une probabilité

$$\frac{d\mathrm{t}}{\tau_d}\frac{c}{c+K_c}$$

à chaque pas de temps. Quand il y a beaucoup d'oxygène par rapport à K_c, les bactéries se divisent avec le taux de division $1/\tau_d$. En revanche, quand le dioxygène vient à manquer, le taux de division décroit linéairement avec la concentration de dioxygène. Les particules cessent donc de se diviser quand elles sont dans un environnement pauvre en dioxygène.

4.2.4 La dynamique des bactéries individuelles

Traitons maintenant une partie importante du modèle : les contacts entre les particules. C'est cet élément du modèle qui permet de reproduire la transition « gaz-solide » qui intervient lors de la formation d'un biofilm.

Dans un premier temps, on verra comment on tient compte des forces de collision et de lien entre deux particules. Puis, nous nous intéresserons à la dynamique des particules compte tenue de leur motilité et de leurs contacts éventuels.

Chaque particule sphérique (ou en forme de cercle en 2D) a une taille finie paramétrée par son rayon. Dans les simulations, on utilise les méthodes de la dynamique moléculaire pour détecter les collisions entre particules. Ces méthodes procèdent en trois étapes à chaque pas de temps :

1. Détection des particules en contact les unes avec les autres
2. Calcul des forces de contact
3. Mise à jour de la position de chaque particule

4.2.4.1 Détection des contacts entre les particules

La première étape est donc de détecter les particules qui se chevauchent. Pour cela, on peut utiliser une méthode brutale consistant à calculer la distance entre chaque paire de particules. Pour un nombre N de particules, il y a donc N^2 opérations à faire. Cela représente un coût considérable pour les simulations numériques. A la place, nous préférons utiliser une méthode qui consiste à calculer la distance entre particules uniquement si elles sont voisines les unes des autres. Pour ce faire, on s'inspire de l'article de Lazarevic [61] qui explique très bien la démarche à suivre.

Tout d'abord, on définit ce qu'est le voisinage d'une particule. Pour cela, on divise l'espace 2D en cases de cotés $\Delta x \times \Delta y$ ($\Delta x = \Delta y$). Chaque particule contenue dans une case est définie comme voisine des autres. On procède donc au tri des particules du système dans chacune de ces cases. Pour $\Delta x = \Delta y = 10^{-4}$ m et $r_0 = 5.10^{-6}$ m (le rayon typique d'une particule) il y a au maximum une centaine de particules dans une case.

Numériquement, chaque particule est étiquetée par un indice et chaque case $\Delta x \times \Delta y$ est associée à un tableau. On passe donc en revue la position de toutes les particules, et on enregistre leur indice dans le tableau de la case correspondante. Lorsqu'une particule est à cheval entre deux cases, on l'enregistre dans les deux tableaux respectifs.

Une fois que les particules sont triées, on évalue la distance séparant celles qui sont dans la même case. Une collision à lieu quand la distance centre à centre entre deux particules est inférieure à la somme de leurs rayons.

4.2.4.2 Collision entre particules

Deux particules en collision subissent une force qui les repousse l'une de l'autre. On prend cette interaction de type cœur dur comme pour le potentiel de Lennard-Jones. On pose que la force exercée par la particule i sur la particule j est :

$$\overrightarrow{F_{ji}} = F_0 \left(\frac{r_i + r_j}{d_{ji}} \right)^{13} \frac{\overrightarrow{d_{ji}}}{d_{ji}} \quad \text{si} \quad d_{ji} < r_i + r_j$$

avec r_i le rayon de la particule i et r_j le rayon de la particule j, $\overrightarrow{d_{ji}}$ le vecteur qui relie le centre de i au centre de j, et d_{ji} la norme de ce vecteur. Le facteur F_0 calibre l'amplitude de cette force.

4.2.4.3 Lien entre particules

Un autre type de contact a lieu quand au moins une des bactéries est dans l'état producteur de matrice. Lorsqu'une particule dans l'état producteur de matrice entre en collision avec une autre particule, elle établit un lien avec celle-ci. C'est grâce à cela qu'un solide se forme dans le modèle.

Numériquement, lorsqu'une collision intervient avec une particule dans l'état producteur de matrice, on enregistre dans un tableau interne de cette particule l'indice de l'autre particule en contact. Puis, on calcule la valeur de la force qui relie les deux bactéries. La force est modélisée par un ressort de constante de raideur κ. Après la phase de répulsion lorsque les deux particules se chevauchent, les deux particules s'éloignent ($d_{ji} > r_i + r_j$). C'est là qu'intervient la force de rappel de i sur j :

$$\overrightarrow{F_{ji}} = -\kappa \left(d_{ji} - (r_i + r_j)\right) \frac{\overrightarrow{d_{ji}}}{d_{ji}} \quad \text{si} \quad d_{ji} > r_i + r_j \,,$$

avec $\overrightarrow{d_{ji}}$ le vecteur qui relie le centre de i au centre de j. Toutefois, on introduit une non linéarité dans le ressort pour rendre compte de la plasticité du biofilm. Cela évite également d'avoir des forces à longue portée qui seraient colossales et déstabiliseraient la simulation. Nous posons que si le lien est distendu d'une longueur supérieure à deux fois la somme des rayons des particules considérées, il se casse. Concrètement, on efface l'indice des particules en contact de leurs tableaux internes respectifs. Ainsi, constante de raideur κ ? Il a été montré que le module de Young Y d'un biofilm varie de 10 à 10^4 Pa [107]. Si on considère le biofilm de BS dans les mêmes conditions que celui des expériences, le module de Young est de 300 Pa. On convertit cette valeur en raideur de la manière suivante :

$$\kappa = Y \times \frac{S}{L} \,.$$

S est la surface sur laquelle s'applique la force $\overrightarrow{F_{ji}}$, L est la longueur du ressort au repos. Ceci suppose que la force s'applique sur une section d'une particule standard $S = \pi r_0^2$. Si on ne prend que la distance au repos comme la distance entre deux particules tangentes $L = 2r_0$, cela donne une valeur de :

$$\kappa = 300 \times \frac{\pi r_0^2}{2r_0} = 2,4.10^{-4}\,\mathrm{N}.m^{-1} \,.$$

La valeur maximale de la force de rappel que l'on peut avoir dans le système est donc de :

$$F_{ji} = 2,4 \cdot 10^{-4} \times (4r_0 - 2r_0) \approx 2,5 \cdot 10^{-9}\,\mathrm{N}\,.$$

Mais, nous verrons dans la suite qu'on ne peut pas prendre une telle valeur à cause de contraintes numériques.

Pour résumer, la force de contact entre particules a deux régimes :

$$F_{ji} = \begin{cases} F_0 \left(\frac{(r_i+r_j)}{d_{ji}}\right)^{13} \dfrac{\overrightarrow{d_{ji}}}{d_{ji}} & \text{si} \quad (r_i + r_j) > d_{ji} \\ -\kappa\,(d_{ji} - (r_i + r_j))\dfrac{\overrightarrow{d_{ji}}}{d_{ji}} & \text{si} \quad (r_i + r_j) < d_{ji} < 2\,(r_i + r_j) \end{cases} \tag{4.12}$$

4.2.4.4 Dynamique des bactéries dans le référentiel du fluide

Tenir compte des forces de contact dans la dynamique des particules impose certaines contraintes sur la valeur des forces que nous pouvons utiliser. Pour cela, le paramètre essentiel est le pas de temps dt. Un pas de temps petit permet d'avoir une dynamique précise mais augmente aussi drastiquement la durée d'une simulation. Dans nos simulations, nous avons utilisé un pas de temps de $d\mathrm{t} = 10^{-2}$ s. On explique ici les conséquences de ce choix sur les autres paramètres.

Pour résumer les forces qui agissent sur une particule, il y a la force de propulsion $\overrightarrow{f}_p$ (si elle est dans le phénotype motile), la force de contact $\overrightarrow{F}$ et la force de friction du fluide $\overrightarrow{f}_d$. Comme le mouvement des particules est dominé par la friction (on est à bas nombre de Reynolds $Re = 10^{-5}$) la somme des forces qui agissent sur une particule j est nulle,

$$\sum_i \overrightarrow{F_{ji}} + \overrightarrow{f}_p + \overrightarrow{f}_d = \overrightarrow{0}\,.$$

La vitesse de la particule j ($\overrightarrow{v_j}$) par rapport au fluide (dans le référentiel du fluide) au temps t, s'écrit grâce à la loi de Stokes :

$$\overrightarrow{v_j} = \frac{\sum_i \overrightarrow{F_{ji}} + \overrightarrow{f}_p}{6\pi\eta r}\,.$$

Ou encore, compte tenu de la vitesse de propulsion d'une bactérie v_0,

$$\overrightarrow{v_j} = \frac{\sum_i \overrightarrow{F_{ji}}}{6\pi\eta r} + \overrightarrow{v_0}\,.$$

Pour avoir la position $\overrightarrow{l}$ de la particule au pas de temps $t+dt$, on utilise le schéma d'Euler explicite :

$$\overrightarrow{l}(t+d\mathrm{t}) = \overrightarrow{l}(t) + \overrightarrow{v}d\mathrm{t}$$

Arrêtons-nous maintenant pour discuter le terme $\frac{\sum_i \overrightarrow{F_{ji}}}{6\pi\eta r}$. Admettons que la particule j soit en contact uniquement avec une autre particule (i). La force de contact qui agit sur j est donnée par eq. 4.12.

Nous avions précédemment différé le choix de la valeur de F_0, désormais nous avons tous les éléments pour la choisir. F_0 étant complètement inconnu expérimentalement, nous allons choisir sa valeur de manière à ce que les bactéries ne puissent pas se traverser comme des fantômes. Considérons le cas d'une collision entre deux particules de vitesse $20\,\mu\mathrm{m}.s^{-1}$, elles parcourent donc une distance de $dl = 20\,\mu\mathrm{m}.s^{-1} \times d\mathrm{t}$ en un pas de temps $d\mathrm{t}$. La valeur maximale de chevauchement qui peut survenir dans la simulation est de $2dl$. Cela correspond au cas où deux particules sont tangentes l'une de l'autre au temps t avec une vitesse opposée. Elles s'interpénètrent au pas de temps suivant $t+d\mathrm{t}$ sur une longueur de $2dl$. Si on considère qu'elles ont pour rayon r_0, au temps $t+d\mathrm{t}$ la distance entre le centre est de $d_{ji} = 2r_0 - 2dl$. La norme de la force F_{ji} prend alors la valeur de :

$$F_{ji} = F_0 \left(\frac{10^{-5}}{10^{-5} - 4.10^{-5} d\mathrm{t}} \right)^{13} \approx 1,7\, F_0\,.$$

Cette force donne une vitesse aux deux particules de

$$v_j \approx 1,7\, \frac{F_0}{6\pi\eta r_0} = 1,8.10^7 F_0\,.$$

Pour que la simulation reste stable, il faut que la distance parcourue à chaque pas de temps par une particule ne soit pas trop grande (notez qu'on est ici dans l'un des cas extrêmes). On prend comme critère empirique qu'une particule ne doit pas avancer de plus de 1% de sa taille

$$dl < 2r_0 \times 1\%\,.$$

La valeur de distance parcourue dépend évidement du pas de temps $d\mathrm{t}$, et pour $d\mathrm{t} = 10^{-2}\,\mathrm{s}$, la particule parcourt

$$dl = d\mathrm{t} \times v_j \approx 1,8.10^5 F_0$$

avec notre critère cela impose une valeur sur F_0 de :

$$F_0 < 6.10^{-13}\,\mathrm{N}\,.$$

Dans notre cas on prend $F_0 = 3.10^{-13}\,\mathrm{N}$.

Considérons maintenant le cas d'un lien entres deux particules. La norme de la force est :

$$\left\|\overrightarrow{F_{ji}}\right\| = \kappa\left(d_{ji} - (r_i + r_j)\right).$$

La littérature nous donne une valeur de $\kappa = 2,4.10^{-4}\,\mathrm{N}.m^{-1}$ sur un biofilm macroscopique [107]. Cependant, nous allons voir que nos simulations ne peuvent pas utiliser une telle constante de raideur. Si on se place dans le cas où la distance d_{ji} à pour valeur la distance seuil avant la cassure du lien, on a que $F_{ji} = \kappa\left(r_i + r_j\right) = 2\kappa r_0$. Les particules qui subissent cette force acquierent la vitesse de

$$v_j = \frac{F_{ji}}{6\pi\eta r_0} = \frac{2\kappa r_0}{6\pi\eta r_0} = 10^2\kappa\,\mathrm{m.s}^{-1}.$$

Selon le même critère que précédemment on obtient une borne supérieure de la valeur de la raideur κ :

$$\kappa < 10^{-7}\,\mathrm{N}.m^{-1}\,.$$

Cette valeur est 100 fois plus petite que la raideur des biofilm de BS donnée par le calcul précédent en partant de la littérature. Il est donc a noter que les simulations ne rendent donc pas compte des propriétés viscoélastique du biofilm.

Pour conclure, la dynamique des particules, et notamment les forces qu'on peut appliquer sur elles sont contraintes par la méthode numérique. Le valeur de coefficient pour l'interaction de cœur dure sera $F_0 = 3.10^{-13}\,\mathrm{N}$ et la constante de raideur $\kappa = 10^{-7}\,\mathrm{N}.m^{-1}$.

4.2.4.5 Dynamique des bactéries dans le référentiel du laboratoire

Précedemment, le calcul de la vitesse des particules été fait dans le référentiel du fluide. Hors, notre modèle tient compte le mouvement du fluide. Comment cela s'intègre t-il à la dynamique des particules ?

Les mouvement d'ensemble du fluide, la bioconvection, entraine les particules. Pour tenir compte de cet effet, on ajoute simplement à la vitesse

calculée précédemment, la vitesse du fluide. Comme on l'a déjà dit la vitesse du fluide est calculée au niveau de la position de la particule par interpolation. Ce qui donne la vitesse totale $\overrightarrow{U_j}$ de la particule j :

$$\overrightarrow{U_j} = \overrightarrow{v_j} + \overrightarrow{u} \ .$$

Cela équivaut à écrire la force de friction du fluide sur une particule comme $\overrightarrow{f}_d = 6\pi r_0(\vec{v} - \vec{u})$

Pour finir, précisons comment estt défini le comportement des particules sur les bords solides de la boîte et à la surface du liquide.

4.2.4.6 Conditions aux bords

Sur les bords durs de la boîte (gauche, droite, bas) toutes les particules subissent une réflexion. Quand une particule sort de la boîte, nous inversons la composante de la vitesse qui est orthogonale à la paroi. La particule qui est « virtuellement » de l'autre coté du mur est repositionnée du bon côte selon une symétrie planaire (axiale en 2D) relative au mur.

Au niveau de la surface du liquide, nous imposons une condition spéciale. Si la particule est dans le phénotype motile, elle ne peut pas sortir du liquide en nageant. Nous posons alors que la composante verticale de la vitesse U_y de la particule s'inverse quand elle dépasse la surface. Ainsi, on assure qu'aucune particule motile ne sort du liquide. Le particule productrice de matrice, quant à elle, ne sont soumise à aucune conditions particulière (elle peuvent traverser du liquide).

Finalement, pour que le biofilm puisse adhérer sur les bords de la boîte, nous disposons des particules immobiles le long de deux murs verticaux. Ainsi, les particules dans l'état producteur de matrice entrant en contact avec elles pourront y adhérer.

4.2.4.7 Résumé et choix des paramètres

Dans le tableau suivant on résume les paramètres utilisés dans le modèle. Nous donnons ici les valeurs typique utilisées. Dans la suite que nous avons fait varier certains d'entre eux (γ, n_{ph}) pour étudier leur effet et leur rôle dans les simulations.

Noms	Symboles		Unités
taux de consommation de dioxygène	γ	10^6	molécules.s^{-1}.bactérie^{-1}
constante de Michaelis	K	10^{20}	molécules.m^{-3}
constante de raideur	k	10^{-8}	$N.m^{-1}$
coefficient force coeur dur	F_0	10^{-4}	N
vitesse de propulsion d'une bactérie	v_0	20	μm.s^{-1}
seuil de transition nomade/sédentaire	n_{ph}	10^{13}	bactéries.m^{-3}
taux de transition nomade/sédentaire	τ_{ph}	2	h
densité des bactéries	ρ_n	$1,3$	kg.m^{-3}
rayon initial des bactéries	r_0	5	μm
temps moyen d'un run	τ_{bal}	1	s
coefficient aérotactique	λ	10^{-21}	m^3.molécule^{-1}
rayon maximal d'une bactérie nomade	r_d	$\sqrt[3]{2}r_0$	m
temps de division moyen	τ_d	50	min
taille maximale d'une bactérie sédentaire	r_m	$5r$	m
temps de production de la matrice	τ_m	10	h
temps d'intégration court du dioxygène	τ_c	$0,1$	s
temps d'intégration long du dioxygène	τ_l	10	s
pas spatial du maillage des champs continus	dx	5.10^{-4}	m
épaisseur de la tranche 2D	dz	$2r_0$	m
Largeur et hauteur de la tranche 2D	Lx	10^{-2}	m

TABLE 4.1 – Résumé des paramètres

4.3 Etudes paramétriques du modèle

Dans cette partie nous présentons la dynamique de formation des biofilms selon notre modèle en fonction des paramètres γ et n_{ph}. De plus, nous avons suivi différents aspects de la formation du biofilm en comparant systématiquement la dynamique avec et sans bioconvection.

D'abord, nous nous sommes intéressés à la transition des bactéries de l'état motile vers l'état producteur de matrice. Nous avons déterminé à quel moment et où a lieu la transition. Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'évolution de la concentration en bactéries dans le milieu. Puis, nous donnons différents scénarios typiques de formation d'un biofilm que nous observons pour certaines valeurs de γ et n_{ph}. Pour finir, nous avons enlevé l'aérotactisme du modèle pour voir quelle est son influence sur la dynamique de formation du biofilm.

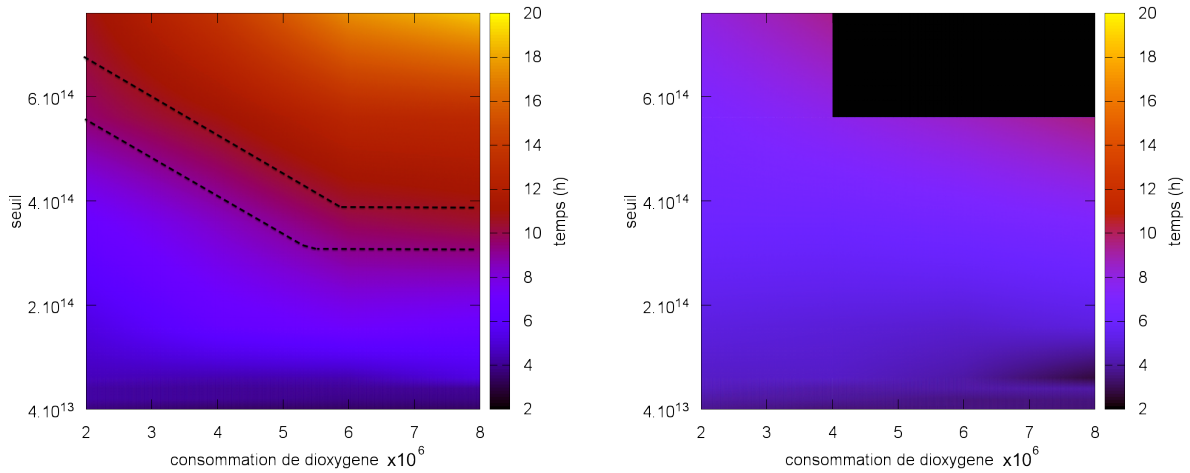
4.3.1 Formation d'un biofilm

4.3.1.1 Instant d'apparition

Nous nous sommes intéressés à la transition des bactéries de l'état motile à l'état producteur de matrice. Nous avons cherché à quel moment la transition a lieu, et quels sont les effets de la bioconvection sur la transition. Pour cela, nous représentons sur la figure 4.7 deux diagrammes qui donnent, en fonction de la consommation en dioxygène (γ) et du seuil de transition (n_{ph}), le temps à partir duquel il y a au moins 500 bactéries productrices de matrice dans le système.

Les expériences nous ont montré que l'apparition du biofilm a lieu pour une concentration dans le volume du milieu d'environ 10^{13} bactéries.m^{-3}. Nous savons également que les bactéries s'accumulent sous la surface et sont donc en réalité plus concentrées que 10^{13} bactéries.m^{-3} quand le biofilm se forme. Nous étudions donc l'influence du seuil de transition n_{ph} dans une gamme plausible de concentrations supérieures à 10^{13} bactéries.m^{-3}.

Par ailleurs, dans la littérature, on trouve que le taux de consommation en dioxygène de BS est d'environ $\gamma = 10^6$ molécules.s^{-1}.bactérie^{-1}. On sait aussi que cette valeur varie chez *E. coli* [67], ce qui est fortement probable d'être le cas chez BS également. Nous avons donc regardé quelle est l'effet du taux de consommation en dioxygène sur la cinétique de formation du biofilm dans le cas où elle est supérieure à 10^6 molecules.s^{-1}.bacterie^{-1}.



(a) Avec bioconvection (b) Sans bioconvection

FIGURE 4.7 – Instant d'apparition des premières bactéries dans l'état producteur de matrice en fonction de la consommation de dioxygène γ (abscisse) et le seuil de transition n_{ph} (ordonnée). On donne la valeur de γ en unités de 10^6 molécules·s^{-1}·bactéries^{-1}, et les valeurs de n_{ph} en bactéries·m^{-3}. Nous donnons en échelle de couleurs le temps à partir duquel il y a plus de 500 bactéries productrices de matrice (à 10 min près). La figure (a) montre le cas d'un modèle qui prend en compte la bioconvection, la figure (b) un modèle qui ne prend pas en compte la bioconvection. Dans la figure (b) il n'y a pas de points pour $\gamma = 6.10^6$ molécules·s^{-1}.bactérie^{-1} $n_{ph} = 8.10^{14}$ bactéries·m^{-3}, et $\gamma = 8.10^6$ molécules·s^{-1}.bactérie^{-1} $n_{ph} = 8.10^{14}$ bactéries·m^{-3} car après plus de 80 heures de temps simulé aucune transition n'avait eu lieu. On repère avec une bande en traits pointillés le temps de formation qui correspond aux observations expérimentales.

La figure 4.7a donne les temps d'apparition des premières transitions phénotypiques lorsque le modèle prend en compte la bioconvection, et la figure 4.7b lorsque le modèle ne prend pas en compte la bioconvection. La première chose que l'on remarque entre les deux diagrammes (figure 4.7a) est que la bioconvection augmente le duré nécessaire pour observer la transition

vers l'état producteur de matrice. Dans les zones du diagramme qui correspondent à un seuil de transition haut ($n_{ph} > 4.10^{14}$ bactéries.m^{-3}), il faut presque deux fois plus de temps.

L'effet de la consommation en dioxygène, dans la cas où le modèle prend en compte la bioconvection, n'est visible que dans une zone où le seuil de transition est entre 10^{14} bactéries.m^{-3} et 6.10^{14} bactéries.m^{-3}. Dans le cas où le modèle ne prend pas en compte la bioconvection, on ne voit pas d'effet de la consommation en dioxygène dans la gamme de valeurs de n_{ph} que nous avons testé.

En revanche, le seuil de transition n_{ph} a une grande influence sur l'instant d'apparition des premières transitions phénotypiques. Dans le cas où nous tenons compte de la bioconvection, ce paramètre fait varier le temps d'apparition de 3h à 20h pour $\gamma = 8.10^6$ molécules.s^{-1}.bactérie^{-1} et de 3h à 10h pour $\gamma = 2.10^6$ molécules.s^{-1}.bactérie^{-1}. Dans le cas sans bioconvection, l'effet est moins important mais toujours présent. C'est donc un paramètre essentiel de la dynamique de formation d'un biofilm.

Dans les expériences, nous avions constaté que les premiers morceaux de biofilm apparaissent vers environ 10h (à plus ou moins 1h) après l'inoculation du milieu. Nous identifions alors une bande de valeurs sur la figure 4.7a pour le couple de paramètres (γ, n_{ph}) qui respecte ces observations. Néanmoins, le temps d'apparition des premiers morceaux de biofilm dépend également du temps de division des bactéries. En diminuant le temps de division il est fort probable que la bande que nous repérons se décale vers les n_{ph} plus faibles car il faudra plus de temps pour dépasser le seuil critique de transition.

4.3.1.2 Localisation du biofilm

Dans le but d'étudier quel est l'effet de γ et n_{ph} sur l'endroit où les transitions phénotypiques ont lieu, nous représentons les bactéries dans le système lorsque plus de 10000 d'entre elles sont passées du phénotype motile au phénotype producteur de matrice. La boite simulée à deux dimensions fait 1 cm de hauteur (dont la moitié est occupé par le fluide) et 1cm de largeur. Les bactéries sont représentées par des points de couleur. Le code couleur est le suivant : les points rouges sont des bactéries motiles, les point violets sont des bactéries qui sont productrices de matrice mais qui sont connectées à moins de deux bactéries, les points noirs sont des bactéries productrices de matrice qui ont établi des liens avec au moins deux autres bactéries.

Observons d'abord le cas sans bioconvection des figures 4.8 et 4.9. La

localisation du biofilm est principalement contrôlée par la valeur de n_{ph}. Plus n_{ph} est élevé, plus le biofilm a tendance à se former à l'interface eau-air. Pour les valeurs de n_{ph} faible ($n_{ph} \leq 8.10^{13}$ bactéries.m^{-3}) on observe que la transition phénotypique a aussi lieu dans le volume de la culture.

Le paramètre de consommation en dioxygène semble jouer ici un rôle secondaire. Nous pouvons néanmoins voir que, lorsque n_{ph} est faible, le biofilm à tendance à se former à l'interface eau-air quand γ augmente. En revanche, on ne voit aucun effet pour n_{ph} élevé.

Le cas avec bioconvection est montré dans les figures 4.11 et 4.10. La bioconvection ne semble ici pas jouer un rôle important, car on observe les mêmes tendances que dans le cas sans bioconvection. Les morceaux de biofilm se trouvent à l'interface eau-air pour les grandes valeurs de n_{ph} et γ, et sinon dans le volume (pour leurs petites valeurs). Toutefois, la bioconvection joue un grand rôle dans la morphologie du biofilm.

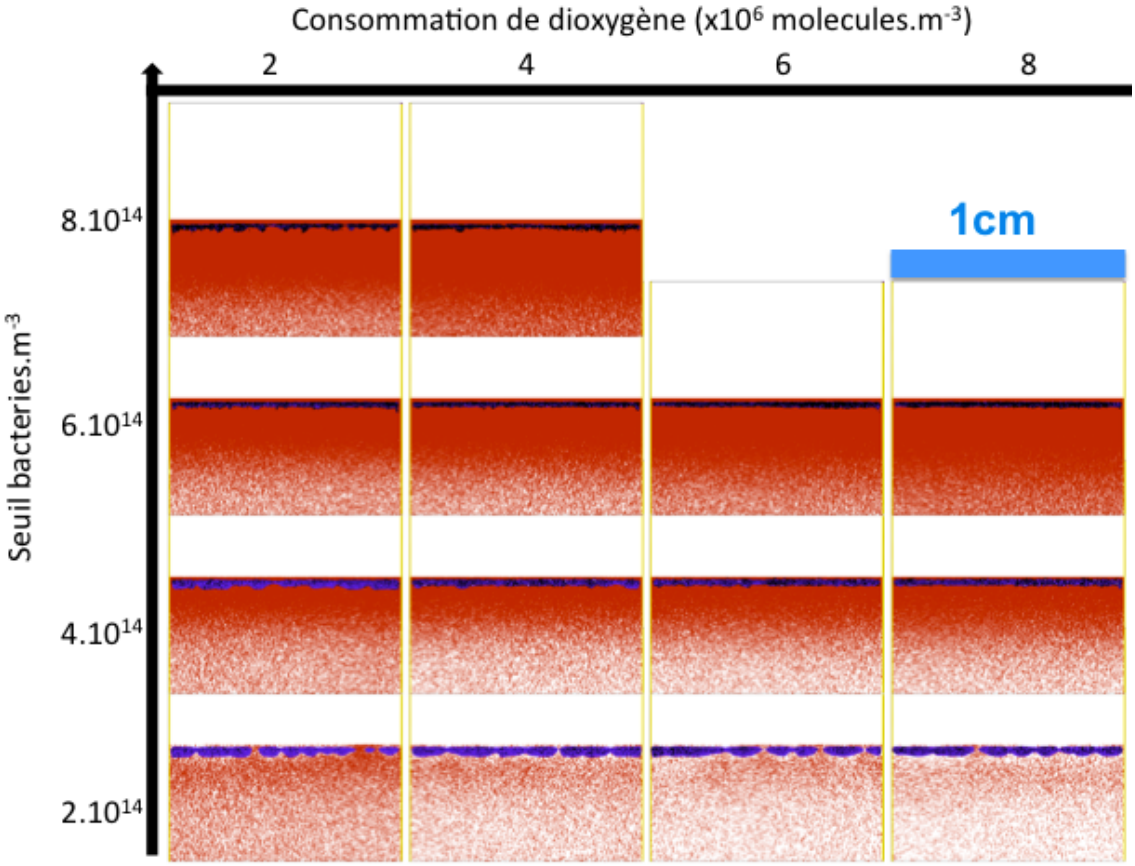


FIGURE 4.8 – Configurations du système après la transition de 1000 sans bioconvection. Il n'y a pas de points pour $\gamma = 6.10^6$ molecules.s^{-1}.bacterie^{-1} $n_{ph} = 8.10^{14}$ bactéries·m^{-3} et $\gamma = 8.10^6$ molécules·s^{-1}·bactérie^{-1} $n_{ph} = 8.10^{14}$ bactéries·m^{-3} car après plus de 80 heures de temps simulé aucune transition n'a lieu. s.

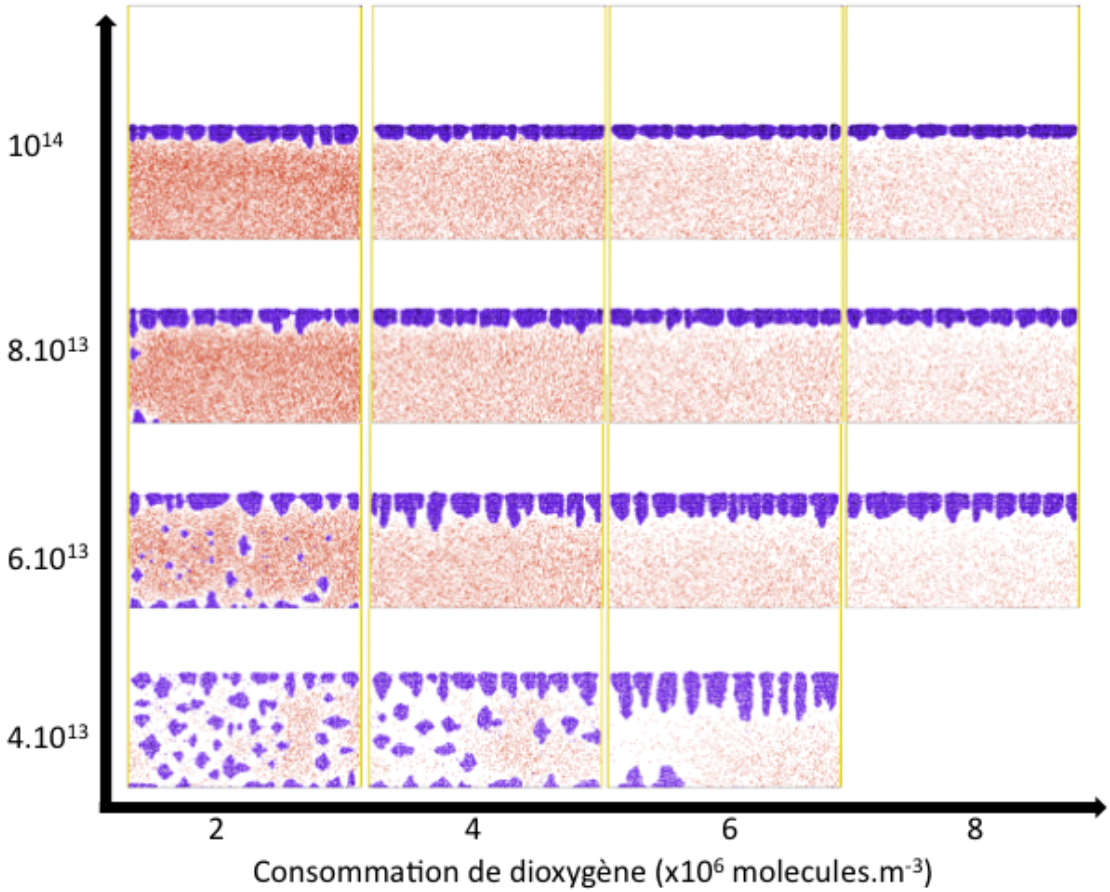


FIGURE 4.9 – Configurations du système après la transition de 1000 sans bioconvection.Il n'y a pas de points pour $\gamma = 8 \cdot 10^6$ molécules·s^{-1}·bactérie^{-1} $n_{ph} = 4.10^{13}$ bactéries·m^{-3} car après plus de 80 heures de temps simulé il n'y toujours pas plus de 10000 qui ont transité.

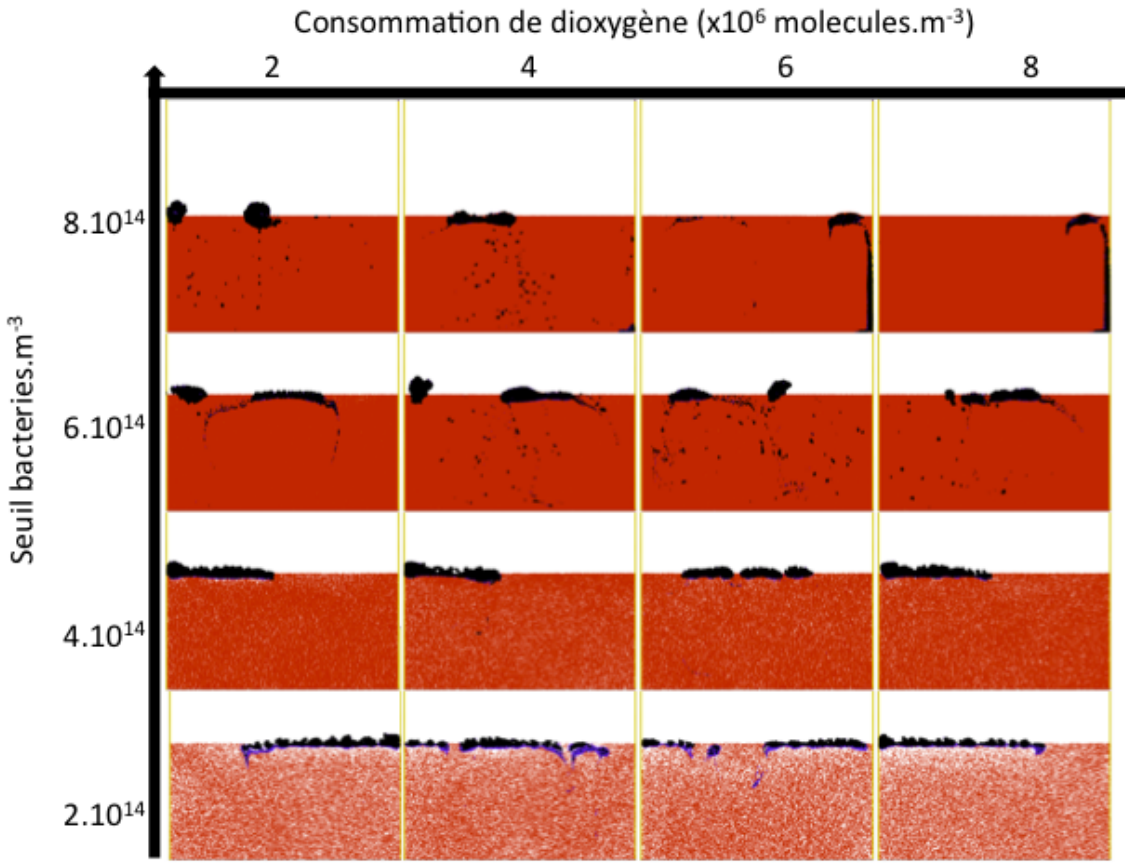


FIGURE 4.10 – Configurations du système après la transition de 1000 avec bioconvection.

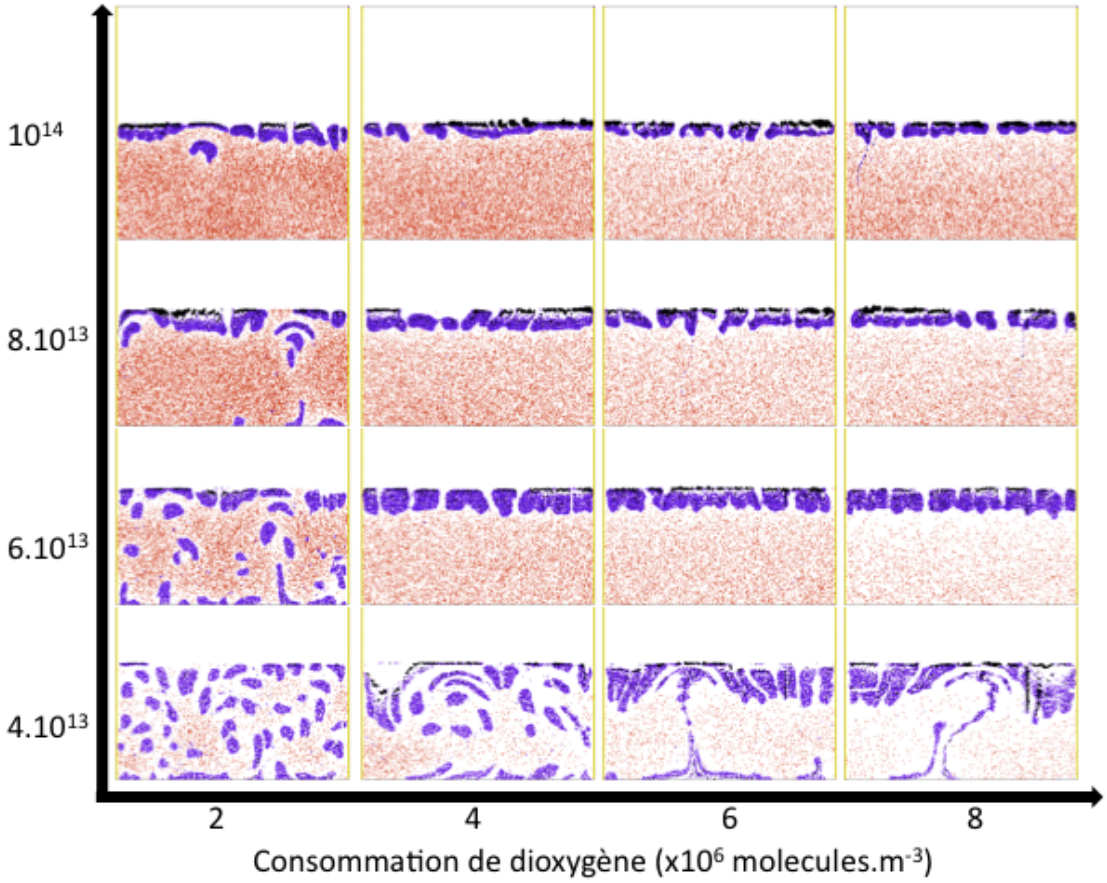


FIGURE 4.11 – Configurations du système après la transition de 1000 avec bioconvection.

Morphologie Dans les figures 4.10 et 4.11, nous pouvons voir que la bioconvection influence la structure du biofilm à l'interface eau-air. On peut distinguer sa structure interne faite de bactéries connectées ou non et sa structure globale faite d'une pellicule morcelée ou non.

Servons-nous du cas sans bioconvection comme référence (figure 4.8 et 4.9). Nous voyons que lorsque n_{ph} est faible ($n_{ph} \leq 8.10^{13}$ bactéries.m^{-3}) la couche de biofilm qui se forme à l'interface eau-air ressemble à un ensemble

de « stalactites » placées les unes à coté des autres. Plus n_{ph} augmente, plus les stalactites sont courtes et moins l'espace qui l'ai sépare est grand. La longueur de stalactite varie de 2 mm pour $n_{ph} = 4.10^{13}$ bactéries.m^{-3} à moins de 1 mm pour $n_{ph} = 8.10^{13}$ bactéries.m^{-3}. La couche devient donc de plus en plus fine et de moins en moins morcelée à mesure que n_{ph} augmente. On remarque que la consommation en dioxygène a un certain effet sur la longueur des stalactites : plus γ est grand plus elles sont longues.

Du point de vue de la structure interne du biofilm, dans le régime de n_{ph} faible comme dans celui où n_{ph} à des valeurs intermédiaires ($8.10^{13} < n_{ph} \leq 4.10^{14}$ bactéries.m^{-3}), on observe majoritairement des bactéries voilettes, ce qui veut dire qu'elles ne sont pas connectées entre elles.

Pour n_{ph} grand (4.10^{14} bactéries.m^{-3} $< n_{ph}$), la fine couche de biofilm principalement constituée de bactéries connectées entre elles (points noirs). Nous constatons peu d'effet de la consommation de dioxygène sur la morphologie du biofilm pour les valeurs intermédiaires et hautes de n_{ph}.

Si on regarde maintenant les figures 4.10 et 4.11 qui représentent le modèle avec bioconvection, nous voyons de nombreuses différences apparaitre par rapport au cas sans bioconvection. D'abord, dans le cas où n_{ph} est faible, les stalactites ou les morceaux de biofilm dans le volume que nous avons pu voir dans le cas précédent sont déformés par le fluide. De plus, la couche de biofilm qui se forme n'a pas la même structure interne. En effet, on voit se former une couche de bactéries connectées (points noirs) juste à la surface du liquide.

Plus le seuil est élevé, plus la couche de bactéries connectées devient épaisse et rugueuse (sur une échelle du millimètre). Dans le cas d'un seuil intermédiaire, nous voyons des filaments se former sous le biofilm comme dans nos expériences.

Pour les hautes valeurs de seuil, (4.10^{14} bactéries.m^{-3} $< n_{ph}$), le biofilm est fait de morceaux qui surnagent sur le milieu liquide et de grains dans le volume de la culture. Ces morceaux sont constitués de bactéries connectées (noir). Cette situation n'est clairement pas réaliste compte tenu de nos observations expérimentales.

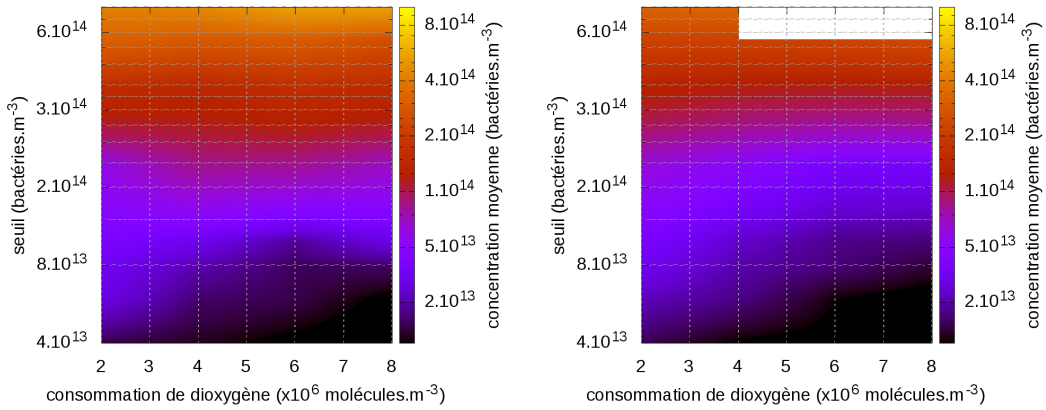
4.3.1.3 Conclusion

La bioconvection change le temps d'apparition, la structure interne et la morphologie du biofilm. La localisation de la formation du biofilm reste en revanche principalement pilotée par le seuil de transition n_{ph}, et pour les

faible valeur de n_{ph} par γ.

De manière générale, avec bioconvection, le biofilm met plus de temps à se former. L'instant auquel il apparait augmente avec n_{ph}. Enfin, la bioconvection favorise la formation d'un biofilm rugueux constitué de bactéries connectées les unes aux autres. Cette structure du biofilm est également favorisée avec l'augmentation de n_{ph}.

4.3.2 Concentration moyenne en bactéries au moment de la transition



(a) (b)

FIGURE 4.12 – Concentration moyenne au moment de la transition avec (figure 4.12a) et sans (figure 4.12b) convection, en fonction de la consommation de dioxygène γ (abscisse) et du seuil de transition n_{ph} (ordonnée). On donne les valeur de γ en unités de 10^6 molécules·s^{-1}·bactérie^{-1} et les valeurs de n_{ph} en bactéries·m^{-3}. Nous utilisons une échelle de couleurs logarithmique pour représenter la concentration moyenne en bactérie.

Dans les expériences, nous avons pu mesurer la concentration moyenne dans la culture de bactéries aux cours de la formation d'un biofilm. Nous avions constaté que les premiers morceaux de biofilm apparaissent pour une

concentration moyenne d'environ 10^{13} bactéries.m^{-3}. Qu'en est il dans notre modèle ?

Les figures 4.12 représentent la concentration moyenne en bactéries dans la culture au moment où plus de 500 bactéries ont transité dans l'état producteur de matrice. Nous étudions la valeur de cette concentration en fonction du seuil de transition n_{ph} et de la consommation de dioxygène γ. Nous avons réalisé l'étude dans le cas avec et sans bioconvection résumée dans les figures 4.12a et 4.12b.

Les deux diagrammes présentent de grandes similitudes et on remarque que la bioconvection n'a pas d'effet significatif sur la concentration en bactéries au moment de l'apparition du biofilm.

4.3.2.1 Effet du seuil de transition n_{ph}

Dans les deux figures 4.12a, 4.12b nous constatons que le seuil de transition a une importance majeure sur la concentration moyenne en bactéries dans le volume au moment de la transition. Pour une variation du seuil de 4.10^{13} bactéries·m^{-3} à 6.10^{14} bactéries·m^{-3}, la concentration moyenne varie de 10^{13} bactéries·m^{-3} à 6.10^{14} bactéries·m^{-3}. Plus n_{ph} est grand plus la concentration moyenne est grande.

Pour reproduire les observations expérimentales, le seuil de transition doit être inférieur à 2.10^{14} bactéries.m^{-3} où la concentration moyenne est d'environ 10^{13} bactéries.m^{-3}. Cette observation n'est pas cohérente avec celles faites sur la figure 4.7a, mais ces observations sont établies pour une certaine valeur des autres paramètres, notamment le temps de division des bactéries.

4.3.2.2 Effet de la consommation en dioxygène γ

Le taux de consommation en dioxygène ne joue un rôle que pour les faibles valeurs de $n_{ph} \leq 6.10^{13}$ bactéries.m^{-3}. Plus le taux est grand, moins la concentration moyenne en bactéries est grande. Ceci indique que les bactéries se divisent moins avant que le biofilm ne se forme.

4.3.3 Scénarios de transition

Grâce au diagramme que nous avons présenté précédemment, nous avons pu identifier trois régimes pour lesquels la structure des biofilms est différente. Ces régimes dépendent essentiellement de la valeur de n_{ph}. Nous allons

maintenant voir la dynamique de formation du biofilm dans ces trois régimes. Nous présentons ici les scénarios de la dynamique pour les couples de valeurs ($n_{ph} = 4.10^{13}$, $\gamma = 4$) dans le premier régime, ($n_{ph} = 2.10^{14}$, $\gamma = 2$) dans le second, et ($n_{ph} = 6.10^{14}$ $\gamma = 4$) pour le troisième. De plus, nous comparerons dans chaque scénario la dynamique avec et sans convection dans le fluide pour voir quels en sont les effets.

4.3.3.1 Transition pour $n_{ph} = 4.10^{13}$ et $\gamma = 4$

Nous nous plaçons d'abord dans le cas où le seuil de concentration est faible, $n_{ph} = 4.10^{13}$. Observons d'abord le scénario sans bioconvection de la figure 4.13. Nous voyons que le biofilm commence à se former vers 3h20 après l'instant initial de la simulation. A partir de là, des morceaux de biofilm non connectés se forment sur l'interface eau-air. Ces morceaux poussent ensuite comme des stalactites en direction du fond de la boîte. Peu après (1h), nous voyons également apparaitre des morceaux de biofilm dans le volume de la culture. Ces morceaux grossissent, eux, avec le temps et prennent une forme plus ou moins circulaire. 2 h après le début de la formation du biofilm, on distingue beaucoup moins de bactéries motiles (points rouges) dans le volume. Il y a deux raisons à cela, soit elles ont transité vers l'état producteur de matrice, soit elles se sont attachées aux morceaux de biofilm.

Nous observons que la concentration en dioxygène diminue au cours du temps dans le volume. Un gradient de dioxygène se forme sous la surface et devient de plus en plus fort au fur et à mesure que le temps avance. 5h30 après l'instant initial de la simulation, la concentration en dioxygène dans le milieu est nulle au fond de la boite. Cela explique également qu'il y ait moins de bactéries dans le volume, car il n'y a plus assez de dioxygène pour qu'elles se divisent.

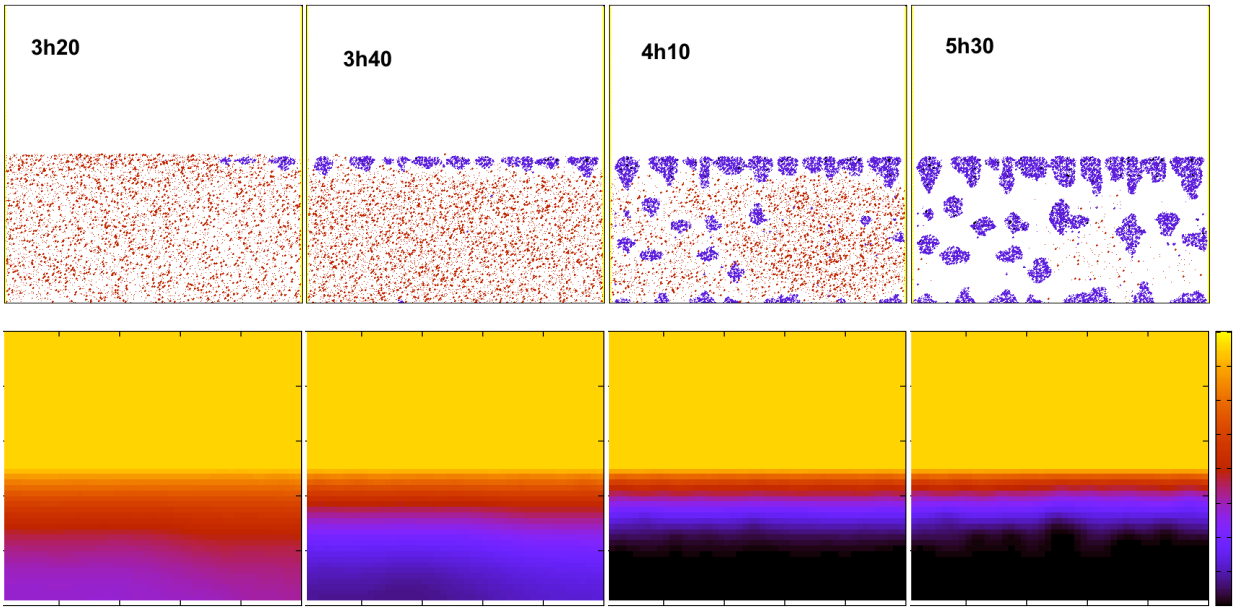


FIGURE 4.13 – Scénario d'un faible seuil $n_{ph} = 4.10^{13}$ et $\gamma = 4$ sans bioconvection. Le système 2D à une largeur et une hauteur de 1 cm. Le code couleur est le suivant rouge pour les bactéries motiles, violet pour les bactéries productrices de biofilm qui ont moins de deux liens avec leur voisines, noir pour les bactéries productrices de biofilm qui ont au moins deux liens avec leur voisines. La seconde ligne de la figure représente la concentration dans le milieu en échelle de couleur. L'échelle va de 0 à $1,5.10^{23}$ molécules.m^{-3}. Chaque image de la même colonne correspond au même temps de simulation. Nous indiquons le temps dans la première ligne de la colonne .

Observons maintenant le scénario avec bioconvection sur la figure 4.14. Les premiers morceaux de biofilm se forment également vers 3h20 au niveau de l'interface eau-air. Cependant on voit à 3h50 que des bactéries dans les morceaux à la surface se sont connectées entre elles. Le fluide qui remonte vers la surface compresse les morceaux qui se trouvent sur l'interface, ce qui les lie les uns avec les autres.

Comme dans le cas sans bioconvection, la concentration de bactéries motiles à 5h40 est faible.

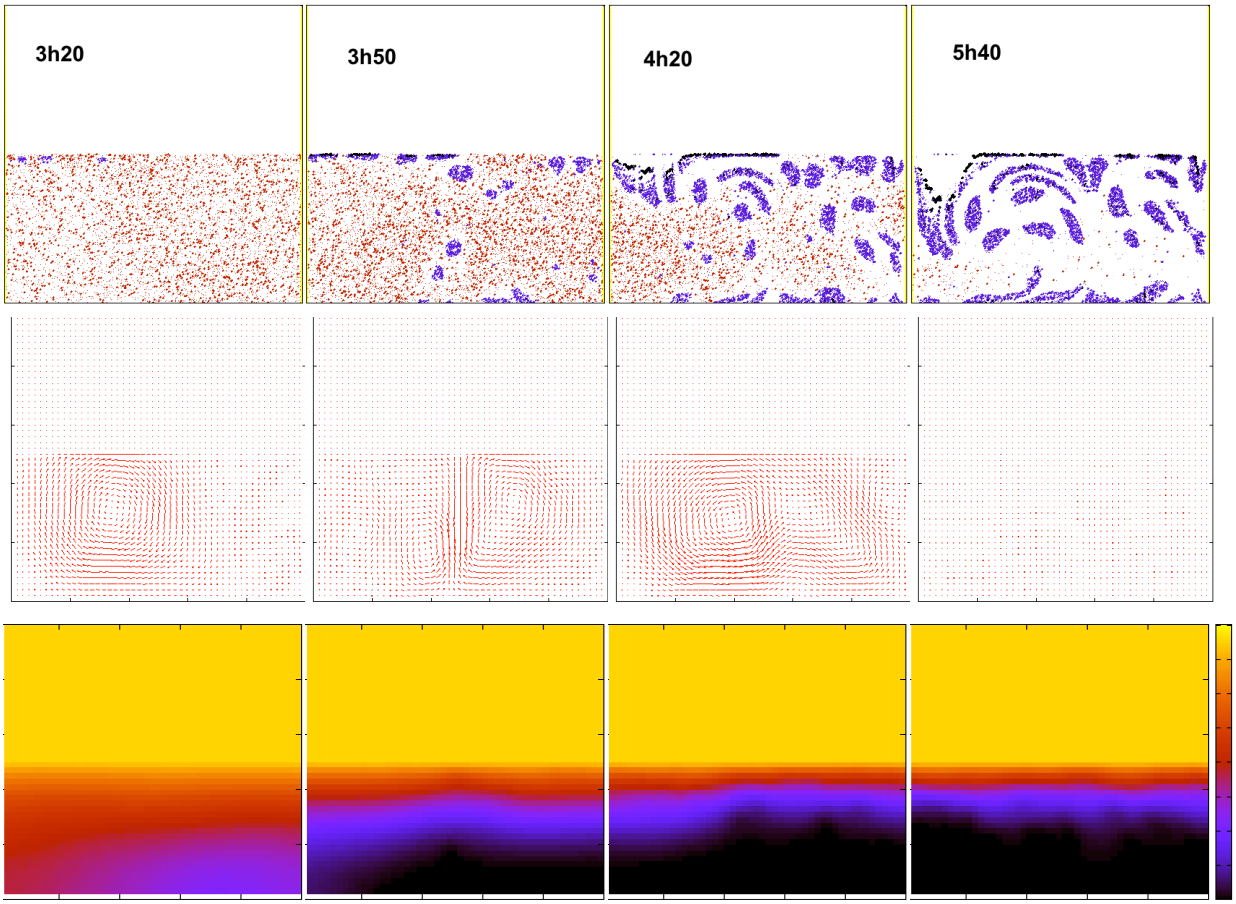


FIGURE 4.14 – Scénario d'un seuil faible $n_{ph} = 4.10^{13}$ et $\gamma = 4$ avec bioconvection. Le système 2D a une largeur et une hauteur de 1 cm. Le code couleur est le même que dans la figure 4.13. La seconde ligne représente le champ de vitesse du fluide. La troisième ligne représente le concentration dans le milieu avec la même échelle de couleur que dans la figure 4.13.

Les mouvements du fluide sont visibles au début de la formation du biofilm. La vitesse maximale peut atteindre un ou deux micromètres par seconde vers 4h après le début de la simulation. En revanche à 5h40, la vitesse du fluide est pratiquement nulle partout. Elle diminue car les bactéries dans l'état productrice de matrice sont aussi denses que l'eau. La bioconvection n'est donc plus activée quand la plupart des bactéries sont dans ce phénotype.

Sur la concentration en dioxygène, la bioconvection crée quelques inho-

mogénéités dans le milieu au début de la formation du gradient. Cependant, lorsque la convection s'arrête (à 5h40), la répartition de la concentration en dioxygène dans le volume redevient semblable à celle du cas sans bioconvection.

Pour conclure à faible seuil le biofilm se forme par morceaux d'abord sur la surface puis dans le volume. La bioconvection génère des contraintes sur les morceaux, ce qui provoque la connexion des bactéries entre elles à la surface et leur étirement dans le volume. Rapidement (2h) après le début de la formation du biofilm le milieu ne contient pratiquement plus de bactéries motiles. Après la formation du biofilm, la bioconvection s'arrête.

4.3.3.2 Transition pour $n_{ph} = 2.10^{14}$ et $\gamma = 2$

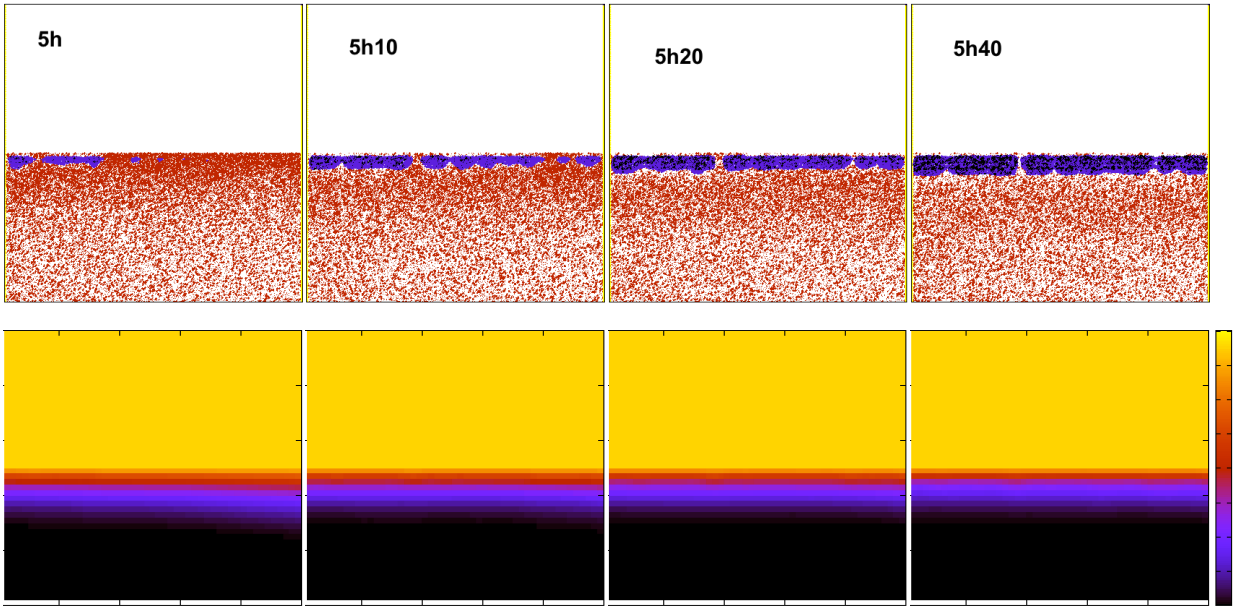


FIGURE 4.15 – Scénario d'un seuil intermédiaire $n_{ph} = 2.10^{14}$ et $\gamma = 2$ sans bioconvection. Se référer à la légende de la figure 4.13.

Nous avons ensuite étudié le cas d'un seuil de transition intermédiaire $n_{ph} = 2.10^{14}$. Dans le cas sans bioconvection (figure 4.15), nous observons les premiers morceaux de biofilm à la surface 5h après l'instant initial de la simulation. Rapidement, en moins de 1h, d'autres morceaux de biofilm

apparaissent sur la surface et se connectent entre eux pour former une couche quasi homogène. Les bactéries dans cette couche ne sont pour la plupart pas connectées entre elles. La concentration en dioxygène est déjà dans un état stationnaire au moment où le biofilm se forme.

Dans le cas avec bioconvection, le scénario est grandement différent (figure 4.16). Le biofilm commence à se former sur un bord de la boîte à l'interface eau-air. Le morceau qui apparait est principalement composé de bactéries connectées entre elles (noirs). Par la suite, en quelques heures, le biofilm se propage depuis le bords comme une trainée de poudre. La couche qui se forme est constituée de bactéries connectées entre elles. A certains moments nous distinguons des filaments sous le biofilm (comme à 6h10) qui sont par la suite rabattus par le convection sur le biofilm en surface.

La couche de biofilm à la surface est peu épaisse au départ, mais elle croît ensuite avec le temps. Elle est constituée majoritairement de bactéries connectées (noirs). Lorsque le biofilm à envahi toute la surface nous voyons apparaitre une autre couche de bactéries non connectées (violettes) sous la couche noire de biofilm.

La formation du biofilm sur la surface est accompagnée par de la convection dans le fluide. La vitesse maximale observée est de $7\,\mu\text{m.s}^{-1}$, vers 6h40. On voit plusieurs rouleaux se former dans le fluide qui disparaissent peu à peu à mesure que le biofilm se forme. Lorsque le biofilm se propage sur la surface, on distingue essentiellement un seul rouleau qui entraine le fluide à la surface dans le même sens que la propagation du biofilm. La bioconvection participe à l'étalement du biofilm.

La concentration en dioxygène présente de larges inhomogénéités au moment ou le biofilm se forme (5h10). Il y a un fort gradient modulé selon la direction horizontale. La concentration en dioxygène est plus forte dans les zones où le fluide descend vers le bas. Néanmoins, lorsque la bioconvection s'arrête, elle atteint une répartition stationnaire. Nous distinguons alors un gradient sous la surface qui s'étale sur quelque millimètres de profondeur et une concentration nulle dans le reste de la boite.

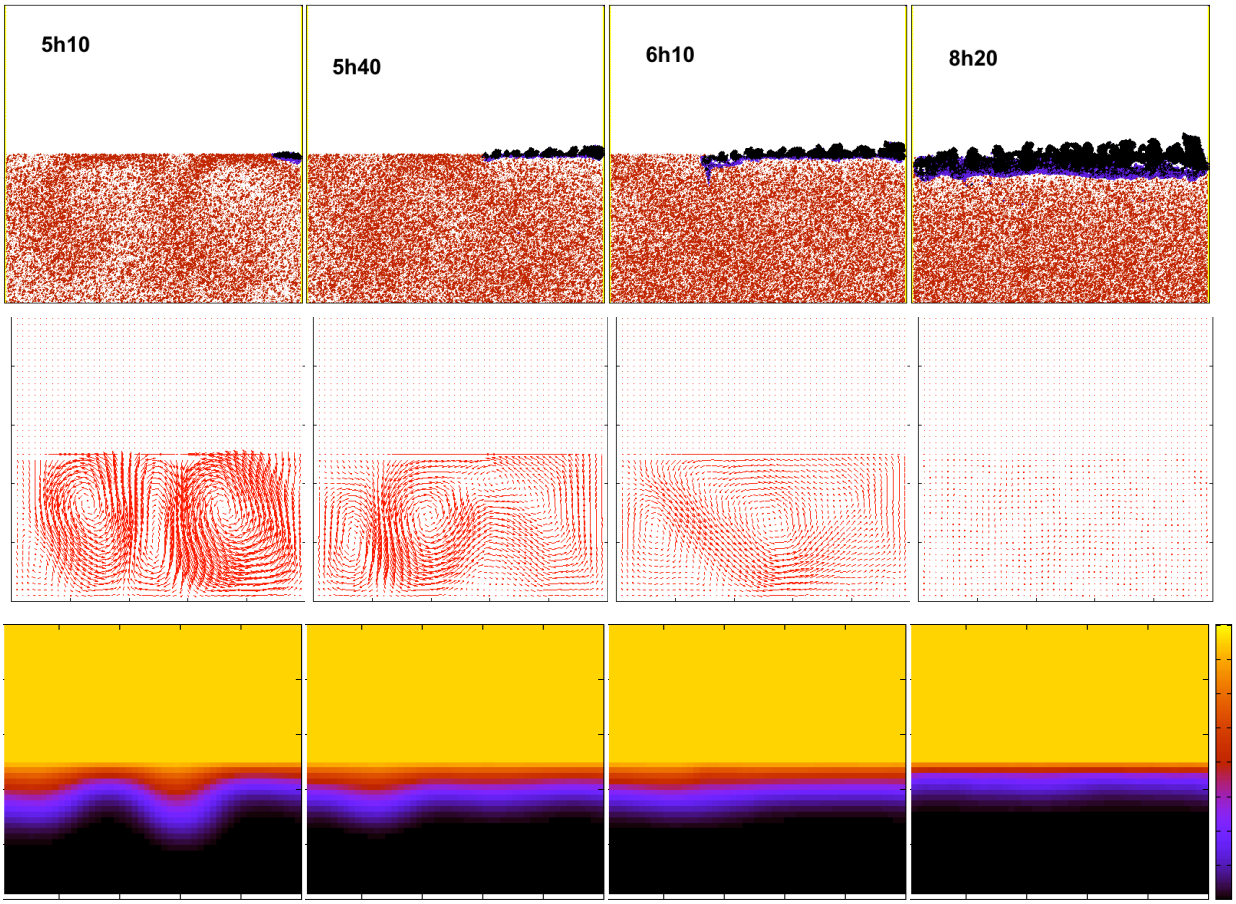


FIGURE 4.16 – Scénario d'un seuil intermédiaire $n_{ph} = 2.10^{14}$ et $\gamma = 2$ avec bioconvection. Se référer à la légende de la figure 4.13.

Pour conclure, la bioconvection semble ralentir la formation du biofilm et empêcher une couche lisse de se former à la surface. Cependant, la convection promeut plutôt la formation d'un biofilm rugueux. Le biofilm croît en s'étalant sur la boîte à partir d'un bord. De plus, la structure interne du biofilm est beaucoup plus connectée (bactéries noires) avec bioconvection que sans. Enfin, la convection influence la concentration en dioxygène. Elle est capable de moduler le gradient de dioxygène sur plusieurs millimètres.

4.3.3.3 Transition pour $n_{ph} = 6.10^{14}$ et $\gamma = 4$

Dans le cas d'un haut seuil de transition ($n_{ph} = 6.10^{14}$ et $\gamma = 4$), et sans prendre en compte la bioconvection, la formation d'un biofilm (figure 4.17) est la même que dans le cas intermédiaire. Nous notons toutefois que le biofilm apparait plus tard et que la couche qui se forme est essentiellement constituée de bactéries connectées. Le dioxygène du milieu atteint rapidement une répartition stationnaire (6h après l'instant initial de la simulation) avec un fort gradient sous la surface.

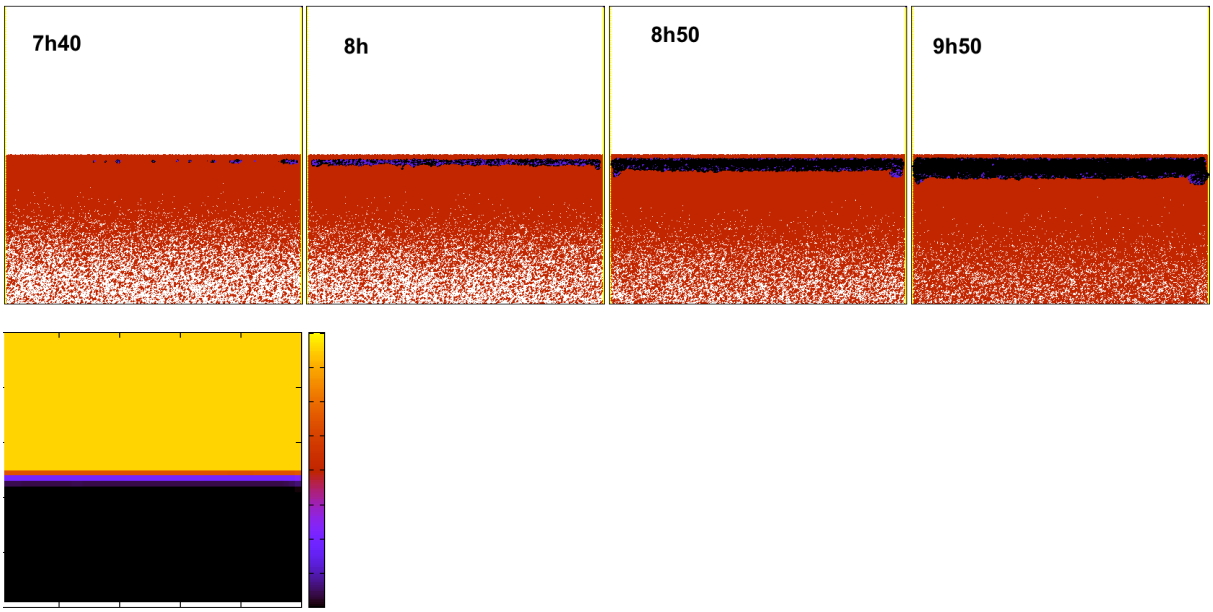


FIGURE 4.17 – Scénario haut seuil de transition $n_{ph} = 6.10^{14}$ et $\gamma = 4$ sans bioconvection. La deuxième ligne montre la répartition de la concentration en dioxygène dans le milieu. Nous ne présentons qu'une seule image car la répartition est déjà dans un état stationnaire (partir de 6h).

Dans le cas avec bioconvection (figure 4.18), nous observons vers 11h de gros morceaux de biofilm constitués de bactéries connectées. Ces morceaux surnagent au dessus du liquide. Avec le temps, ils grossissent sans s'étaler sur la surface. Nous ne montrons pas les images redondantes.

Comme dans le cas sans bioconvection, la concentration en dioxygène, elle, s'épuise 6h après le début de la simulation. Cependant on voit que la

bioconvection parvient à apporter du dioxygène sur un millimètre sous la surface.

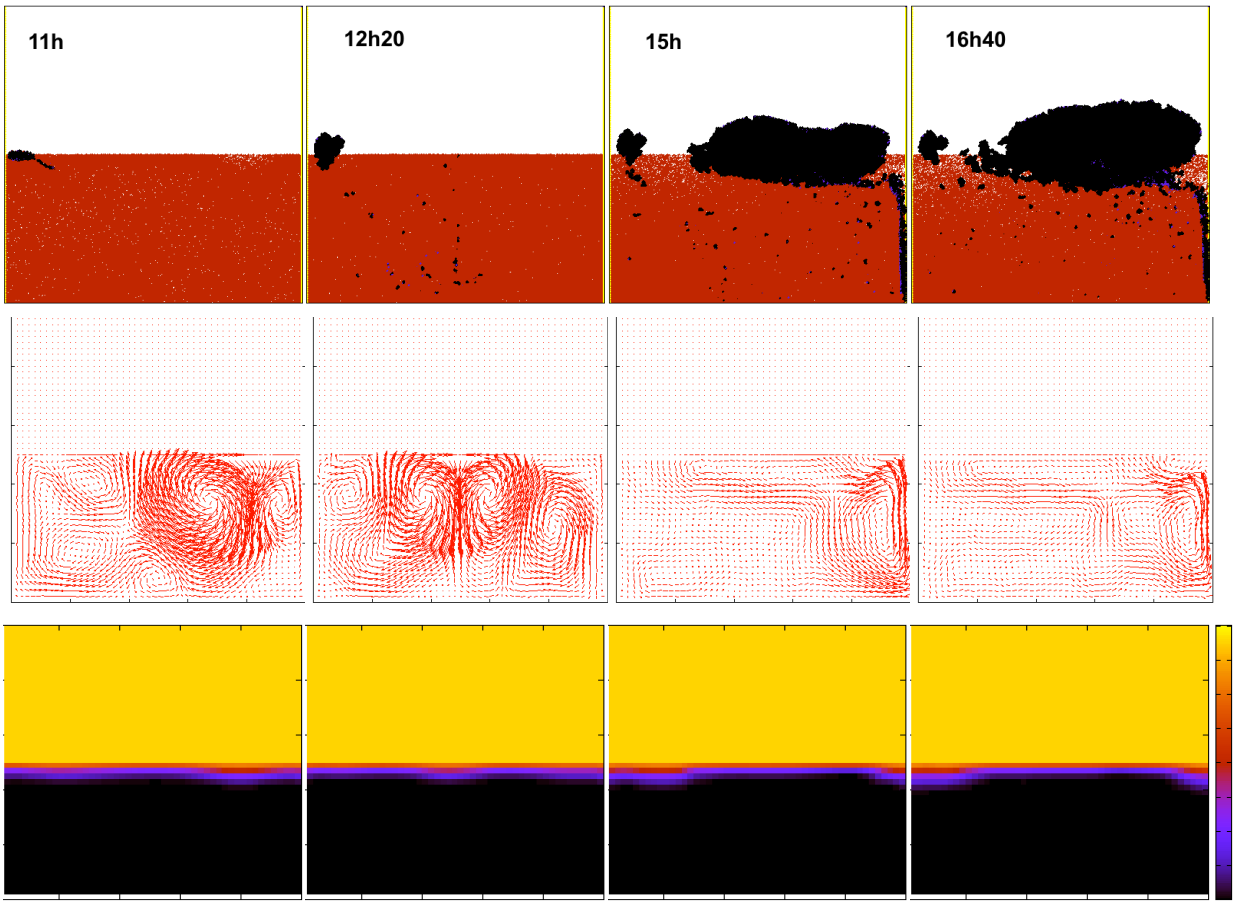


FIGURE 4.18 – Scénario haut seuil de transition $n_{ph} = 6.10^{14}$ et $\gamma = 4$ avec bioconvection

On observe beaucoup de rouleaux de convection dans la boîte. La vitesse maximale que l'on enregistre est 9 μm.s^{-1}. Contrairement au cas des seuils faibles et intermédiaires, la bioconvection ne s'arrête pas quand les morceaux de biofilm se sont formés à la surface. Cela causé par les bactéries qui transitent vers l'état producteur de matrice sur le bord droit de la boite. En effet, comme elles sont moins denses que les autres bactéries, elles créent une zone plus légère au fond de la boîte ce qui active la convection du fluide et génère un courant vers le haut.

En conclusion, la dynamique de formation du biofilm dans ce régime n'est pas du tout réaliste. Les morceaux que l'on voit se former et la persistance de la convection ne ressemble en rien à ce qui est observé dans les expériences.

4.3.3.4 Conclusion

Le taux de consommation de dioxygène se révèle être un paramètre qui influence peu le système. Nous n'observons pas de changement drastique dans la formation d'un biofilm si il est modifié de quelques unités.

En revanche, le seuil de concentration qui détermine la transition entre l'état motile et l'état producteur de matrice a beaucoup d'effet sur le comportement du système. Ce paramètre contrôle le temps que le biofilm met pour apparaitre. De manière corrélée il contrôle aussi la concentration moyenne en bactéries à laquelle le biofilm se forme car, plus le temps passe avant que le biofilm ne se forme, plus la concentration moyenne en bactéries augmente. Sur ce point nous avons remarqué que les simulations ne correspondent pas aux observations expérimentales. La valeur de n_{ph} qui reproduit la concentration correcte en bactéries dans le volume quand le biofilm apparait est hors de la gamme de n_{ph} qui reproduit le temps correct d'apparition. La valeur du temps de division des bactéries doit influencer également ces observations. Ici nous avons choisi un temps de division de $\tau_d = 50$ min ce qui est assez rapide dans les conditions de la formation d'un biofilm. On pourrait envisager une étude de ce paramètre pour voir concrètement son effet.

n_{ph} contrôle également la morphologie et la structure interne du biofilm. Nous avons observé que plus n_{ph} est élevé plus le biofilm est rugueux et constitué de bactéries connectées entre elles.

L'étude de la bioconvection a révélé que ce phénomène joue également un rôle dans la morphologie du biofilm. Dans notre modèle, le fluide est capable d'exercer des contraintes sur les morceaux de biofilm ce qui le déforme et éventuellement connecte les morceaux les uns aux autres. Dans le cas où le seuil de transition a une valeur intermédiaire, la convection semble jouer un rôle dans l'étalement du biofilm sur la surface du liquide. Après l'apparition du biofilm, la bioconvection ne persiste pas. En effet, puisque les particules productrices de matrice ont la même densité que l'eau, il n'y a plus de stratification hydrodynamique instable possible.

Chapitre 5

Conclusion

Ce travail s'est intéressé aux mécanismes de formation d'un biofilm par *Bacillus subtilis*. Nous avons choisi d'utiliser une approche biophysique qui vise à identifier et comprendre les interactions intervenant dans ce processus biologique. Notre approche s'inscrit dans la philosophie de la physique statistique, qui cherche à expliquer les phénomènes macroscopiques par des interactions entre des acteurs microscopiques. Au cours de cette thèse, nous avons pris soin de combiner un travail expérimental et théorique. Le but de nos efforts était d'identifier le nombre minimal d'interactions qui permettent de reproduire les expériences par des modèles théoriques.

Il est bien connu que BS forme des biofilms à l'interface eau-air. Cependant, nous avons montré que différents processus interviennent au coeur même du milieu de culture, avant la formation du biofilm à proprement parler. Nous avons suivi expérimentalement l'évolution de la répartition des bactéries dans le volume du milieu au cours de la formation d'un biofilm. Nous sommes parvenus à reproduire les observations grâce à un modèle de type Keller-Segel qui prend en compte le couplage de la concentration en bactéries, la concentration en dioxygène et le champ de vitesse de fluide dans l'évolution du système. La résolution numérique de ce modèle nous a notamment permis de reproduire le phénomène de bioconvection observé dans les expériences, et d'obtenir l'évolution supposée de la répartition du dioxygène dans le milieu. Il serait bien évidemment intéressant de faire la mesure concrète de la répartition du dioxygène dans le milieu, à l'aide par exemple de micro-sonde. Cela permettrait de valider ce modèle ainsi que la valeur des paramètres utilisés.

Le modèle d'équations continues permet de décrire aisément l'évolution

de champ de concentration, mais permet difficilement de décrire une transition entre des bactéries nageuses (motiles) et des bactéries dans un biofilm (productrices de matrice). Pour simuler cette transition commodément nous avons développé un modèle hybride qui décrit les bactéries comme des particules individuelles évoluant dans un environnement décrit par des champs continus. Chaque particule mime le comportement aérotactique d'une bactérie réelle et son changement de phénotype. Ce modèle a permis de reproduire la dynamique de formation d'un biofilm à l'interface eau-air. Grâce à lui nous avons pu mener une étude paramétrique du modèle. Nous avons notamment pu observer que le seuil qui gouverne la transition de l'état motile à l'état producteur de matrice de BS joue un grand rôle dans la dynamique de formation, mais aussi sur la morphologie du biofilm. Nous avons également observé que la bioconvection a un effet de ralentisseur sur la formation d'un biofilm, mais qu'elle favorise une structure hétérogène similaire à celles que nous voyons dans les expériences. De plus, nous avons observé que la consommation du dioxygène dans le milieu de culture ne semble pas influencer significativement la formation du biofilm. Les résultats de ce modèle soulèvent alors de nombreuses questions.

D'abord, puisque la transition phénotypique des bactéries semble contrôler la dynamique de formation du biofilm, il serait intéressant d'avoir plus d'informations sur ce point venant des expériences. On pourrait essayer de suivre la concentration de bactéries dans l'état motile et dans l'état producteur de matrice grâce à un dispositif à fluorescence, puisque les gènes concernés par ces phénotypes ont été marqués par des fluorophores [64]. On saurait alors à quel moment les premières bactéries productrices de matrice apparaissent dans le milieu de culture et comment leur proportion évolue au cours du processus de formation d'un biofilm. Toutefois, cette expérience serait un vrai défi technique, car l'observation résolue dans l'espace de quantités fluorescentes n'est pas facile avec un grand volume de liquide. De plus, le grand nombre de particules diffusantes dans le système complique la tâche.

Ensuite, le modèle montre que la consommation en dioxygène n'influence que très peu la dynamique du biofilm. Il pourrait être envisagé de vérifier cette prédiction théorique en faisant une expérience où la consommation du dioxygène serait contrôlée. Par exemple, des molécules photosensibles capables de diminuer la concentration en dioxygène dans le milieu pourraient être utilisées (comme les complexes de ruthénium). L'illumination du milieu de culture permettrait alors de contrôler la disparition du dioxygène et de voir quel est son effet sur la dynamique de formation du biofilm.

En outre, le modèle montre que la bioconvection joue un rôle important sur la structure du biofilm. Il serait intéressant de le vérifier expérimentalement. En augmentant un peu la masse volumique du milieu de culture pour qu'elle soit égale à celle des bactéries, la bioconvection serait bloquée. Quelle serait alors la structure du biofilm ?

Nous pouvons envisager de nombreuses améliorations du modèle afin de le rendre plus réaliste. Le désavantage est qu'il deviendrait aussi plus complexe. L'objectif serait de prendre en compte d'autress processus qui sont susceptibles d'influencer la structure du biofilm. Une première idée serait de décrire l'environnement à une échelle plus petite que les bactéries, notamment le fluide. On pourrait prendre en compte les forces de frottement que le biofilm applique sur le fluide, ou encore les forces générées par les flagelles des bactéries qui sont connues pour être capable de mélanger le fluide [21]. Quelle serait alors l'influence de ces phénomènes sur la structure du biofilm ? Nous n'avons pas privilégié cette approche car une description aussi fine du fluide nécessiterait de travailler uniquement sur une partie du système pour avoir un temps de simulation raisonnable (comme dans les travaux de [121, 120, 79, 83, 80, 81]) .

Une seconde idée serait de simuler le système à trois dimensions. Cela permettrait de pouvoir décrire des phases de biofilm bicontinues comme dans les expériences. Pour pouvoir simuler le modèle à la même échelle, il faudrait sûrement paralléliser le calcul dans les simulations et utiliser des algorithmes de dynamique moléculaire plus efficaces. Ceci pourrait être une perspective de travail et un investissement conséquent dans le temps. Un autre avantage à la parallélisation serait de pouvoir utiliser des forces inter-bactéries de même amplitude que les forces réelles. L'étude pourrait porter sur l'aspect visco-élastique du biofilm qui se forme à la surface de l'eau et la reproduction des rides observées dans les expériences [107].

Il serait également intéressant de prendre en compte la morphologie réelle des bactéries. Bien que nous pensons que cela ne changerait rien à la dynamique de formation d'un biofilm, cela changera certainement la structure interne du biofilm à l'échelle de la pellicule.

Enfin, tout un large pan du système a été exclu dans ce travail. Il s'agit de l'interaction entre l'interface liquide est les bactéries. De nombreuses questions restent en suspens tant sur le plan expérimental que théorique. En voici quelques exemples : comment les bactéries se comportent-elles à la surface ? Y adhèrent-elles ? Sont-elles soumises à des forces de mouillage ? Une bactérie est-elle hydrophobe ou hydrophile ? Quel est l'effet des tensio-actifs qu'elles

produisent [4] sur la dynamique de formation du biofilm ? Comment le biofilm interagit-il avec la surface liquide ? Comment peut-on modéliser cette surface libre qui doit sûrement être déformée par la présence du biofilm ? Il est clair que le sujet des biofilms aux interfaces fluide-air est loin d'être épuisé.

Chapitre 6

Annexe

6.1 Milieu de culture LB LBbiofilm

Tous les milieux pour la croissance des bactéries sont préparés dans des conditions stériles. Le milieu liquide Luria Broth (LB) est fait de la manière suivante pour 1 litre de milieu : 10 g de Tryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g de NaCl, dissout dans 1 litre d'eau ultra-pure Milli-Q ©. Le LB est autoclavé.

Le milieu LB-agar est fait de la même manière que le LB avec en plus $15\,\mathrm{g} \cdot \mathrm{l}^{-1}$ de poudre d'agar. Lorsqu'il est encore tiède, le milieu LB-agar est versé dans des boîtes de petri stériles. On attend ensuite quelques heures pour que le gel prenne et que l'humidité dans les boîtes diminue. Finalement, les boîtes sont scellées avec du parafilm et entreposées au réfrigérateur à 4 -5ºC.

Le milieu pour la formation de biofilm (LBbiofilm) est à base de Luria Broth (LB) complété par 3% (en volume) de glycérol filtré sur membrane $0,22\,\mu$m et de 0,1 mM de $MnCl_2$ filtré aussi.

Dans le cas où on ajoute des antibiotiques dans les milieux de culture, ceux-ci sont filtrés et ajoutés dans le milieu après son autoclavage.

6.2 Différence finie et schéma d'Euler explicite

Le segment 1D que nous voulons simuler est découpé en N_y petits éléments de taille dy. Dans chaque élément, nous définissons une valeur de n et de c. L'élément k est représenté dans l'ordinateur par un point au centre de

l'élément dy situé à la position $k \times dy$. Les nouvelles valeurs de n et c pour tous les points le long de la ligne sont calculées à chaque pas de temps dt.

L'algorithme utilisé pour calculer les équations est le suivant : à chaque pas de temps est calculé d'abord les flux, puis, les concentrations. Nous utilisons pour les dérivées temporelles la méthode des temps avançant à espace centré (*forward Time Centered Space* ou FTCS) [125]. Elle utilise la valeur des points adjacents $k+1$ et $k-1$ au pas de temps t pour calculer la valeur du point k au pas de temps $t+dt$. Le calcul d'une dérivée temporelle suit donc un schéma d'Euler « avançant » (forward) et explicite, précis à l'ordre un :

$$\frac{\partial u}{\partial t} = \frac{u^{t+dt} - u^t}{dt} + \mathcal{O}(dt)\,.$$

6.3 Critère de stabilité des simulations FTCS

Si on suppose que les solutions d'une équation de diffusion peuvent être décomposées en une partie spatiale et une partie temporelle les solutions pour un espace borné peuvent être cherchées de la forme [125] :

$$u_j^\tau = \xi(k)^\tau e^{ikdyj}\,.$$

où k est le vecteur d'onde, i le nombre imaginaire ($i^2 = -1$), j est l'index de la case que l'on considère le long de la ligne ($y = jdy$), τ est le nombre de pas de temps dt réalisé depuis le début de la simulation. On voit que ce type de solution impose que le module du nombre complexe $|\xi|$ doit être inférieur à un pour tout k, sinon il y a divergence avec le temps.

Les équations sur l'oxygène ou les bactéries sont basées sur une équation de diffusion. Si on injecte la solution u_j^τ dans une équation de diffusion (de coefficient D) on obtient :

$$\frac{u_j^{\tau+1} - u_j^\tau}{dt} = \frac{D}{dy^2}\left(u_{j+1}^\tau + u_{j-1}^\tau - 2u_j^\tau\right)$$

et on trouve que

$$\xi(k) = 1 - \frac{4Ddt}{dy^2} sin^2\left(\frac{kdy}{2}\right)\,.$$

Pour garder $|\xi| < 1$ on doit choisir

$$dt < \frac{dy^2}{2D}\,. \tag{6.1}$$

6.4 Transformation équation de NS en terme de vorticité

Pour transformer l'équation :

$$\frac{\partial \overrightarrow{u}}{\partial t} + \left(\overrightarrow{u}.\overrightarrow{\nabla}\right)\overrightarrow{u} = \nu\Delta\overrightarrow{u} - \frac{\overrightarrow{\nabla}P}{\rho} + \frac{\rho_n - \rho}{\rho}V_n n\overrightarrow{g}\,.$$

en terme de vorticité on prend le rotationnel de l'équation de NS. Soit

$$\overrightarrow{\nabla} \times \left(\frac{\partial \overrightarrow{u}}{\partial t} + \left(\overrightarrow{u}.\overrightarrow{\nabla}\right)\overrightarrow{u} = \nu\Delta\overrightarrow{u} - \frac{\overrightarrow{\nabla}P}{\rho} + \frac{\rho_n - \rho}{\rho}V_n n\overrightarrow{g}\right)\,.$$

Nous allons traiter chaque terme de l'équation un a un pour voir quel est leur contribution à la vorticité. Pour le premier terme de gauche, on à par interversion des dérivées temporelles et spatiales :

$$\overrightarrow{\nabla} \times \frac{\partial \overrightarrow{u}}{\partial t} = \frac{\partial \overrightarrow{\nabla} \times \overrightarrow{u}}{\partial t} = \frac{\partial \overrightarrow{\omega}}{\partial t}\,.$$

Pour le second il faut passer par la réécriture de l'opérateur $\left(\overrightarrow{u}.\overrightarrow{\nabla}\right)$:

$$\left(\overrightarrow{u}.\overrightarrow{\nabla}\right)\overrightarrow{u} = \overrightarrow{\nabla}\left(\frac{\overrightarrow{u}.\overrightarrow{u}}{2}\right) - \overrightarrow{u} \times \overrightarrow{\omega}\,.$$

En prenant le rotationnel de cette expression le terme provenant d'une divergence se simplifie et on obtient

$$\overrightarrow{\nabla}\times\left[\overrightarrow{\nabla}\left(\frac{\overrightarrow{u}.\overrightarrow{u}}{2}\right) - \overrightarrow{u} \times \overrightarrow{\omega}\right] = \overrightarrow{\nabla}\times[\overrightarrow{\omega} \times \overrightarrow{u}] = (\overrightarrow{u}.\overrightarrow{\nabla})\overrightarrow{\omega} - (\overrightarrow{\omega}.\overrightarrow{\nabla})\overrightarrow{u} + \overrightarrow{\omega}(\overrightarrow{\nabla}.\overrightarrow{u}) + \overrightarrow{u}(\overrightarrow{\nabla}.\overrightarrow{\omega})$$

sous couvert de la condition d'incompressibilité et avec $\overrightarrow{\nabla}.\overrightarrow{\omega} = 0$ on a

$$\overrightarrow{\nabla} \times \left(\overrightarrow{u}.\overrightarrow{\nabla}\right)\overrightarrow{u} = (\overrightarrow{u}.\overrightarrow{\nabla})\overrightarrow{\omega} - (\overrightarrow{\omega}.\overrightarrow{\nabla})\overrightarrow{u}\,.$$

Dans un cas bidimensionnel où la vitesse du fluide est dans le plan (Oxy) et la vorticité selon l'axe (Oz) ce terme se simplifie encore parce que :

$$(\overrightarrow{\omega}.\overrightarrow{\nabla})\overrightarrow{u} = \left(\omega_x\frac{\partial}{\partial x} + \omega_y\frac{\partial}{\partial y} + \omega_z\frac{\partial}{\partial z}\right)\overrightarrow{u} = \left(0 + 0 + \omega_z\frac{\partial}{\partial z}\right)\overrightarrow{u}(x,y) = \omega_z\frac{\partial \overrightarrow{u}(x,y)}{\partial z} = 0$$

donc

$$\vec{\nabla} \times \left(\vec{u}.\vec{\nabla}\right)\vec{u} = (\vec{u}.\vec{\nabla})\vec{\omega}\,.$$

Le premier terme dans la partie droite de l'équation donne :

$$\vec{\nabla} \times \Delta\vec{u} = \vec{\nabla} \times [\vec{\nabla}(\vec{\nabla}.\vec{u}) - \vec{\nabla} \times \vec{\omega}]$$

avec la condition d'incompressibilité

$$\vec{\nabla} \times \Delta\vec{u} = -\vec{\nabla} \times [\vec{\nabla} \times \vec{\omega}] = -\vec{\nabla}(\vec{\nabla}.\omega) + \Delta\vec{\omega}$$

par construction $\vec{\nabla}.\vec{\omega} = \vec{\nabla} \times (\vec{\nabla}.\vec{u}) = 0$ on a donc

$$\vec{\nabla} \times \Delta\vec{u} = \Delta\vec{\omega}\,.$$

Le deuxième terme, qui est associé à la pression, dérive d'une divergence donc de

$$\vec{\nabla} \times \vec{\nabla}P = 0\,.$$

Quand au terme de poussée d'Archimède différentiel en notant $\vec{e}_y$ vecteur unitaire de l'axe (Oy) on a que

$$\vec{\nabla} \times (n\vec{g}.\vec{e}_y) = \frac{\partial n\vec{g}.\vec{e}_y}{\partial z}\vec{e}_x - \frac{\partial n\vec{g}.\vec{e}_y}{\partial x}\vec{e}_z.$$

Au final on obtient pour l'équation en projection sur (Oz) :

$$\frac{\partial\omega}{\partial t} + \left(\vec{v}.\vec{\nabla}\right)\omega = \nu\Delta\omega + \frac{\rho_n - \rho}{\rho}V_n\frac{\partial n}{\partial x}\vec{g}.\vec{e}_y$$

6.5 Détail du calcul des champs de la section 3.2.3.1

Calcul de l'évolution de la concentration en dioxygène.

$$\begin{aligned} c[x,y,t+dt] &= c[x,y,t] - dt\left\{\frac{j_{xc}[x+\frac{dx}{2},y,t] - j_{xc}[x-\frac{dx}{2},y,t]}{dx}\right. \\ &\quad \left. + \frac{j_{yc}[x,y+\frac{dy}{2},t] - j_{yc}[x,y-\frac{dy}{2},t]}{dy} - \gamma n[x,y,t]\frac{c[x,y,t]}{c[x,y,t]+K}\right\}\,. \end{aligned}$$

On rajoute une condition dans les simulations sur la concentration en dioxygène. La consommation en dioxygène des bactéries peut être très grande (n peut être de l'ordre de 10^{14} bacteries.m^{-3}). Donc il peut arriver, lorsque la valeur de c est petite, que la valeur du terme $\gamma n[x,y,t]\frac{c[x,y,t]}{c[x,y,t]+K}dt$ soit plus grande que $c[x,y,t]$. Au pas de temps suivant la valeur de c sera donc négative. Pour éviter cette anomalie on pose que dans ce cas que $c[x,y,t+dt]=0$.

6.6 Détail du calcul des conditions aux bords de la vorticité section 3.2.3.1

La dérivée avale de la vitesse pour le calcul de $\omega[x=0,y,t]$ du mur de gauche donne :

$$\omega[x=0,y,t]=\frac{(4v_y[dx,y,t]-v_y[2dx,y,t])}{2dx}$$

la dérivée avale pour $\omega[x,y=0,t]$ du fond de la boîte donne :

$$\omega[x,y=0,t]=\frac{(-4v_y[x,dy,t]+v_y[x,2dy,t])}{2dy}$$

Pour le mur de droite on utilise un schéma de dérivation amont ce qui donne

$$\omega[x=L_x,y,t]=\frac{(-4v_y[L_x-dx,y,t]+v_y[L_x-2dx,y,t])}{2dx}\,.$$

A la surface libre (bord haut de la boîte) il n'y a pas de friction donc pas de vorticité

$$\omega[x,y=L_y,t]=0\,.$$

6.7 Optimisation du SOR

La technique SOR fait intervenir un paramètre de tolérance. Cette méthode a pour principe de calculer la solution de l'équation de Poisson (3.4) par itération. A chaque itération elle converge vers la solution. Entre chaque itération on peut mesurer la convergence vers cette solution en utilisant une

norme quelconque qui mesure l'écart entre deux solutions successives (autrement dit l'erreur). L'utilisateur arrête le processus quand il estime qu'il s'est suffisamment rapproché de la bonne solution, c'est à dire que l'écart entre deux solutions successives est suffisamment petit. Le paramètre de tolérance définit la précision et donc à quelle itération arrêter les calculs du SOR. Pour choisir ce paramètre on trace l'évolution de l'erreur en fonction du nombre d'itération. On voit que dans un cas typique où le fluide est en mouvement, l'erreur diminue rapidement sur 25 itérations de environ 2% à $0,2\%$ ensuite elle diminue beaucoup plus lentement. Pour éviter qu'à chaque pas de temps

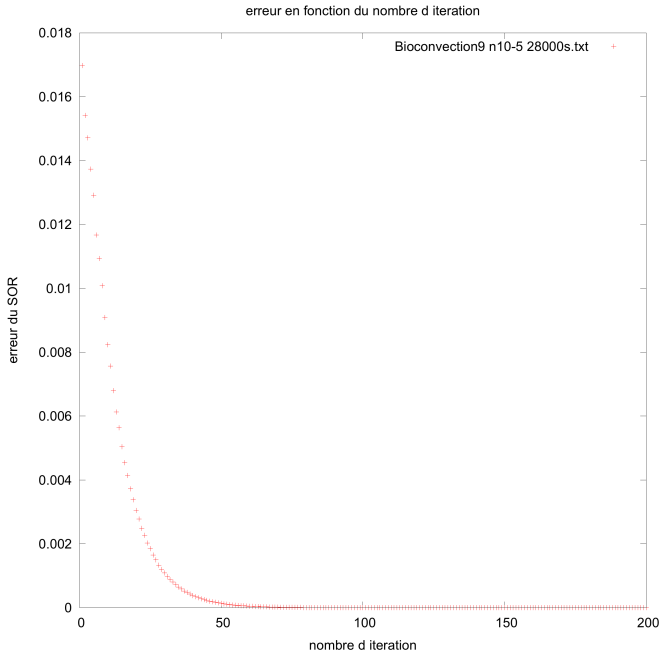


FIGURE 6.1 – Erreur du SOR en fonction du nombre d'itération pour le calcul de la solution de l'équation (3.4).

le calcul de la fonction courant (ψ) ne prenne trop de temps il faut limiter le nombre d'itération dans le SOR tout en gardant une bonne précision de la solution. Il semble que la valeur de $0,2\%$ soit un bon compromis car on obtient une bonne précision avec une vingtaine d'itérations.

Bibliographie

[1] Tjakko Abee, Akos T Kovács, Oscar P Kuipers, and Stijn van der Veen. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 22(2) :172–9, April 2011.

[2] Julius Adler. Chemotaxis in Bacteria Motile Escherichia coli migrate in bands that are. *Science*, 153 :708–715, 1966.

[3] U Alon, M G Surette, N Barkai, and S Leibler. Robustness in bacterial chemotaxis. *Nature*, 397(6715) :168–71, January 1999.

[4] Thomas E Angelini, Marcus Roper, Roberto Kolter, David A Weitz, and Michael P Brenner. Bacillus subtilis spreads by surfing on waves of surfactant. *PNAS*, 2009.

[5] Munehiro Asally, Mark Kittisopikul, Pau Rué, Yingjie Du, Zhenxing Hu, Tolga Cagatay, Andra B Robinson, Hongbing Lu, Jordi Garcia-Ojalvo, and Gürol M Süel. Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(46) :18891–6, November 2012.

[6] Bonnie L. Bassler and Richard Losick. Bacterially speaking. *Cell*, 125(2) :237–46, April 2006.

[7] Eshel Ben-jacob, Ofer Schochet, Adam Tenenbaum, Inon Cohen, Andras Czirok, and Tamas Vicsek. Generic modelling of cooperative growth patterns in bacterial colonies. *Nature*, 368 :46, 1994.

[8] Howard C. Berg. *Random walks in biology.*

[9] Rodney D. Berg. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in microbiology*, 4(1994), 1996.

[10] Terran E Bergdale, Rebecca J Pinkelman, Stephen R Hughes, Barbara Zambelli, Stefano Ciurli, and Sookie S Bang. Engineered biosealant

strains producing inorganic and organic biopolymers. *Journal of Biotechnology*, 161(3) :181–189, 2012.

[11] V. Berk, J. C. N. Fong, G. T. Dempsey, O. N. Develioglu, X. Zhuang, J. Liphardt, F. H. Yildiz, and S. Chu. Molecular Architecture and Assembly Principles of Vibrio cholerae Biofilms. *Science*, 337(6091) :236–239, July 2012.

[12] Steven S Branda, Frances Chu, Daniel B Kearns, Richard Losick, and Roberto Kolter. A major protein component of the Bacillus subtilis biofilm matrix. *Molecular microbiology*, 59(4) :1229–38, February 2006.

[13] Steven S Branda, Shild Vik, Lisa Friedman, and Roberto Kolter. Biofilms : the matrix revisited. *Trends in microbiology*, 13(1) :20–6, January 2005.

[14] Dennis Bray. Bacterial chemotaxis and the question of gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1) :7–9, January 2002.

[15] Arnaud Bridier, Dominique Le Coq, Florence Dubois-Brissonnet, Vincent Thomas, Stéphane Aymerich, and Romain Briandet. The spatial architecture of Bacillus subtilis biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. *PloS one*, 6(1) :e16177, 2011.

[16] Elena O. Budrene and Howard C. Berg. Complex patterns formed by motile cells of E coli. *Group*, 1991.

[17] Elena O. Budrene and Howard C. Berg. Dynamics of formation of symmetrical patterns by chemotactic bacteria. *Nature*, 376(6535) :49–53, July 1995.

[18] Andrew Camilli and Bonnie L. Bassler. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science*, 311(5764) :1113–1116, 2009.

[19] Yunrong Chai, Frances Chu, Roberto Kolter, and Richard Losick. Bistability and biofilm formation in Bacillus subtilis. *Molecular microbiology*, 67(2) :254–63, January 2008.

[20] Xiao Chen, Xu Dong, Avraham Be'er, Harry Swinney, and H Zhang. Scale-Invariant Correlations in Dynamic Bacterial Clusters. *Physical Review Letters*, 108(14) :1–5, 2012.

[21] Luis H. Cisneros, Ricardo Cortez, Christopher Dombrowski, Raymond E. Goldstein, and John O. Kessler. Fluid dynamics of self-propelled microorganisms, from individuals to concentrated populations. *Experiments in Fluids*, 43(5) :737–753, October 2007.

[22] Luis H. Cisneros, Raymond E. Goldstein, and Alex Cronin. *The organized melee emergence of collective behavior in concentrated suspensions of swimming bacteria and associated in the graduate college for the degree of doctor of philosophy.* PhD thesis, The university of arizona, 2008.

[23] Gerard Clarke, Roman M Stilling, Paul J Kennedy, Catherine Stanton, John F Cryan, and Timothy G Dinan. Gut Microbiota : The Neglected Endocrine Organ. *Molecular Endocrinology*, 2014.

[24] P. Cluzel. An Ultrasensitive Bacterial Motor Revealed by Monitoring Signaling Proteins in Single Cells. *Science*, 287(5458) :1652–1655, March 2000.

[25] J. William Costerton, K J Cheng, G G Geesey, T I Ladd, J C Nickel, M Dasgupta, and T J Marrie. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of microbiology*, 41 :435–464, 1987.

[26] J. William Costerton, Zbigniew Lewandowski, Douglas E Caldwell, Darren R Korber, and Hilary M Lappin-scott. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995.

[27] J. William Costerton, Philip S Stewart, and E P Greenberg. Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418) :1318–22, May 1999.

[28] András Czirók, Imre M Jánosi, and John O. Kessler. BIOCONVECTIVE DYNAMICS : DEPENDENCE ON ORGANISM BEHAVIOUR. *journal of experimental biology*, 3354 :3345–3354, 2000.

[29] Carla C C R de Carvalho. Biofilms : recent developments on an old battle. *Recent patents on biotechnology*, 1(1) :49–57, January 2007.

[30] Iztok Dogsa, Mojca Brloznik, David Stopar, and Ines Mandic-Mulec. Exopolymer diversity and the role of levan in Bacillus subtilis biofilms. *PloS one*, 8(4) :e62044, January 2013.

[31] Christopher Dombrowski, Luis H. Cisneros, Sunita Chatkaew, Raymond E. Goldstein, and John O. Kessler. Self-Concentration and Large-Scale Coherence in Bacterial Dynamics. *Physical Review Letters*, 93(9) :2–5, August 2004.

[32] W Ford Doolittle. Uprooting the tree of life. *Scientific American*, 282(2) :90–95, 2000.

[33] Carine Douarche, Axel Buguin, Hanna Salman, and Albert Libchaber. E. Coli and Oxygen : A Motility Transition. *Physical Review Letters*, 102(19) :2–5, 2009.

[34] Knut Drescher, Jörn Dunkel, Luis H. Cisneros, Sujoy Ganguly, and Raymond E. Goldstein. Fluid dynamics and noise in bacterial cell-cell and cell-surface scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(27) :10940–5, July 2011.

[35] Zhuwei Du, Haoran Li, and Tingyue Gu. A state of the art review on microbial fuel cells : A promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnology Advances*, 25(5) :464–482, September 2007.

[36] David Dubnau and Richard Losick. MicroReview Bistability in bacteria. *Molecular Microbiology (2006)*, 61(June) :564–572, 2006.

[37] R Edgeworth, B J Dalton, and T Parnell. The pitch drop experiment. *European Journal of Physics*, 5(4) :198–200, October 1984.

[38] Hans-Curt Flemming and Jost Wingender. The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9) :623–33, September 2010.

[39] Hiroshi Fujikawa. Diversity of the growth patterns of Bacillus subtilis colonies on agar plates. *FEMS Microbiol Ecology*, 13 :159–167, 1994.

[40] Masaya Fujita, José Eduardo González-pastor, Eduardo Gonza, and Richard Losick. High- and Low-Threshold Genes in the Spo0A Regulon of Bacillus subtilis High- and Low-Threshold Genes in the Spo0A Regulon of Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology*, 187(4), 2005.

[41] Liam F. Garrity and George W Ordal. Chemotaxis in BS how bacteria monitor environmental signals. *Pharmacie Theorie*, 1995.

[42] Bernard R Glick. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(2) :109–117, 1995.

[43] Etienne Guyon, Jean Pierre Hulin, and Luc Petit. *Hydrodynamique physique*. 2001.

[44] Luanne Hall-Stoodley, J. William Costerton, and Paul Stoodley. Bacterial biofilms : from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2) :95–108, 2004.

[45] N A Hill and T J. Pedley. Bioconvection, 2005.

[46] A Hillesdon and T J. Pedley. Bioconvection in suspension of oxytactic bacteria : linear theory. *Journal of Fluid Mechanics*, 324, 1996.

[47] A Hillesdon, T J. Pedley, and John O. Kessler. Bacteria, The development of concentration gradients in a suspension of chemotactic. *Bulletin of Mathematical Biology*, 57(2), 1995.

[48] Laura Hobley, Adam Ostrowski, Francesco V Rao, Keith M Bromley, Michael Porter, Alan R Prescott, Cait E Macphee, Daan M F van Aalten, and Nicola R Stanley-Wall. BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the Bacillus subtilis biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, pages 1–6, July 2013.

[49] Takeru Ishige, Kohsuke Honda, and Sakayu Shimizu. Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9 :174–180, 2005.

[50] Debra W Jackson, Kazushi Suzuki, Lawrence Oakford, Jerry W Simecka, Mark E Hart, and Tony Romeo. Biofilm Formation and Dispersal under the Influence of the Global Regulator CsrA of Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 184(1) :290–301, 2002.

[51] Imre M. Janosi, John O. Kessler, and Viktor K Horva. Onset of bioconvection in suspensions of Bacillus subtilis. *Physical Review E*, 58(4) :4793–4800, 1998.

[52] Christina Tobin Kå hrström. Symbiosis : Breaking the ice with your host. *Nature Reviews Microbiology*, 11(10) :663, 2013.

[53] Daniel B Kearns and Richard Losick. Cell population heterogeneity during growth of Bacillus subtilis. *Genes & development*, 19(24) :3083–94, December 2005.

[54] Evelyn F Keller and L E E A Segelf. Model for Chemotaxis. *Journal of theoretical biology*, pages 225–234, 1971.

[55] Mikkel Klausen, Anders Aaes-Jorgensen, Soren Molin, and Tim Tolker-Nielsen. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Molecular Microbiology*, 50(1) :61–68, 2003.

[56] Kazuo Kobayashi. Bacillus subtilis pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *Journal of bacteriology*, 189(13) :4920–31, July 2007.

[57] Kazuo Kobayashi. SlrR/SlrA controls the initiation of biofilm formation in Bacillus subtilis. *Molecular microbiology*, 69(6) :1399–410, September 2008.

[58] J. U. Kreft and J.W.T. Wimpenny. Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research*, 43(6) :135–41, January 2001.

[59] Jan-ulrich Kreft, G Booth, and J W T Wimpenny. Applications of individual-based modelling in microbial ecology. *Modelling in Microbial Ecology*, 1999.

[60] F Kunst, N Ogasawara, I Moszer, a M Albertini, G Alloni, V Azevedo, M G Bertero, P Bessières, a Bolotin, S Borchert, R Borriss, L Boursier, a Brans, M Braun, S C Brignell, S Bron, S Brouillet, C V Bruschi, B Caldwell, V Capuano, N M Carter, S K Choi, J J Codani, I F Connerton, and a Danchin. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. *Nature*, 390(6657) :249–56, November 1997.

[61] Damir Lazarevic, Josip Dvornik, and Kresmir Fresl. Contact detection algorithm for discrete element analysis. *KoG-6*, pages 29–40, 2002.

[62] Brandon Lindley, Qi Wang, and Tianyu Zhang. Multicomponent hydrodynamic model for heterogeneous biofilms : Two-dimensional numerical simulations of growth and interaction with flows. *Physical Review E*, 85(3) :031908, March 2012.

[63] Daniel López and Roberto Kolter. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in Bacillus subtilis. *FEMS microbiology reviews*, 34(2) :134–49, March 2010.

[64] Daniel López, Hera Vlamakis, and Roberto Kolter. Generation of multiple cell types in Bacillus subtilis. *FEMS microbiology reviews*, 33(1) :152–63, January 2009.

[65] P. Lopez-Garcia and D. Moreira. Tracking microbial biodiversity through molecular and genomic ecology. *Research in microbiology*, 159 :67–73, 2008.

[66] R M Macnab and D E Koshland. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(9) :2509–2512, September 1972.

[67] B Y Donald S Martin. The oxygen consumption of escherichia coli during the lag and logarithmic phases of growth. *Journal of general physiology*, (1927) :691–708, 1932.

[68] Massimiliano Marvasi, Pieter T Visscher, and Lilliam Casillas Martinez. Exopolymeric substances (EPS) from Bacillus subtilis : polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS microbiology letters*, 313(1) :1–9, December 2010.

[69] Mitsugu MATSUSHITA and Hiroshi FUJIKAWA. Diffusion-limited growth in bacterial colony formation. *Physica A*, 168 :498–506, 1990.

[70] R Mesibov, G W Ordal, and J Adler. The range of attractant concentrations for bacterial chemotaxis and the threshold and size of response over this range. Weber law and related phenomena. *The Journal of general physiology*, 62(2) :203–23, August 1973.

[71] Masaaki Morikawa. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria Bacillus subtilis and related species. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(1) :1–8, January 2006.

[72] Masaaki Morikawa, Shinji Kagihiro, Mitsuru Haruki, Kazufumi Takano, Steven S Branda, Roberto Kolter, and Shigenori Kanaya. Biofilm formation by a Bacillus subtilis strain that produces gamma-polyglutamate. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 9) :2801–7, September 2006.

[73] Ewan J Murray, Mark a Strauch, and Nicola R Stanley-Wall. SigmaX is involved in controlling Bacillus subtilis biofilm architecture through the AbrB homologue Abh. *Journal of bacteriology*, 191(22) :6822–32, November 2009.

[74] Carey D Nadell, Vanni Bucci, Knut Drescher, Simon a Levin, Bonnie L. Bassler, and Joao B Xavier. Cutting through the complexity of cell collectives. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 280(1755) :20122770, March 2013.

[75] Carey D Nadell, Joao B Xavier, Simon a Levin, and Kevin R Foster. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS biology*, 6(1) :e14, January 2008.

[76] Yu. a. Nikolaev and V. K. Plakunov. Biofilm "City of microbes" or an analogue of multicellular organisms ? *Microbiology*, 76(2) :125–138, April 2007.

[77] George O'Toole, Heidi B. Kaplan, and Roberto Kolter. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol.*, pages 49–79, 2000.

[78] Sünje Johanna Pamp, Morten Gjermansen, and Tim Tolker-nielsen. *The Biofilm Matrix : A Sticky Framework*. 2007.

[79] Cristian Picioreanu. Modelling biofilms with cellular automata. Technical Report January, 1996.

[80] Cristian Picioreanu. *Multidimensional modeling of biofilm structure*. PhD thesis, 1999.

[81] Cristian Picioreanu, J. U. Kreft, Mikkel Klausen, J.A.J. Haagensen, T. Tolker-Nielsen, and S. Molin. Microbial motility involvement in biofilm structure formation a 3D modelling study. *Water science & technologie*, 55(8-9) :337–343, 2007.

[82] Cristian Picioreanu, Mark C M Van Loosdrecht, and Joseph J Heijnen. Two-Dimensional Model of Biofilm Detachment Caused by Internal Stress from Liquid Flow. *Biotechnology and bioengineering*, 72(2), 2001.

[83] Cristian Picioreanu, Mark C M van Loosdrecht, and J J Heijnen. Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnology and bioengineering*, 58(1) :101–116, 1998.

[84] Moreno R Sepulveda ME Pizarro GE, GarcÃa C. Two-dimensional cellular automaton model for mixed-culture biofilm. *Water Sci Technol*, 49 :11–12, 2004.

[85] Pozrikidis C. *Fluid dynamics : theory, computation, and numerical simulation*. 2009.

[86] L a Pratt and Roberto Kolter. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation : roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*, 30(2) :285–293, 1998.

[87] Christopher V Rao, George D Glekas, and George W Ordal. The three adaptation systems of Bacillus subtilis chemotaxis. *Trends in microbiology*, 16(10) :480–7, October 2008.

[88] Colasenti Ric and Wimpenny WT Julian. A unifying hypothesis for the strucutre of microbial biofilms based on cellular automaton models. *FEMS Microbiol Ecology*, 22 :1–16, 1997.

[89] Diego Romero, Claudio Aguilar, Richard Losick, and Roberto Kolter. Amyloid fibers provide structural integrity to Bacillus subtilis biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5) :2230–4, February 2010.

[90] M M Rosario, J R Kirby, D a Bochar, and G W Ordal. Chemotactic methylation and behavior in Bacillus subtilis : role of two unique proteins, CheC and CheD. *Biochemistry*, 34(11) :3823–31, March 1995.

[91] Jonathan Saragosti, Vincent Calvez, Nikolaos Bournaveas, Axel Buguin, Pascal Silberzan, and Benoît Perthame. Mathematical description of bacterial traveling pulses. *PLoS computational biology*, 6(8), January 2010.

[92] Michael P Schultz and Geoffrey W Swain. The influence of biofilms on skin friction drag. *Biofouling*, 15(1-3) :129–139, 2000.

[93] J E Segall, S M Block, and Howard C. Berg. Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(23) :8987–91, December 1986.

[94] J. B. Segur and Helen E. Oberstar. Viscosity of Glycerol and its aqueous solutions. *Industrial and engineering chemistry*, 43(9) :2017–2020, 1951.

[95] Moshe Shemesh and Yunrong Chai. A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in Bacillus subtilis via histidine kinase KinD signaling. *Journal of bacteriology*, 195(12) :2747–54, June 2013.

[96] T. a. Smirnova, L. V. Didenko, R. R. Azizbekyan, and Yu. M. Romanova. Structural and functional characteristics of bacterial biofilms. *Microbiology*, 79(4) :413–423, August 2010.

[97] Andrey Sokolov, Raymond E. Goldstein, Felix Feldchtein, and Igor Aranson. Enhanced mixing and spatial instability in concentrated bacterial suspensions. *Physical Review E*, 80(3) :1–8, September 2009.

[98] Victor Sourjik and Howard C. Berg. Receptor sensitivity in bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1) :123–7, January 2002.

[99] C Staudt, H Horn, D C Hempel, and T R Neu. Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, 88(5) :585–92, December 2004.

[100] Philip S Stewart, Ricardo Murga, Srinivasan Rohini, and de Beer Dirk. biofilm structural heterogeneity visualized materials by three microscopic methods. *Water research*, 29(8) :2006–2009, 1995.

[101] Paul Stoodley, K Sauer, D G Davies, and J. William Costerton. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*, 56 :187–209, January 2002.

[102] I Sutherland. Biofilm exopolysaccharides : a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading, England)*, 147(Pt 1) :3–9, January 2001.

[103] P Thévenaz and M Unser. User-Friendly Semiautomated Assembly of Accurate Image Mosaics in Microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 70(2) :135–146, 2007.

[104] Marcus J Tindall, Eamonn a Gaffney, Philip K Maini, and Judith P Armitage. Theoretical insights into bacterial chemotaxis. *WIREs Syst BiolMed*, 4(3) :247–59, 2012.

[105] Marcus J Tindall, P K Maini, S L Porter, and Judith P Armitage. Overview of mathematical approaches used to model bacterial chemotaxis II : bacterial populations. *Bulletin of mathematical biology*, 70(6) :1570–607, August 2008.

[106] Marcus J Tindall, S L Porter, P K Maini, G Gaglia, and Judith P Armitage. Overview of mathematical approaches used to model bacterial chemotaxis I : the single cell. *Bulletin of mathematical biology*, 70(6) :1525–69, August 2008.

[107] Miguel Trejo, Carine Douarche, Virginie Bailleux, Christophe Poulard, Sandrine Mariot, Christophe Regeard, and Eric Raspaud. Elasticity and wrinkled morphology of Bacillus subtilis pellicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6) :2011–2016, January 2013.

[108] Idan Tuval, Luis H. Cisneros, Christopher Dombrowski, Charles W Wolgemuth, John O. Kessler, and Raymond E. Goldstein. Bacterial swimming and oxygen transport near contact lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7) :2277–82, February 2005.

[109] Jan-Willem Veening, Leendert W Hamoen, and Oscar P Kuipers. Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in Bacillus subtilis. *Molecular microbiology*, 56(6) :1481–94, June 2005.

[110] P Vijayabaskar, S Babinastarlin, T Shankar, T Sivakumar, and K T K Anandapandian. Quantification and Characterization of Exopolysaccharides from Bacillus subtilis (MTCC 121). *Advances in Biological Research*, 5(2) :71–76, 2011.

[111] Nikita Vladimirov and Victor Sourjik. Chemotaxis : how bacteria use memory. *Biological chemistry*, 390(11) :1097–104, November 2009.

[112] Hera Vlamakis, Claudio Aguilar, Richard Losick, and Roberto Kolter. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & development*, 22 :945–953, 2008.

[113] O. Wanner and W. Gujer. A Multispecies Biofilrn Model 0. *Biotechnology and bioengineering*, 28 :314–328, 1986.

[114] Paula Watnick and Roberto Kolter. Biofilm , City of Microbes. *Journal of bacteriology*, 182(10) :2675–2679, 2000.

[115] Robert C Weast, Melvin J Astle, and William H Beyer. *CRC handbook of chemistry and physics*, volume 69. CRC press Boca Raton, FL, 1988.

[116] Henricus H. Wensink, Jörn Dunkel, Sebastian Heidenreich, Knut Drescher, and Raymond E. Goldstein. Meso-scale turbulence in living fluids. *PNAS*, 2012.

[117] William B Whitman, David C Coleman, and William J Wiebe. Perspective Prokaryotes : The unseen majority. *PNAS*, 95(June) :6578–6583, 1998.

[118] Hugo Wioland, Francis G Woodhouse, John O. Kessler, and Raymond E. Goldstein. Confinement Stabilizes a Bacterial Suspension into a Spiral Vortex. *Physical Review Letters*, pages 2–6, 2013.

[119] Laurence S Wong, Mark S Johnson, Igor B Zhulin, and Barry L Taylor. Role of Methylation in Aerotaxis in Bacillus subtilis. *Journal of bacteriology*, 177(14) :3985–3991, 1995.

[120] Joao B Xavier and Kevin R Foster. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *PNAS*, 104(3) :876–81, January 2007.

[121] Joao B Xavier, Cristian Picioreanu, and Mark C M van Loosdrecht. A framework for multidimensional modelling of activity and structure of multispecies biofilms. *Environmental microbiology*, 7(8) :1085–103, August 2005.

[122] Hyung Suk Yu, Jimmy H Saw, Shaobin Hou, Randy W Larsen, Kylie J Watts, Mark S Johnson, Michael a Zimmer, George W Ordal, Barry L Taylor, and Maqsudul Alam. Aerotactic responses in bacteria to photo-released oxygen. *FEMS microbiology letters*, 217(2) :237–42, December 2002.

[123] Tianyu Zhang, Nick Cogan, and Qi Wang. Phase-Field Models for Biofilms II . 2-D Numerical Simulations of Biofilm-Flow Interaction 1 Introduction 2 Mathematical model. *communications in computational physics*, 4(1) :72–101, 2008.

[124] Wei Zhang and George N Phillips. Structure of the Oxygen Sensor in Bacillus subtilis. *Structure*, 11(9) :1097–1110, September 2003.

[125] Eric Ziegel, William Press, Brian Flannery, Saul Teukolsky, and William Vetterling. *Numerical Recipes : The Art of Scientific Computing*, volume 29. Press, Cambridge university, November 1987.