

Caractérisation in situ du développement d'un biofilm par suivi de microbilles à l'aide d'une méthode de corrélation d'images numériques

Heloïse Boudarel

► To cite this version:

Heloïse Boudarel. Caractérisation in situ du développement d'un biofilm par suivi de microbilles à l'aide d'une méthode de corrélation d'images numériques. Matériaux. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAC061 . tel-02094489

HAL Id: tel-02094489 https://theses.hal.science/tel-02094489

Submitted on 9 Apr 2019

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 CLERMONT AUVERGNE ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES POUR L'INGÉNIEUR DE CLERMONT FERRAND

Thèse

Présentée par

Héloïse Boudarel

Ingénieure Génie Civil Polytech' Clermont Ferrand

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité

MATÉRIAUX

Caractérisation *in situ* du développement d'un biofilm par suivi de microbilles à l'aide d'une méthode de corrélation d'images numériques

Nelly HENRY	Directrice de Recherches - CNRS, Laboratoire Jean Perrin	Président
Nadine PEYRIÉRAS	Directrice de Recherches - CNRS, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Régis GRIMAUD	Professeur - Université de Pau et des Pays de l'Adour	Rapporteur
Christian PROVOT	Directeur Scientifique - BioFilm Control	Membre Invité
Benoît BLAYSAT	Maître de Conférences HDR - Univ. Clermont Auvergne	Co-Directeur
Michel GRÉDIAC	Professeur d'Université - Univ. Clermont Auvergne	Co-Directeur
Jean-Denis MATHIAS	Directeur de Recherches - IRSTEA	Co-Directeur

Soutenue publiquement le 07 Décembre 2018 devant le Jury :

Institut Pascal

À ma tante,

Remerciements

Un mois après la soutenance, il est temps pour moi de finaliser ce manuscrit et de remercier toutes les personnes qui ont participé, de prés ou de loin, au bon déroulé de ce travail.

Je commencerai par remercier les rapporteurs de mon travail de thèse, Nadine Peyrieras et Régis Grimaud pour s' être penché attentivement sur mon manuscrit. Je vous remercie du temps que vous m'avez accordé, des retours enrichissant que vous m'avez apportés et de l'échange qui a eu lieu lors de la soutenance. Merci également à Nelly Henry d'avoir présider le jury de thèse et d'avoir examiner mon travail de thèse avec attention.

Merci à mes directeurs, Benoît Blaysat, Michel Grédiac et Jean-Denis Mathias pour m'avoir offert la possibilité de réaliser ce travail. Vous avez tous les trois contribué à la réussite de ce projet et par extension, de mon avenir, et pour cela je vous en suis reconnaissante. Tout particulièrement, je voudrais te remercier, Jean-Denis, pour ta disponibilité, tes conseils et pour les occasions que tu m'as données pour présenter mes travaux et rencontrer les personnes de la discipline. Tu m'as accordé beaucoup de temps, de recul et de perspectives et je t'en remercie. Merci Michel pour les réflexions enrichissantes, pour ton suivi sans faille et tes corrections, attentives, qui auront sûrement permis de rendre ce travail en temps et en heure, pour ma plus grande satisfaction. Enfin, merci Benoît pour ta disponibilité, ton aide et tes astuces lumineuses sur tous les problèmes pratiques que j'ai pu rencontrer, pour tes encouragements, ta facilité d'accès et ton grand génie. Je te souhaite la belle et longue carrière que tu mérites. Je mesure ma chance de vous avoir eu pour directeurs de ces recherches. Votre implication, votre sympathie, votre humanité et votre respect ont été des éléments que j'ai pu grandement apprécier.

Je tiens à remercier BioFilm Control pour le partenariat dans ce projet et son soutien financier et matériel. Merci à Christian Provot pour le suivi de ce travail de thèse. Un grand merci à Stéphanie Badel-Berchoux pour son dynamisme, sa participation à chacune des réunions et pour ses conseils précieux à l'avancement des essais. De manière plus globale, je voudrais remercier toute l'équipe de BioFilm Control. Merci à Rémi Laurent et Aurélie Comby pour l'accompagnement lors de mes essais, pour leur sympathie, leur aide et pour tout ce qu'ils m'ont enseigné sur la microbiologie, au fil des discussions. Je n'oublie pas tout le reste de l'équipe pour leur merveilleux accueil dans leurs locaux : Bo, Élodie, Laurine, Sophie, Arnaud et Jérôme. Je vous remercie vivement pour nos différents échanges. J'ai énormément appris à vos côtés. Je garderai un excellent souvenir de cette période.

Je voudrais aussi remercier Christiane Forestier pour sa présence aux comités de thèse, pour ses conseils, sa sympathie et son regard sur mes travaux qui ont amené un recul supplémentaire sur ce projet très transversal. Un grand merci à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer à l'Ifma et à l'Université Clermont Auvergne et que j'ai pu solliciter dans le cadre de cette thèse. Merci au personnel du CTT : Mylène, Adrien, Alexis, Clément et Nicolas. Merci aussi à Sébastien Menecier et Frédéric Perisse pour le coup de pouce pour les aimants. Merci à Jacqueline Madebene, gestionnaire à l'Institut Pascal, pour son efficacité mais surtout pour sa gentillesse.

Au cours de ces trois années, j'ai eu la chance de travailler dans une très bonne ambiance grâce à mes collègues de bureau. Un grand merci, plein de nostalgie déjà, à tous mes collègues de la sulfureuse zone allouée aux doctorants. Aux anciens, Bibi, Charles et Mathieu, à mes conscrits, Guillaume, Nico et Adrien, à Manu, le prochain sur la liste, et aux petits nouveaux Irmella, Damien et JB à qui je souhaite du courage pour le restant de leurs travaux.

Ces années de thèse n'auraient pas été ce qu'elles sont sans le club de boxe de Clermont Saint Jacques. Cet endroit a été le terrain de beaucoup de rencontres, de décharge de pression et de regain de confiance, carburants essentiels durant ces trois ans. Merci à Adel pour sa générosité. Merci à Mehdi, pour les entraînements, semaines comme week-ends, les stratégies et les encouragements. Merci à Adem de m'avoir fait passer ce combat pré-thèse, il a été un bon coup de fouet pour la dernière étape qui m'attendait.

Merci à Charline, Adrien, Maxime et Hugo pour avoir suivi, de prés ou de loin, cet ultime étape académique.

Merci à Nouzha et à Leïla pour leur présence et leurs encouragements. Merci à la famille, au Maroc, pour leur soutien et les bons moments qu'ils nous ont fait passer durant les vacances.

Je tiens à remercier mes cousins clermontois, Florence, David, Judith et Étienne, qui ont eu plein d'attentions envers moi durant ces six années en terre Auvergnate.

Un énorme merci à mes parents, pour m'avoir donné ce prénom, pour leur éducation et leur bienveillance. Je sais que je vous ai rendu fiers et c'est là ma plus grande satisfaction. Merci à ma petite sœur, Juliette, pour les bons moments que l'on a partagé malgré les débats précocement interrompus. Merci à ma sœur Clémence, à Guillaume et à Gabin, de m'avoir souvent réconforté et de m'avoir honorée du titre de Docteur-Tata-Marraine.

Merci à ma tante Jeannine, dont le soutien a été infaillible de son vivant. Tu m'as dit, un dur jour de prépa, "j'espère qu'un jour tu vaincras les maths et la physique". Ce n'est pas exactement le cas aujourd'hui mais j'aurais aimé que tu puisses partager enfin ma satisfaction dans l'accomplissement de ces années d'étude.

Finalement, j'adresse mes plus tendres remerciements à celui qui y est pour beaucoup dans ma réussite sur les bancs d'écoles clermontoises. Merci Mehdi pour tes paroles d'encouragements, ton aide technique et ta vivacité d'esprit. C'est avec grand plaisir que je suis Capitaine de notre navire depuis 6 ans. Je nous souhaite que l'on s'épanouisse à présent dans la réussite de ton doctorat et que celui-ci t'apporte la plus grande satisfaction, celle que tu mérites.

Résumé

La connaissance et la maîtrise de la présence d'un biofilm représentent aujourd'hui un challenge important. Dans le contexte d'étude des capacités de développement des biofilms, BioFilm Control fait figure de pionnier grâce à leur test nommé Biofilm Ring Test[®]. Basé sur une sollicitation du biofilm via l'attraction, par un aimant, de microbilles magnétiques au centre du puits, le test évalue la présence de biofilm par l'absence de regroupement des billes au centre du puits à un instant donné. L'enjeu de ce travail est de décliner le BioFilm Ring Test® en un examen dynamique, non destructif et à l'échelle microscopique. Dans le biofilm, la matrice polymérique assure la cohésion entre cellules et confère une protection aux bactéries qui vivent au sein du biofilm. Les propriétés mécaniques de la matrice sont donc un indicateur de l'état local du biofilm. La recherche de ces paramètres permet de pouvoir prédire et contrôler la formation, l'accumulation et la dissémination de bactéries propageant les infections et/ou l'encrassement. Néanmoins, la détermination des propriétés mécaniques des biofilms nécessite des précautions et l'usage d'un vocabulaire homogénéisé et de méthodes unifiées au sein de la communauté. Pour cela, une première partie de ce travail de thèse consiste en la proposition d'un guide de bonnes pratiques quant à la caractérisation mécanique du matériau biofilm. Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, une méthodologie pour le suivi de particules micrométriques au sein d'un matériau vivant est développée. Le recours à des techniques d'imagerie telle que la corrélation d'images numériques permet de remonter à la cinématique du mouvement de chacune des microbilles, qui servent de marqueurs au sein des images traitées, par une mesure sans contact. Cette méthode est ensuite appliquée à l'étude de la formation de biofilm. L'originalité de ce travail repose sur la caractérisation de l'évolution de la typologie du mouvement des microbilles métalliques lors de la formation des biofilms. Il s'agit là de discriminer des comportements de billes révélateurs de la genèse d'un biofilm. En tirant parti de l'observation du mouvement de microbilles inertes introduites dans le milieu bactérien, on détecte des changements de typologies de trajectoires qui semblent être reliés à l'activité de bactéries sessiles, adhésion ou formation de matériel extracellulaire. Les résultats montrent que les diverses étapes de la formation de biofilms sont caractérisées, ce qui permet notamment de discriminer la présence ou non d'antibiotiques mélangés avec les bactéries et d'apprécier leur efficacité. Dans une dernière partie, des recherches encore en phase de développement sont exposées. Elles s'intéressent au comportement du biofilm sous sollicitation volumique. Il s'agit dans ce cas d'observer le biofilm en champ lointain et de suivre le déplacement ou la déformation d'un marquage constitué d'un agglomérat de microbilles, plongées dans un champ magnétique. Ces premiers travaux pourront servir d'ébauche à des travaux futurs dans le but de caractériser quantitativement le matériau biofilm.

Abstract

The knowledge and control of the presence of a biofilm is nowadays an important challenge. In the context of studying biofilm development capacities, BioFilm Control is a pioneer with their test called the Biofilm Ring Test[®]. Based on a solicitation of the biofilm via the attraction, by a magnet, of magnetic microbeads at the centre of the well, the test evaluates the presence of biofilm by the absence of grouping of the beads at the centre of the well at a given time. The challenge of this work is to translate the BioFilm Ring Test[®] into a dynamic, non-destructive and microscopic examination. In biofilm, the polymeric matrix ensures cohesion between cells and provides protection for the bacteria that live within the biofilm. The mechanical properties of the matrix are therefore an indicator of the local state of the biofilm. The search for these parameters makes it possible to predict and control the formation, accumulation and spread of bacteria that spread infections and/or fouling. Nevertheless, the determination of the mechanical properties of biofilms requires precautions and the use of a homogenized vocabulary and methods that are unified within the community. To this end, a first part of this thesis work consists in proposing a guide of good practices for the mechanical characterization of biofilm material. In the second part of this thesis work, a methodology for monitoring micrometric particles within a living material is developed. The use of imaging techniques such as digital images correlation makes it possible to trace the kinematics of the movement of each of the microbeads, which serve as markers within the processed images, by non-contact measurement. This method is then applied to the study of biofilm formation. The originality of this work is based on the characterization of the evolution of the typology of the movement of metal microbeads during the formation of biofilms. The aim is to discriminate bead behaviours that reveal the genesis of a biofilm. By taking advantage of the observation of the movement of inert microbeads introduced into the bacterial environment, changes in trajectory typologies are detected and appear to be related to sessile bacterial activity, adhesion or formation of extracellular material. The results show that the various stages of biofilm formation are characterized, which makes it possible to discriminate between the presence or absence of antibiotics mixed with bacteria and to assess their effectiveness. In the last part, research still in the development phase is presented. They are interested in the behaviour of biofilm under volume loading. This involves observing biofilm at macroscopic scale and following the movement or deformation of a pattern consisting of an agglomerate of microbeads embedded in a magnetic field. This initial work can be used as a draft for future work to quantitatively characterize the biofilm material.

Table des matières

1	Inti	oducti	oduction 1				
	1.1	Conte	xte		2		
	1.2	Étude bibliographique					
		1.2.1	1.2.1 Les biofilms				
			1.2.1.1	Définition et formation des biofilms	4		
			1.2.1.2	Composition, structure et caractéristiques des biofilms	5		
			1.2.1.3	Axes d'études des biofilms	6		
			1.2.1.4	Les études mécaniques des biofilms dans la littérature	7		
		1.2.2	Évaluatio	on <i>in vitro</i> de la formation de biofilm et du pouvoir antimi-			
			$\operatorname{crobien}$		11		
			1.2.2.1	Modèles statiques	11		
			1.2.2.2	Modèles dynamiques sous écoulement $\ldots \ldots \ldots \ldots$	12		
			1.2.2.3	Biofilm Ring $\operatorname{Test}^{\otimes}$	15		
	1.3	Objec	tifs de la t	hèse et organisation du manuscrit	17		
2	Les	étude	s mécani	ques sur le biofilm	19		
2	Les 2.1	étude Motiva	s mécani e ations	ques sur le biofilm	19 20		
2	Les 2.1 2.2	étude Motiva Contri	s mécani e ations ibutions .	ques sur le biofilm	19 20 20		
2	Les 2.1 2.2 2.3	étude: Motiva Contri Conclu	s mécani e ations ibutions . usions	ques sur le biofilm	 19 20 20 21 		
2	Les 2.1 2.2 2.3 2.4	étude Motiva Contra Concla Articla	s mécanie ations ibutions . usions e	ques sur le biofilm	 19 20 20 21 22 		
2	Les 2.1 2.2 2.3 2.4	études Motiva Contri Conclu Article	s mécanie ations butions . usions e	ques sur le biofilm	 19 20 20 21 22 		
2	Les 2.1 2.2 2.3 2.4 App	études Motive Contri Concle Article	s mécanie ations ibutions . usions e on de la (ques sur le biofilm	 19 20 20 21 22 49 		
2	Les 2.1 2.2 2.3 2.4 App 3.1	étude: Motiv Contri Concli Article plicatic Applie	s mécanic ations ations ations e on de la C cation des	ques sur le biofilm	 19 20 20 21 22 49 		
2	Les 2.1 2.2 2.3 2.4 App 3.1	étude: Motiva Contri Conclu Article plicatic Applic enjeux	s mécanie ations ations ations e on de la (cation des a et problé	ques sur le biofilm	 19 20 21 22 49 50 		
2	Les 2.1 2.2 2.3 2.4 Apj 3.1	étude: Motiv: Contri Conclu Article plicatic Applic enjeux 3.1.1	s mécanie ations ations ations e on de la (cation des a et problé Enjeux s	ques sur le biofilm	 19 20 21 22 49 50 50 		
2	Les 2.1 2.2 2.3 2.4 Apj 3.1	études Motiva Contri Concla Article plicatic Applic a.1.1 3.1.2	s mécanie ations ations usions e on de la (cation des c et problé Enjeux s Enjeux s	ques sur le biofilm	 19 20 21 22 49 50 50 50 		
3	Les 2.1 2.2 2.3 2.4 App 3.1	études Motiva Contri Conclu Article plicatic Applic enjeux 3.1.1 3.1.2 3.1.3	s mécanie ations ibutions . usions e on de la (cation des a et problé Enjeux s Enjeux s Probléma	ques sur le biofilm	 19 20 21 22 49 50 50 50 51 		
3	Les 2.1 2.2 2.3 2.4 Apj 3.1	études Motiva Contri Concla Article plicatic Applic enjeux 3.1.1 3.1.2 3.1.3 Corrél	s mécanie ations ations usions e on de la (cation des c et problé Enjeux s Enjeux s Probléma ation d'In	ques sur le biofilm	 19 20 21 22 49 50 50 50 51 51 		
3	Les 2.1 2.2 2.3 2.4 App 3.1	études Motiva Contri Conclu Article plicatic Applic enjeux 3.1.1 3.1.2 3.1.3 Corrél 3.2.1	s mécanie ations ations ations e on de la (cation des c et problé Enjeux s Enjeux s Probléma ation d'In Principe	ques sur le biofilm	 19 20 21 22 49 50 50 51 51 		

		3.2.3 Métrologie
	3.3	Application de la CIN au suivi de particules
		3.3.1 Choix du suivi de particule
		3.3.2 Suivi des billes au sein du matériau
		3.3.3 Localisation de la région d'intérêt
		3.3.4 Réduction de la région d'intérêt
	3.4	Cas d'applications : les biofilms
		3.4.1 Validité de la métrologie du suivi de particules
		3.4.2 Essais de validation
		3.4.3 Principe expérimental du suivi de la formation du biofilm 70
4	Suiv	vi de microbilles <i>in situ</i> : application au biofilm 73
	4.1	Motivations
	4.2	Contributions
	4.3	Conclusion
	4.4	Article
5	Bio	film sous chargement volumique 101
	5.1	Motivations
	5.2	Magnétisme dans les applications biologiques
		5.2.1 Superparamagnétisme
		5.2.2 Pinces magnétiques
	5.3	Problématiques
	5.4	Configurations des aimants
	5.5	Marquages
		5.5.1 Marquages macroscopiques $\ldots \ldots 114$
		5.5.2 Marquage microscopique
6	Con	clusion générale et perspectives 117
	6.1	Conclusion générale
	6.2	Perspectives
A	Fon	damentaux mécaniques 135
	A.1	Comportements mécaniques
	A.2	Vocabulaire et notations
В	Pro	tocoles expérimentaux 141
	B.1	Cinétique de formation de biofilm sans antibiotique
	B.2	Cinétique de formation de biofilm en présence d'antibiotique
	B.3	Dénombrement

\mathbf{C}	Références des séries d'images utilisées			
	C.1	Essai avec <i>P. aeruginosa</i>	147	
	C.2	Essais avec S. aureus	148	

Table des figures

1.1	Cycle de vie du biofilm à l'interface solide-liquide	5
1.2	System $MBEC^{TM}$ (Calgary device)	12
1.3	Appareil de Robbins	13
1.4	Réacteur à perfusion	13
1.5	Chambre à flux	14
1.6	Plateforme microfluidique	15
1.7	Principe du BioFilm Ring $\text{Test}^{\textcircled{B}}$	16
2.1	Les hétérogénéités dans le biofilm	34
2.2	Illustrations des méthodes d'essai les plus courantes dans la littérature	37
2.3	Processus général des études mécaniques sur les biofilms	40
2.4	Guide de bonnes pratiques pour la conduite d'études mécaniques	43
3.1	Principe de la comparaison des niveaux de gris	53
3.2	Exemple de la littérature de l'application de la CIN sur des matériaux vivants	57
3.3	Courbe $MSD = f(t)$ pour différents types de mouvements	59
3.4	Imagette d'une bille utilisée dans l'algorithme de détection des billes	60
3.5	Billes détectées dans l'image	61
3.6	Région d'intérêt utilisée pour le calcul du déplacement d'une bille par CIN .	62
3.7	Image utilisée pour le calcul de bruit de capteur transportée sur le calcul	
	de CIN	63
3.8	Graphe de la variance en fonction de la moyenne de la distribution du niveau	
	de gris, d'un pixel	64
3.9	Courbe $MSD = f(\Delta t)$ pour les trajectoires dans la solution de glycérol	65
3.10	Courbe $MSD = f(\Delta t)$ pour les trajectoires dans la solution de BHI	66
3.11	Diffusion dans le liquide N350.	67
3.12	Composante horizontale du déplacement d'une bille diffusant dans le liquide	
	D500 pour différentes fréquences d'acquisition.	68
3.13	Déplacements mesurés sur une série d'images "identiques" pour différentes	
	fréquences d'acquisition.	69

3.14	Schéma expérimental de l'étude de la formation de biofilm par le biais de microbilles piégées dans le milieu bactérien	71
4 1		20
4.1	Principe de la culture de bionim, BRI, microscopie et analyse d'images	80
4.2	BFI relatifs en fonction du temps d'incubation pour <i>P. aeruginosa</i> et <i>S.</i>	0.0
4.0		83
4.3	Deplacement radial (en pixels) des billes pour quatre types de mouvement	05
	observes durant la croissance du biofilm	85
4.4	Deplacement carre moyen en fonction de l'intervalle de temps pour <i>P. ae</i> -	0.0
		86
4.5	Déplacement carré moyen en fonction de l'intervalle de temps pour S . aureus	87
4.6	Ecart-type des déplacements des billes dans une culture de <i>S. aureus</i>	89
4.7	Modèles simplifiés pour l'évolution de l'écart-type des déplacements en fonc-	
4.0	tion du temps d'incubation	89
4.8	ACP - S.aureus - Réplicat 1	90
4.9	ACP - Blanc - Réplicat 1	91
4.10	Ecart-type des déplacements des billes dans une culture de <i>P. aeruginosa</i> .	92
4.11	ACP - P.aeruginosa	93
4.12	ACP - P.aeruginosa	94
4.13	Écart-type des déplacements des billes dans une culture de S . aureus en	
	présence d'antibiotiques	95
4.14	ACP - S. aureus et Vancomycin	96
4.15	ACP - S. aureus et Acide Fusidique	97
4.16	rBFI pour la souche <i>S. aureus</i> en présence d'antibiotiques	98
4.17	Dénombrement des bactéries adhérées	98
5.1	Courbe d'aimantation pour différents types de matériaux magnétiques 1	104
5.2	Principe d'une microbille superparamagnétique dans un champ magnétique 1	105
5.3	Simulation avec FEMM du champ magnétique délivré par l'aimant du BRT 1	107
5.4	Configuration 1 : simulation d'aimants autour d'une chambre à flux 1	109
5.5	Configuration 2 : simulation d'aimants autour d'un puits de microplaque	
	de 96 puits	110
5.6	Configuration 3 : influence de la forme des pôles	111
5.7	Configuration 4 : simulation d'aimants autour d'une boîte de pétri 1	112
5.8	Configuration 5 : simulation du BRT avec une aimantation contrôlée 1	113
5.9	Schéma de principe pour un marquage par un cercle lorsque l'électroaimant	
	se déplace latéralement	114
5.10	Effet du déplacement latéral de l'aimant sur le marquage	115
5.11	Schéma de principe pour un marquage par un cercle lorsque l'électroaimant	
	se déplace verticalement	115
5.12	Effet du déplacement vertical de l'aimant sur le marquage (expérimental) . 1	115
5.13	Effet microscopique de l'aimantation des billes	116

A.2	Modèle de Maxwell	137
A.1	Comportements matériaux étudiés dans le cas des biofilms	138
A.3	Modèle de Kelvin-Voigt	138
A.4	Modèle de Zener ou Solide Linéaire Standard	138
A.5	Modèle de Burger	139

Liste des tableaux

1.1	Valeurs de différents paramètres mécaniques reportés dans la littérature	8
2.1	Rôles de la mécanique dans l'étude des biofilms	29
3.1	Échelle des viscosités observables par la méthode développée	68
4.1 4.2 4.3	Différents types de mouvements de particules reportés dans la littérature Types de mouvements observés en fonction de la souche	78 84
4.4	ter 1 en fonction du temps d'incubation	90
	du temps d'incubation	95
5.1	Récapitulatif des différentes configurations de pinces magnétiques simulées .	108
A.1	Vocabulaire et notations mécaniques	140
C.1	Références des essais <i>P.aeruginosa</i>	147
C.2	Références des essais - Replicat 1 - Blanc	148
C.3	Références des essais - Replicat 1 - Souche	148
C.4	Références des essais - Replicat 1 - Vancomycin	149
C.5	Références des essais - Replicat 1 - Acide Fusidique	149
C.6	Références des essais - Replicat 2 - Blanc	149
C.7	Références des essais - Replicat 2 - Souche	150
C.8	Références des essais - Replicat 2 - Vancomycin	150
C.9	Références des essais - Replicat 2 - Acide Fusidique	150

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

1.1	Cont	exte		2
1.2	Étud	le bibliog	graphique	4
1	.2.1	Les biofi	lms	4
		1.2.1.1	Définition et formation des biofilms	4
		1.2.1.2	Composition, structure et caractéristiques des biofilms .	5
		1.2.1.3	Axes d'études des biofilms	6
		1.2.1.4	Les études mécaniques des biofilms dans la littérature .	7
1	.2.2	Évaluati	on <i>in vitro</i> de la formation de biofilm et du pouvoir anti-	
		microbie	n	11
		1.2.2.1	Modèles statiques	11
		1.2.2.2	Modèles dynamiques sous écoulement	12
		1.2.2.3	Biofilm Ring Test [®]	15
1.3	Obje	ctifs de	la thèse et organisation du manuscrit	17

1.1 Contexte

Le biofilm constitue le principal mode de vie des bactéries puisqu'il représente la forme de vie privilégiée pour 90% des bactéries en milieu naturel. Contrairement au mode de vie planctonique dans lequel les bactéries vivent en suspension, le biofilm forme une communauté hétérogène et complexe de bactéries qui se fixent à une surface et qui se lient entre elles par le biais de la sécrétion d'une matrice extracellulaire composée de protéines, de sucres et d'eau. La formation de biofilm est une caractéristique commune à un grand nombre de bactéries. Aussi, il a été admis par la communauté des microbiologistes que le mode de vie en biofilm est un stade à part entière de la vie de la bactérie. La forme planctonique ne serait qu'une transition vers le biofilm. Comme pour de nombreuses espèces vivantes, la collectivité est nécessaire à leur survie. Cette forme de vie en communauté confère aux bactéries des avantages métaboliques importants. La capacité d'adhésion des biofilms sur des surfaces naturelles ou artificielles est très grande et leur résistance à toute sorte de stress les rend difficile à éliminer. Les biofilms résistent en effet très bien aux stress chimique (antibiotiques par exemple) et mécanique (fluide par exemple). La résistance accrue des biofilms rend ces derniers ubiquitaires. Bien qu'ils puissent être utilisés pour des procédés innovants de bioremédiation ou de synthèse de composés chimiques par exemple, les biofilms peuvent s'avérer être une réelle nuisance dans divers domaines où la contamination bactérienne est à bannir comme dans le milieu médical, l'industrie agroalimentaire et dans certains environnements humains. En France, les biofilms sont responsables de 50 à 60% des infections nosocomiales (Bryers, 2008) et de 40% des toxi-infections alimentaires. Des études montrent qu'en 2050, le nombre de décès liés à une infection récalcitrante pourrait dépasser les chiffres des décès causés par un cancer (O'Neill, 2014). Par ailleurs, de nombreuses industries souffrent aussi de la récalcitrance des biofilm. La présence de couche épaisse de biofilms sur les coques de bateaux augmente la friction sur l'eau et entraîne une surconsommation de 35 à 50% de carburant (Schultz et al., 2011). Ces quelques chiffres prouvent que l'étude des biofilms représente un enjeu socio-économique considérable. Notamment, l'étude des biofilms est capitale dans le milieu hospitalier, pour lequel les difficultés d'élimination de biofilm sont un problème de santé publique.

La récalcitrance des biofilms provient en grande partie de l'intégrité mécanique que procure la matrice extracellulaire. Ce matériau assure la cohésion entre les bactéries et l'adhérence sur les surfaces. Les bactéries protégées par les subtances polymériques extracellulaires (EPS) dans les biofilms peuvent survivre même après une procédure de décontamination et représentent une source d'infection pour les humains et les animaux. De plus, le caractère viscoélastique de la matrice permet au biofilm de s'adapter à des contraintes de cisaillement que peut induire l'environnement naturel du biofilm. La matrice sert de moyen de protection aux bactéries et leur permet d'acquérir une grande résistance à leur environnement. Aussi, les études sur les biofilms permettent de déterminer comment les biofilms se développent, changent et se détachent. Ainsi, il est nécessaire d'étudier leur structure et le phénomène de détachement afin de contrôler leur développement. La connaissance des structures des biofilms permet de prédire leurs influences sur certains systèmes. L'un des intérêts de déterminer les propriétés mécaniques des biofilms est de pouvoir prédire et contrôler la formation, l'accumulation et la dissémination de bactéries propageant les infections.

Ce travail de thèse a été financé par une bourse innovation recherche de la région Auvergne et du FEDER (Fonds européen de développement régional). À ce titre, il s'agissait d'associer deux centres de recherche publique, l'Institut Pascal et l'IRSTEA, et une entreprise régionale, BioFilm Control (Saint-Beauzire 63). Le travail effectué avait pour visée un transfert de technologie ou des travaux de R&D entre les laboratoires de recherche et BioFilm Control. Ce partenariat a permis d'associer le savoir-faire des équipes en termes de caractérisation mécanique des matériaux par mesures de champs, et une entreprise de R&D spécialisée dans la détermination de la formation du biofilm et le criblage d'antibiotiques. La société BioFilm Control a notamment développé et breveté un test nommé Biofilm Ring Test[®]. Dans ce travail, il s'agissait de voir s'il était possible de mettre à profit les résultats de cet essai afin de déterminer l'état du matériau biofilm. À ce titre, il convenait d'établir un pont entre les propriétés mécaniques des biofilms et leur état de santé afin d'enrichir les résultats délivrés par le BioFilm Ring Test[®].

L'étude des biofilms d'un point de vue mécanique est complexe en raison de son caractère multi-échelle et multi-physique. Pour autant, elle représente un véritable enjeu scientifique. Les résultats des études mécaniques sur les biofilms reportés dans la littérature restent équivoques. Peu de protocoles sont standardisés et les multiples modèles d'essais développés par les équipes de recherche rendent la comparaison des résultats difficile. Il a tout d'abord paru nécessaire de clarifier les notions de test et de caractérisation mécanique des biofilms. Par la suite, ce travail de thèse a eu pour volonté de présenter les tenants et les aboutissants du développement d'une méthode dynamique d'analyse des stades précoces de la formation du biofilm. L'utilisation de la corrélation d'images numériques en champ proche permet une observation plus fine du phénomène de formation de biofilm. En effet, les résultats d'une telle technique sont dynamiques et locaux par le biais de la cinématique du mouvement de chacune des microbilles filmées. L'enjeu de ce travail de thèse est donc d'aller plus loin que l'appréciation qualitative actuelle du BioFilm Ring Test[®]. Il s'agit de tirer parti du déplacement des microbilles dans le biofilm afin de caractériser le développement de celui-ci. Sur le principe du test existant, ce projet vise à discriminer les stades de la formation du biofilm par le biais de l'analyse des images des billes mobiles à l'intérieur de celui-ci.

Dans l'étude bibliographique qui suit, nous présentons le sujet d'étude de ce travail de thèse à savoir le biofilm bactérien. Des exemples de la littérature permettent de révéler la difficulté d'obtenir des valeurs de paramètres mécaniques comparables. Les principaux modèles de la littérature pour étudier la formation des biofilms sont détaillés et permettent d'introduire le BioFilm Ring Test[®], ses principes et ses applications. À la suite de cette partie bibliographique, une synthèse critique des études mécaniques du biofilm est proposée.

1.2 Étude bibliographique

1.2.1 Les biofilms

1.2.1.1 Définition et formation des biofilms

Les premières observations des biofilms remontent au $17^{\grave{e}me}$ siècle mais les investigations autour des biofilms demeurent relativement récentes (35 ans) avec leur définition proposée par Costerton et al. (1978). Les bactéries ont longtemps été étudiées sous leur forme libre, isolée et planctonique. Néanmoins, dans un principe de survie, les bactéries se fixent sur un support solide et sécrètent des substances visqueuses pour former un biofilm. Les biofilms se composent de communautés bactériennes adhérant entre elles et à une surface par le biais de la sécrétion d'une matrice polymère. À la fin des années 90, on assiste à une explosion exponentielle du nombre de publications qui traitent des biofilms. Le comportement biofilm des organismes est de plus en plus pris en considération notamment dans le domaine de la santé où les biofilms se développent sur de très nombreuses surfaces telles que les cathéters, les valves, les prothèses, les dents, la peau ou encore les muqueuses...

La formation d'un biofilm est un processus dynamique et non-figé qui se déroule en plusieurs étapes détaillées ci-dessous (et schématisées Fig. 1.1) :

- adhésion réversible : suspendues dans un fluide, des bactéries approchent une surface et y adhèrent de manière réversible par le biais de forces d'attraction physicochimiques de type forces de Van der Waals. Cette proximité avec une surface est favorisée par l'agitation brownienne, la gravité ou l'agitation du fluide. Certains microorganismes sont dotés de moyens de propulsion propre qui leur assurent une motilité. Ces moyens de propulsion sont constitués de structures protéiques (flagelle, pili) situés au niveau des enveloppes des bactéries et permettent à la bactérie de se déplacer de manière autonome;
- adhésion irréversible : les bactéries se multiplient par division cellulaire et continuent à se lier à la surface. Par ailleurs, la modification du profil d'expression des gènes des bactéries adhérées entraîne la synthèse de structures à la surface de la bactéries et la sécrétion de polysaccharides extracellulaires liant irréversiblement les bactéries entre elles et à la surface;
- formation de microcolonies : la croissance des microrganismes en biofilm et l'adhésion de nouvelles bactéries au biofilm formé créent des microcolonies;
- maturation : les microcolonies se développent et le biofilm se structure de manière tridimensionnelle suivant les conditions environnementales. Des canaux laissant circuler

FIG. 1.1. Cycle de vie du biofilm à l'interface solide-liquide. Suspendues dans un fluide, les bactéries planctoniques se rapprochent d'une surface où elles adhèrent de manière réversible dans un premier temps. La sécrétion de matière polymère entre la surface et les bactéries rend l'adhésion irréversible. La croissance et la division des bactéries contribuent à la formation de micro-colonies puis d'un biofilm structurellement complexe. Finalement, la libération de cellules libres ou d'agrégats de biofilm permet de coloniser une autre surface, commençant un nouveau cycle.



des fluides chargés en nutriments se dessinent à travers les microcolonies;

 détachement : libération de cellules libres spécialisées ou d'agrégats de biofilm qui permettent de coloniser une autre surface, commençant un nouveau cycle (Davies and Marques, 2009). Les bactéries dispersées ont des prédispositions pour former des microcolonies (Kragh et al., 2016).

1.2.1.2 Composition, structure et caractéristiques des biofilms

Un biofilm est principalement constitué de microorganismes enchâssés dans une matrice EPS sécrétée par les microorganismes. Les microorganismes représentent 10% de la masse sèche du biofilm (Flemming and Wingender, 2010). Par analogie, Flemming et al. (2007) voient les biofilms comme des cités de microbes vivant dans des maisons, représentées par la matrice extracellulaire, les abritant de leur environnement physique et chimique. Les biofilms sont hautement hydratés puisqu'une proportion de 90 à 99% du biofilm est composée d'eau. Le reste du biofilm est composé de macromolécules biologiques. Parmi ces composés, on retrouve des polysaccharides, des protéines, de l'ADN extracellulaire (eDNA) et de l'ARN. La matrice ou les composés EPS représentent 90% de la masse sèche. La matrice agit comme un liant des bactéries et les EPS jouent un rôle important dans le développement et la vie du biofilm (Das et al., 2013). Selon leur souche de provenance et les conditions de croissance en termes de nutriments et de stress physiques et chimiques, le taux de production de matrice extracellulaire et sa composition sont différents. Aussi, la proportion de chacun des éléments contenus dans un biofilm est déterminée par un certain nombre de facteurs, parmi lesquels le type de nutriment, les conditions hydrodynamiques et la température.

Des observations de sections de biofilms au microscope montrent que la composition du biofilm est hautement hétérogène (Lawrence et al., 1991). Les colonies de bactéries sont parcourues par des canaux par lesquels circulent des fluides assurant l'apport en nutriment. Le comportement du biofilm est piloté par une micro-structure très complexe et dynamique.

Les bactéries en biofilm développent des propriétés que n'ont pas les bactéries planctoniques. Le quorum sensing permet aux bactéries de communiquer et de s'organiser pour collaborer. Cette collaboration est aussi caractérisée par le transfert horizontal de gènes (Madsen et al., 2012). Les bactéries en biofilms sont plus résistantes aux biocides que leurs analogues planctoniques. Alors que, dans les années 90, la tolérance aux agents antibiofilms était attribuée à des problèmes de diffusion, il s'est avéré par la suite que d'autres phénomènes étaient responsables de la tolérance aux agents anti-infectieux. Par exemple, la capacité d'adaptation et de différenciation des bactéries permet leur évolution dans le sens de leur préservation. De manière générale, les biofilms sont plus résistants au nettoyage, qu'il soit chimique ou mécanique. Par ailleurs, l'exposition fréquente et répétée à des antibiotiques peut entraîner un phénomène de bactérie multirésistante, c'est-à-dire que les traitements antibiotiques n'ont plus d'effet contre elle.

Toutes ces caractéristiques font que les biofilms sont présents dans tous les environnements, qu'ils sont résistants et qu'ils deviennent des réservoirs d'infections par la libération de germes. Dans l'industrie alimentaire, ils sont présents dans les bioréacteurs où ils sont utilisés pour la production d'alcool, d'acides ou de polysaccharides. Dans l'industrie textile, les biofilms sont étudiés pour fabriquer du nylon. D'autre part, ils servent d'alternative aux finitions mécaniques sur certains vêtements en jean (sablage...). Aussi, les études sur les biofilms se font de plus en plus nombreuses et souvent à l'interface de plusieurs disciplines.

1.2.1.3 Axes d'études des biofilms

De nombreuses questions relatives aux biofilms ont été éclaircies depuis les premières études sur le biofilm. Il est maintenant assez bien compris comment le biofilm se forme et ce que font les bactéries dans le biofilm. Par ailleurs, d'autres problématiques relatives au mode de vie en biofilm sont étudiées par des équipes de communautés diverses. Les mécanismes d'adhésion, la physiologie des biofilms, la production d'énergie par pile microbienne (Godain, 2018) et le développement de stratégies anti-biofilm (Bjarnsholt et al., 2013a; Roy et al., 2018) sont autant d'enjeux importants. Par ailleurs, beaucoup de caractéristiques évoquées comme étant des fonctions du biofilm ne sont pas biofilm-spécifique (Ghigo, 2003). C'est le cas de la production de substance extracellulaire qui est reportée chez des bactéries planctoniques. La recherche des éléments qui caractérisent exclusivement les biofilms sont aussi d'intérêt. Parmi les sujets de recherche proches ou futurs, on peut citer les problématiques suivantes : localiser les bactéries au sein des biofilms, quantifier les flux, visualiser l'intérieur des biofilms et comprendre les interactions au sein des biofilm multi-espèces.

1.2.1.4 Les études mécaniques des biofilms dans la littérature

Une fois le biofilm établi, il est primordial de pouvoir mesurer ses capacités à résister et à se transformer. Les études mécaniques sur le biofilm permettent d'avoir des renseignements essentiels sur l'état de santé du biofilm. Depuis une vingtaine d'années, la mécanique du biofilm a pris de l'ampleur dans la littérature car les enjeux sont nombreux. Ces enjeux sont décrits dans le chapitre 2 qui suit. De nombreuses études reportent les résultats d'essais expérimentaux visant à déterminer les caractéristiques mécaniques de biofilms bactériens. Le tableau 1.1 résume les amplitudes des valeurs de quelques paramètres mécaniques obtenus pour différentes souches et en utilisant différentes méthodes de test et d'identification. Les fondamentaux de la mécanique des milieux continus pour l'étude des biofilms sont expliqués en Annexe A. Un tableau récapitulatif des propriétés mécaniques souvent étudiées dans le cas des biofilms ainsi que leur définition est aussi ajouté en Annexe A. Le tableau 1.1 montre que le nombre de propriétés mécaniques intéressantes dans le cadre de l'étude des biofilms est vaste. Par ailleurs, plusieurs méthodes d'essai sont disponibles pour mesurer un même paramètre. Un même banc d'essai peut permettre de déterminer plusieurs paramètres mécaniques pour un biofilm. Les souches utilisées dans les différentes études et les conditions expérimentales sont souvent dédiées à l'application simulée. Il en résulte des différences de plusieurs ordres de grandeur dans les valeurs numériques des caractéristiques mesurées. La diversité de choix de méthodes ainsi que la particularisation des essais de la littérature rendent la comparaison et l'interprétation des résultats difficiles.

Paramètres	Méthode	Espèce	Valeur	Réf.		
	Flow coll	Desulfovibrio sp. EX26	2.5 - 5 Pa	(Dunsmore et al., 2002)		
Module d'Voung	Flow cell	P. aeruginosa	353 Pa	(Mathias and Stoodley, 2009)		
Module a Toung –	Plateforme	S. epidermis	3.2 kPa	(Hohno et al. 2000)		
	microfluidique	K. pneumoniae	1.1 kPa	(110111e et al., 2009)		
Compliance	Microrhéologie	E. coli	0.02 - 0.23 Pa	(Galy et al., 2012)		
	Compression	P. aeruginosa	6500 ± 500 Pa	(Körstgens et al., 2001)		
_			$E_1 = 1 - 8 \text{ kPa}^{(1)}$			
	Microindentation	S. mutans	$E_2 = 5 - 10 \text{ kPa}^{(1)}$	(Cense et al., $2006b$)		
Modulos álastiquos_			$\nu_1 = 200 - 2000$ Pa.s ⁽¹⁾			
Modules elastiques-	AFM	P. aeruginosa (PAO1)	$E_1 = 1.7 \times 10^5 \pm 8 \times 10^4 $ Pa ⁽²⁾			
			$E_2 = 1.1 \times 10^6 \pm 1 \times 10^5$ Pa ⁽²⁾	(Lau et al., 2009a)		
_		Jeune	$\nu_1 = 2.3 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5 $ Pa.s ⁽²⁾			
_	Microcantilever	$E. \ coli$	$1270\pm280 Pa$	(Aggarwal and Hozalski, 2010)		
		S. oralis J22	$62 + 0 P_{2}$ ⁽³⁾			
	Compression	(cisaillement = 7 sec^{-1})	$02 \pm 31a$	(Paramonova et al., 2009a)		
		S. oralis J22				
		(cisaillement = 50)	17 ± 3 Pa $^{(3)}$			
		\sec^{-1})				
	Continue page suivante					

TABLE 1.1. Valeurs de différents paramètres mécaniques reportés dans la littérature pour des biofilm issus de différentes souches.

(1). Identification par un modèle de Zener

(2). Identification par un modèle de Voigt Standard Linear Solid

(3). S'apparente plutôt à un Module d'Young

		TABLEAU 1	.1 - suite		
Paramètres	Méthode	Espèce	Valeur	Réf.	
		S. oralis $J22 + A$.	$E_1 = 66 \pm 4\%^{(4)}$		
	LICT	naeslundii T14V- J1	$E_2 = 20 \pm 7\%$ ⁽⁴⁾	$(H_0 \text{ ot al} 2014)$	
		avant brossage	$E_3 = 14 \pm 6\%$ ⁽⁴⁾	(IIe et al., 2014)	
		S. oralis $J22 + A$.	$E_1 = 47 \pm 6\%$ ⁽⁴⁾		
		naeslundii T14V- J1	$E_2 = 24 \pm 8\%$ ⁽⁴⁾		
		après brossage	$E_3 = 30 \pm 8\%$ ⁽⁴⁾		
	Compression	P.a eruginos a	$\sigma_f = 990 \pm 90$ Pa	(Körstgens et al., 2001)	
Limite d'élasticité	Pháomàtra	S.epidermis	$\sigma_f = 20$ Pa	(Pavlovsky et al., 2013)	
	nneometre	S.aureus 6ME	$\sigma_f=2-3$ Pa	(Di Stefano et al., 2009)	
		P.a eruginos a	$G'(1Hz) = 2 \pm 0.9 \text{ kPa}$	(Lieleg et al., 2011)	
Madular complement	Rhéomètre	Pháomàtra <i>Conidemni</i>	C anidamaia	$G' = 11 \pm 3$ Pa	(Deviloyedry et al. 2012)
modules complexes		5.epiaermis	$G^{\prime\prime}=1.9\pm0.5~{\rm Pa}$	(Faviovsky et al., 2013)	
		S gameria 6MF	$G'=2.1\pm0.9\times10^3~{\rm Pa}$	(Di Stafano et al. 2000)	
		S. aureus OME	$G'' = 72 \pm 57$ Pa	(Di Stelano et al., 2009)	
		Smutane	$G' \approx 30 \mathrm{GPa}$	(Hwang of al 2014)	
		D.Matans	$G'' \approx 4$ GPa	(II wang et al., 2014)	
Module de	Flow-cell	P.a eruginos a	$G=1-280~\mathrm{Pa}$	(Stoodley et al., 2002)	
cisaillement	Rheometer	S.aureus	$G=29.7\pm1.7$ Pa	(Blauert et al., 2015)	
	Microrhéologie par	a i	1.07 ± 0.01 D		
Viscosité	holographie	S.mutans	$\nu = 1.67 \pm 0.01$ mPa.s	(Cheong et al., 2009)	
		Continue pag	ge suivante		

(4). Identification par un modèle de Maxwell à trois éléments

TABLEAU $1.1 - suite$					
Paramètres	Méthode	Espèce	Valeur	Réf.	
	Flow cell	S.aureus	$\nu = 3.5 \pm 2.9$ Pa.s	(Rupp et al., 2005)	

1.2.2 Évaluation *in vitro* de la formation de biofilm et du pouvoir antimicrobien

La capacité des bactéries à former un biofilm est d'intérêt pour développer des stratégies pour lutter contre les biofilms ou pour utiliser positivement les biofilms, dans des applications de bioremédiation par exemple. La prévention de la formation de biofilm est un enjeu majeur dans le domaine de la santé. Actuellement, les doses usuelles de substances biocides efficaces dans le cas d'infections bactériennes s'avèrent bien souvent inefficaces une fois le biofilm installé. Dès lors, la détection de la formation de biofilm *in vitro* est une information cruciale, notamment pour l'élaboration de traitements prophylactiques. De nombreux protocoles ont été proposés pour l'analyse de la formation de biofilms (Azeredo et al., 2017). Les modèles utilisés *in vitro* répondent à deux critères différents : soit permettre les études à haut-débit, soit imiter au mieux les conditions de vie dans l'environnement du biofilm, notamment en termes de contraintes de cisaillement, et éviter le détachement d'échantillon qui modifie le biofilm. Les modèles couramment utilisés pour la formation de biofilm sont exposés dans cette partie. Ils sont classés selon leur caractère statique ou dynamique.

1.2.2.1 Modèles statiques

Dénombrement microbiologique sur milieu solide : Le dénombrement des unités formant colonies (acronyme anglais CFU - "Colony Formation Units") permet un comptage des micro-organismes d'une culture microbiologique sur un milieu solide. Ce protocole est facile à mettre en place et est disponible dans tous les laboratoires. Néanmoins, il reste limité aux bactéries qui croissent sur plaque d'agar. Cette méthode est par ailleurs très chronophage.

Plaque microtitre (Tissue Culture Plates) : Les modèles basés sur les plaques microtitres sont les plus utilisés. Dans cette méthode, aucun flux ne circule et la croissance se fait en milieu fermé. La biomasse présente dans les puits est rendue visible à l'aide de colorants. L'importance de la coloration, liée à la quantité de biofilm, est lue à partir de la densité optique du puits. Les résultats sont classés en trois catégories : inoculum non formateur de biofilm, inoculum modéré, ou inoculum fortement formateur de biofilm. Cette méthode permet de distinguer facilement les propriétés de formation d'un biofilm d'une souche et de ses mutations ou de cribler des molécules antibiofilms. Par ailleurs, on peut étudier l'effet d'agents de surface, déposés au préalable à la surface des puits. Cette méthode, bien qu'indirecte, a l'avantage d'être polyvalente. Elle peut être utilisée pour de nombreuses espèces. Par ailleurs, la méthode est compatible avec des hauts rendements, ce qui permet de tester plusieurs conditions simultanément. Néanmoins, le manque de protocole normalisé et le manque de reproductibilité sont les inconvénients notables de cette méthode. System MBECTM (Calgary device) : Le système MBECTM (Minimal Biofilm Eradication Concentration) fait partie d'une catégorie de système permettant la production de biofilms reproductibles pour l'évaluation simple et simultanée de plusieurs agents biocides à différentes concentrations. À partir des méthodes basées sur les plaques microtitres, le modèle Calgary a été développé pour éviter le biais dû à la sédimentation des bactéries (Ceri et al., 1999; Harrison et al., 2010). Le dispositif Calgary (Fig. 1.2) consiste en un récipient en deux parties. La partie inférieure est composée d'une micro-plaque de 96 puits. La partie supérieure est un couvercle composé de picots qui coïncident avec le centre des puits et qui viennent s'insérer dans chacun des puits de la plaque. Le biofilm est formé sur les picots. Le dispositif est utilisé pour caractériser la formation du biofilm et évaluer la susceptibilité aux biocides (Melchior et al., 2007; Arias-Moliz et al., 2010).

FIG. 1.2. System MBECTM (Calgary device). À gauche, la microplaque à picots (source : https ://emerypharma.com). À droite, le biofilm se forme sur les picots amovibles de la partie supérieure.



1.2.2.2 Modèles dynamiques sous écoulement

Les modèles dynamiques sous écoulement sont des méthodes où le milieu de culture est ouvert, c'est-à-dire qu'il y a apport continu en éléments nutritifs. De plus, ils permettent de simuler un environnement réel de biofilm dans un fluide. En effet, les écoulements hydrodynamiques influencent la formation du biofilm. Le type d'écoulement ainsi que la contrainte de cisaillement engendrée par l'écoulement ont un effet sur la force d'adhésion du biofilm.

Appareil de Robbins : Il consiste en une série de coupons insérés dans une chambre dans laquelle circule le milieu bactérien (Kharazmi et al., 1999) (Fig. 1.3). Les coupons peuvent être prélevés (et remplacés) pour être étudiés sans perturbation du flux et de manière stérile (Coenye et al., 2008). Ce modèle a notamment été utilisé dans le cadre de l'étude de matériau de cathéter (Nickel et al., 1985).

Réacteur à perfusion : Ce dispositif permet de simuler un environnement avec des contraintes de cisaillement faibles (Fig. 1.4). Il est utilisé pour des applications en milieu médical (cathéther, maladie pulmonaires, biofilm buccaux-dentaire). Il permet la formation et l'étude de biofilms à l'interface air-liquide.



FIG. 1.3. Appareil de Robbins (Tyler Research Corp.).

FIG. 1.4. Réacteur à perfusion (ASTM, 2008).



Microfermenteurs : Plusieurs types de microfermenteurs sont disponibles et vendus dans le commerce :

- CDC (Center for Disease Control) biofilm reactor (CBR) : ce réacteur est composé d'un récipient cylindrique constamment réapprovisionné en nutriment, dans lequel sont placés des tubes en plastique. Ces tubes possèdent des emplacements dédiés à la mise en place de coupons qui seront colonisés par le biofilm. Le récipient en verre est posé sur un agitateur magnétique permettant de créer une agitation circulaire du fluide. Le flux engendré par la rotation est réglable pour pouvoir être laminaire ou turbulent. Cette agitation permet d'engendrer une contrainte de cisaillement constante d'intensité modérée à forte. Les coupons sont amovibles une fois la surface colonisée par un biofilm. Ce réacteur permet la formation, répétable, d'échantillons de biofilm issue de diverses souches (Goeres et al., 2005);
- Rotating disk biofilm reactor : dans ce système, les coupons sont placés sur le fond du récipient cylindrique en verre. La plateforme sur laquelle sont placés les coupons est mise en rotation alors que le milieu bactérien est régénéré par circulation au sein du récipient. La contrainte de cisaillement générée par la rotation de la plateforme est d'intensité modérée à forte. Elle reste cependant moins importante que pour le CDC;

• Rotating annular reactors : dans cette configuration, le réacteur est composé de deux cylindres concentriques dont l'un est en rotation. Les échantillons sont des pales fixées au cylindre en rotation.

Chambre à flux (Flow-cell) : C'est la méthode de référence pour de nombreuses applications. Les modèles dynamiques présentés ci-dessus ont pour inconvénient principal la difficulté de suivre la formation du biofilm en direct. Les chambres à flux sont des cellules transparentes dans lesquelles circule le milieu bactérien (Fig. 1.5). Le matériau utilisé pour la chambre est adapté à la visualisation par microscopie et permet une observation en temps réel du développement du biofilm. Les chambres à flux sont beaucoup utilisées. Néanmoins, sa mise en place requiert une grande technicité. La nucléation des bulles formées par le fluide constitue une problématique importante. Par ailleurs, l'observation en chambre à flux est peu adaptée au haut débit car relativement peu d'échantillons sont analysés simultanément.

FIG. 1.5. Chambre à flux. Figure transformée de (Diaz et al., 2012).



Plateforme microfluidique : Ces dispositifs hautement intégrés voire automatisés ont été développés pour pouvoir observer le comportement des bactéries dans un environnement contrôlé aussi bien hydrologiquement que chimiquement. Des systèmes de canaux de petites tailles diffusent les liquides de croissance jusqu'à la zone de formation du biofilm (Fig. 1.6). Les géométries des canaux et le dispositif peuvent être facilement conçus par l'expérimentateur. Les quantités à analyser mises en jeu dans ce type de modèles sont très restreintes, ce qui permet des études plus longues avec un volume de consommable moindre. Ces méthodes restent peu pratiquées car elles sont coûteuses, peu réutilisables et requièrent une grande technicité. Par conséquent, peu de publications font état de l'utilisation de plateformes microfluidiques et il y a donc peu de retour d'expérience. Néanmoins, elles sont potentiellement utilisables pour des essais à grand rendement.



FIG. 1.6. Plateforme microfluidique (Benoit et al., 2010).

1.2.2.3 Biofilm Ring Test[®]

Basé sur les dispositifs en microplaque, le BioFilm Ring Test[®] (BRT) développé par la société BioFilm Control permet d'évaluer à grand rendement l'aptitude de microorganismes à former un biofilm. Il ne nécessite pas de coloration de l'échantillon, ni aucun lavement, limitant ainsi l'altération du biofilm.

Principe et procédure du test Des bactéries sont incubées en présence de microbilles paramagnétiques en milieu non renouvelé. La présence qualitative de biofilm est sondée en plaçant l'échantillon dans un champ magnétique. Le principe repose sur l'aimantation de microbilles paramagnétiques présentes dans une solution bactérienne initiale. En effet, des bactéries sont incubées dans les puits d'une microplaque de 96 puits en présence d'un milieu de culture, type BHI (Brain Heart Infusion), et d'un toner de microbilles superparamagnétiques. À un temps donné, la microplaque est placée sur un porte aimant dédié. Le porte aimant permet de placer en dessous de chacun des 96 puits, un aimant cylindrique permanent qui génère un champ magnétique. Sous l'effet du champ magnétique, les microbilles paramagnétiques se magnétisent. Si les bactéries ont formé un biofilm, les billes magnétiques sont piégées dans le matériau formé et il n'y a pas d'agglomération de microbilles au centre des puits. Au contraire, si le biofilm ne s'est pas formé, les billes sont attirées au centre des puits sous l'effet du champ magnétique. Après 1 minute d'aimantation, un spot brun se forme au centre des puits. La lecture du test se fait par la prise d'une image du dessous de la plaque par un scanner du commerce et par l'analyse de cette image à l'aide du logiciel dédié BFC³. Après analyse des indices lumineux des fonds des puits, le logiciel retourne un indice, l'indice BFI, qui caractérise la formation de biofilm. Lorsque le BFI est élevé (17 < BFI < 20), un spot au centre du puits est détecté, traduisant une absence de biofilm. Pour un BFI faible (BFI < 2), le spot est considéré diffus ou totalement absent. Le biofilm est alors respectivement en formation ou non présent. Le principe est représenté schématiquement en Fig. 1.7.





Applications du BRT Les applications du BRT se trouvent en microbiologie et dans l'industrie pharmaceutique. Le test se décline en plusieurs dérivés correspondant à des applications différentes : criblage à haut débit d'agents antibactériens et antibiotiques préventifs et curatifs, caractérisation des agents de revêtement anti-biofilm, étude de l'impact de l'activité enzymatique sur la formation du biofilm et la dégradation. L'application du BRT pour le criblage de molécules antibiotiques est nommé Antibiofilmogramme[®]. Ce test aboutit à la détermination de la CMIb (Concentration minimale inhibitrice pour le biofilm) permettant de sélectionner parmi les antibiotiques efficaces sur les bactéries planctoniques (CMI) ceux possédant en plus une activité préventive sur la formation de biofilm.

1.3 Objectifs de la thèse et organisation du manuscrit

Par le biais d'un indicateur scalaire, le BioFilm Ring Test[®] permet de savoir si les bactéries ont formé un biofilm pour un temps de croissance donné. Par ce test, il est possible de savoir si une molécule dans un puits empêche ou retarde la formation du biofilm. Par rapport aux méthodes de la littérature qui utilisent des étapes manuelles (détachements, colorations et lavages), le BRT a l'avantage de maximiser la reproductibilité de l'essai en testant les biofilms *in situ* et sans remaniement. Cependant, ce test est destructif. Le but de cette thèse est d'aller au delà de l'information ponctuelle de l'état de formation du biofilm. L'idée est d'apporter un caractère non-destructif et dynamique pour pouvoir avoir accès à la cinétique de formation de biofilms, de manière continue, sans biais temporel. La formation du biofilm s'accompagne du développement d'un matériau dont la structure tridimensionnelle est composée par des enchevêtrements de bactéries dans une matrice polymère dont le comportement mécanique s'avère être viscoélastique. Aussi, l'objectif de ce travail de thèse est de développer une méthode non-destructive afin de pouvoir déterminer l'évolution de l'état du biofilm dans le temps, ceci à l'aide de l'analyse de ses propriétés matérielles.

Afin de répondre à cette problématique, cette thèse a été structurée en trois phases :

- la clarification des enjeux, des problématiques et de la conduite des études mécaniques sur le biofilm dans les applications microbiologiques et la mise au point d'une aide à la décision dans le processus d'identification de paramètres mécaniques des biofilms;
- la mise au point d'une méthodologie permettant d'analyser les caractéristiques d'un matériau vivant, par le biais de l'étude, à l'échelle microscopique, du mouvement de microbilles *in situ*, puis l'implémentation de cette méthode dans le cas de l'analyse de la formation de biofilms de *P. aeruginosa* et *S. aureus*;
- l'étude de la possibilité d'utiliser la corrélation d'images numériques pour suivre un test mécanique du biofilm sollicité par des forces volumiques engendrées par l'aimantation de particules magnétiques en son sein.

La rédaction de ces travaux s'articule autour de quatre chapitres. La démarche scientifique commence par une synthèse critique permettant de clarifier les enjeux des études mécaniques sur les biofilms. À cet effet, une étude bibliographique publiée dans un journal scientifique sera présentée. Elle a été écrite dans le but d'informer le lecteur sur la pertinence de l'étude de la relation entre l'état mécanique et l'état de formation des biofilms. Le chapitre 3 est dédié à la présentation détaillée et à l'explication des choix des méthodes, protocoles et dispositifs expérimentaux utilisés dans ce travail de thèse. Notamment, il sera question de l'utilisation des méthodes de mesures de champs dans le cas précis des applications sur des matériaux vivants. Les principes de la méthode de corrélation d'images numériques et sa formalisation mathématique sont présentés dans ce chapitre. La métho-
dologie idoine à la détection des billes au sein du biofilm et l'analyse des trajectoires pour la détection d'informations sur la formation du biofilm sont ensuite exposées. Le chapitre 4 développe l'application de la méthode précédemment exposée à l'analyse de la formation de biofilm de deux souches. Ces travaux sont présentés sous forme d'article en anglais destiné à être publié sous peu dans un journal scientifique. Les résultats de ces travaux montrent que l'utilisation du mouvement libre de microbilles au sein du milieu bactérien permet de détecter quantitativement des événements remarquables de la croissance du biofilm. Un dernier chapitre a pour but d'exposer les prospections qui ont été envisagées pour l'étude des propriétés mécaniques du biofilm sous sollicitation par billes aimantées.

Chapitre 2

Les études mécaniques sur le biofilm

Sommaire

2.1	Motivations
2.2	Contributions
2.3	Conclusions
2.4	Article

2.1 Motivations

Il existe des liens inhérents entre le métabolisme des bactéries vivant sous forme de biofilm et les propriétés mécaniques du matériau constitué de la communauté de bactéries et de la matrice. Le développement de stratégies efficaces pour contrôler la présence de biofilms ou la mise au point de procédés biotechnologiques basés sur l'utilisation de biofilms requièrent la compréhension des mécanismes inhérents au mode de vie en biofilm et la connaissance des paramètres mécaniques décrivant le comportement du biofilm dans son environnement. Dans ce contexte, de nombreuses méthodes d'essais ont vu le jour pour évaluer ces paramètres. Elles sont adaptées des méthodes de test et d'identification de paramètres de matériaux classiques de l'ingénierie ou de fluides inertes. Cependant, le manque de normalisation tant dans le domaine des essais mécaniques que dans les méthodes d'identification des paramètres mécaniques pour la caractérisation des matériaux vivants reste un verrou scientifique. La quête de normalisation est problématique étant donné que les biofilms sont des structures vivantes. Cette caractéristique entraîne une complexité dans l'étude des propriétés mécaniques. Celles-ci sont hétérogènes spatialement et temporellement. En effet, de par leur composition, les biofilms sont des composites. Par ailleurs, les bactéries ont la capacité de moduler dynamiquement les propriétés mécaniques en réponse à un stress qu'elles ressentent. Le premier objectif de cette thèse, traité sous forme d'article, est né du constat de la difficulté de réaliser et d'interpréter des études sur la mécanique du biofilm. En effet, les paramètres mécaniques reportés dans le chapitre précédent (voir Tableau 1.1) attestent de la complexité des tests mécaniques sur les biofilms et de l'identification de paramètres de comportement mécanique : de nombreux paramètres sont mesurables par le biais de diverses méthodes et leur valeur diffèrent de plusieurs ordres de grandeur entre différentes souches ou différentes conditions environnementales. La littérature expose déjà largement les principes des diverses méthodes développées pour l'étude des biofilms. Au delà d'une nouvelle explication technique de la mise en place de ces tests, l'originalité de ce travail est d'apporter une aide au choix (i) d'un paramètre mécanique pertinent par rapport à la problématique microbiologique, (ii) de la méthode de test mécanique du biofilm et (iii) de la méthode d'identification du paramètre. Ces trois choix sont hautement liés et leur cohérence permet d'aboutir à des paramètres comparables.

2.2 Contributions

Cet article a été publié en août 2018 dans la revue *npj Biofilms and Microbiomes*. Les principales contributions de cet article sont :

 une réflexion sur la place de la mécanique dans la communauté microbiologique en termes d'analyse du biofilm. Il apparaît évident que l'étude du biofilm en tant que matériau permet de répondre à des problématiques microbiologiques. Parmi celles-ci : le contrôle de l'adhérence du biofilm sur les surfaces, la mesure de l'endommagement de la matrice du biofilm ou la compréhension du développement du biofilm;

- une transcription des problématiques microbiologiques en des concepts mécaniques. Selon les problématiques microbiologiques en jeu, les études mécaniques peuvent avoir des buts différents : un indicateur pour une étude de l'évolution de l'état du biofilm ou un paramètre quantifiant une limite au-delà de laquelle le biofilm perd sa cohérence ou son adhérence;
- une mise en garde sur la variabilité inhérente à la complexité et au caractère vivant des biofilms;
- la proposition de règles de bonne pratique pour conduire les études mécaniques des biofilms.

2.3 Conclusions

À l'heure actuelle, les propriétés mécaniques des biofilms sont équivoques. Les paramètres reportés dans la littérature sont difficilement interprétables et comparables étant donné le manque de normalisation dans les diverses façons dont les biofilms sont testés. La définition de protocoles normalisés apparaît essentiel pour accorder une communauté interdisciplinaire. Un premier pas vers la normalisation est l'utilisation d'un vocabulaire unifié et de méthodologies communes pour la caractérisation mécanique de biofilms. À ce titre, après avoir exposé l'intérêt et les difficultés de la recherche expérimentale de paramètres mécaniques dans le cas des biofilms, le graphe final de cet article est une aide à la décision pour le lecteur désireux d'entreprendre de tels essais.

2.4 Article

Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms : analysis and critical review

Héloïse Boudarel^(a), Jean-Denis Mathias^(b), Benoît Blaysat^(a), Michel Grédiac^(a)

(a) Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, F-63000 Clermont-Ferrand, France

(b) Irstea, UR LISC Laboratoire d'ingénierie des systèmes complexes, 9 avenue Blaise Pascal, CS 20085, 63178 Aubière, France

Correspondence to H. Boudarel e-mail : heloise.boudarel@uca.fr

Introduction

Biofilms are commonly defined as complex systems, comprising consortia of bacteria lodged in a three dimensional extracellular matrix. Unlike the planktonic lifestyle, biofilms offer bacteria, protection against environmental, chemical, and mechanical stresses (Stewart and Costerton, 2001). The matrix fills the space between bacteria and produces a mechanical cohesive stability. Thanks to this stability, microorganisms embedded in biofilms possess a high survival and persistence potential. Biofilms are accordingly ubiquitous, and will colonize all surfaces in non-sterile environments that offer sufficient humidity for microbial life. Evidence has gradually accrued showing that the proportion of bacteria living in biofilms is largely predominant over planktonic bacteria. Recently, the biofilm has been considered as the default bacterial lifestyle, and it is thought that planktonic single cells may only be a transitional lifestyle of bacteria (Kragh et al., 2016). Over the past decades, the microbiology community has taken a growing interest in biofilms (Høiby, 2014), and the importance of biofilm life is now universally recognized. Biofilms are considered as a contamination vector because the detachment of biofilm bulk fragments under flow conditions facilitates bacteria dissemination and thus contamination. They remain therefore a potential cause of serious and persistent problems (Fisher et al., 2017). Particularly, the biofilm lifestyle promotes bacterial colonization in medical devices, and more generally in all biomaterials (Busscher et al., 2012), enhancing nosocomial infections (Donlan and Costerton, 2002) or worsening pathological conditions (Zegans et al., 2005). Nevertheless, biofilms are progressively intentionally engineered in biotechnological and bioengineering process. Indeed, diverse ecological processes exploit biofilm stability, particularly in bioremediation, wastewater treatment (Martin and Nerenberg, 2012), and biofuels or nanomaterials synthesis (Ng et al., 2015). Characterizing biofilms is thus a broad concern with far-reaching societal implications. Dealing with the socioeconomic implications of biofilms thus requires a full understanding of the mechanisms underlying their persistence, dissemination, and transmission. A deeper understanding of mechanical behavior of biofilms is required to help eradicate or control harmful biofilms as it measures how bacteria bind together and biofilm dissociates. For instance, enhanced knowledge and advanced modeling of the mechanical properties of biofilms are crucial to understand the physical stability of biofilms, help improve cleaning procedures (intensity of the mechanical load of jet), help optimize operational parameters (fluid flow in water distribution pipelines) or help develop therapeutics strategies. In this context, many research groups have been working on these structured ecosystems (Azeredo et al., 2017). Since the early 2000s biofilm mechanics has emerged as a research theme. This aspect has been extensively reviewed in recent studies (Even et al., 2017; Fabbri and Stoodley, 2016; Guélon et al., 2011; Böl et al., 2013; Billings et al., 2015; Gordon et al., 2017). The biofilm field attracts the attention of transversal communities and is getting abundant. Studying biofilms is challenging owing to their inherent properties : structurally they are highly heterogeneous and complex; in addition, bacteria are living systems and biofilms evolve rapidly. Intrasample and sample-to-sample variability in results are thus to be expected. Furthermore, many different mechanical testing methods are used in the community, and literature values often differ by several orders of magnitude (Böl et al., 2013) for the same bacterial strain. In the following, "bacterial strain" will refer to the kind of bacteria (Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus mutans, ...) whereas "strain" alone will refer to the mechanical term meaning the deformation of the biofilm matter under an applied load. It is a recurrent discovery that results are highly method-dependent. Difficulties in implementing these numerous tests and interpreting their results can lead to misleading conclusions. Yet the identified mechanical properties are then used to compare protocols such as antibiotic screening. Nowadays, the research community aims at introducing standards to manage and to analyze biofilms data in order to facilitate their comparison. Efforts were already being made to homogenize the process across the biofilm field. For instance, two platforms, MIABiE (Lourence et al., 2014) (Minimum Information About a BIofilm Experiment) and BiofOmics (Lourence et al., 2012) have been implemented to provide first public guidelines about the minimum information required that must be documented and stored, and then the database which collects biofilm experiments data on a systematic and standardized basis. Nevertheless, the mechanical interpretation of results has seldom been correctly addressed or emphasized in the literature. Here we review the issues and difficulties of the mechanics of biofilms. Beyond an update of the technical aspects of existing methods available for characterizing biofilm materials, our main purpose is to question microbiologists on the relevance of the available parameters, on the way to perform mechanical tests and on the necessity to share a unified terminology and protocols in the biofilm community. Finally we offer the reader guidelines that can be used as a support for deciding which is the best method for identifying mechanical properties and to choose which of these properties is the most relevant. Concerning the relevance of these properties, the aim is not to provide standards but rather common bases and good practices for the evaluation of mechanical parameters. Indeed, the issue of standardization is too fetched. This is the main task of standard-setting body.

Biofilms mechanics : a microbiological significance

Mechanical parameters are an appealing outcome for microbiologist and the role of mechanics should not be underestimated. The mechanics of microbial biofilms is a crossdisciplinary theme that brings together concepts of engineering mechanics, chemical, physicochemical, biochemical and microbiological knowledge. Here we present the microbial objectives that should require a mechanical approach.

Understanding the biofilm life-cycle

Impact of environmental stimuli on biofilm formation The matrix accounts for up to 90% of the dry mass of biofilms and is linked to many functionnalities within the biofilms life-cycle (Flemming and Wingender, 2010; Flemming et al., 2016). A fuller understanding of the mechanical properties of biofilms would help elucidate the interplay between the molecular mechanisms that govern the life cycle of a biofilm (Karimi et al., 2015), from adhesion to dispersal (McDougald et al., 2012). In their natural environment, biofilms are subject to external loads as fluid flow. It has been shown that bacterial mechanosensing gives rise to an active response to mechanical stress (Even et al., 2017). Biological responses are influenced by changes in biofilm physical integrity. Hence the mechanical characterization of biofilms would definitively provide a better understanding of biofilm formation, and more specifically of the roles the different protagonists play in the microbial community (Tallawi et al., 2017). Mechanics influences differentiation of bacteria (Belas, 2014) and similarly, bacterial differentiation spawns various biofilm physical features. The link between bacterial mechanosensing and changes on biofilm mechanical properties has to be further explored but it already exists evidences on the relationship between the two mechanisms. Shear stress has been shown to infer on biofilm structure for Bacillus cereus (Lemos et al., 2015) and Pseudomonas fluorescens (Araújo et al., 2016). Shear stress affects production of the exopolysaccharides which constitutes the biofilm matrix such as Pel or Psl in the biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* (Chew et al., 2014). Stress has also been shown to increase cyclic di-GMP level (Rodesney et al., 2017) which is directly linked to the type IV pili expression, governing the transition from planktonic form to biofilm lifestyle (Ribbe et al., 2017) for Pseudomonas aeruginosa. Growth and competition for nutrients leads to different patterns of cells colony in *Pseudomonas ae*ruginosa (Ghanbari et al., 2016; Klausen et al., 2003). Studying mechanical properties could explain the mechanisms promoting distinct colonization shapes. The differentiation of bacteria tends to favor biofilm survival potential, and enhances its mechanical strength. The mechanical behavior is partly a function of bacterial gene product and studies related to operating conditions show that chemical stimuli (pH,nutrients,surfactants,etc.) and mechanical properties are closely interdependent (Rühs et al., 2013).

Viscoelastic behavior Until now the microbiological community has agreed that biofilms are viscoelastic materials (Shaw et al., 2004; Di Stefano et al., 2009; Klapper et al., 2002). In other words, biofilms are able to dissipate energy coming from external forces and to withstand external mechanical stress (Peterson et al., 2015). The mechanics of biofilms is an important factor in determining how biofilms break up, disperse, and seed new biofilms under mechanical perturbation, such as flow (Stoodley et al., 2002). Mechanical properties of the biofilm can explain the trends towards the biofilm either spreads and colonizes new surface or strengthens. Especially, an important issue in health sector is the formation of flexible three-dimensional filaments called streamers (Kim et al., 2014; Wang et al., 2016; Stoodley et al., 1999) which give rise in clogging pipes in medical devices. This phenomenon is highly linked to the mechanical properties of EPS matrix (Tierra et al., 2015), especially the viscoelasticity.

Antimicrobial screening Mechanics of biofilm also deals with the screening of antibiofilm molecules. Prophylaxis and treatments are seldom issued with considering the possibility of a biofilm-related infection and most of antibiotics dedicated to planktonic bacteria often fail (Bjarnsholt et al., 2013a). One reason for the inefficacy of current treatments is the increased tolerance or resistance of biofilms to antibiotics (Høiby et al., 2010). The poor diffusion of drugs in the biofilm, and the transformation of cells into persisters (Fisher et al., 2017) favor the recalcitrance of biofilms. Finding active antibiofilm substances and their corresponding efficacious doses is a major goal of current research in microbiology (Bjarnsholt et al., 2013a; Kostakioti et al., 2013). Biofilm resistance to antibiotics is highly dependent on the structure of the EPS matrix. One possible strategy is to target the extracellular polymeric substances with matrix-degrading enzymes or with quorum-sensing inhibitors (Bjarnsholt et al., 2013a). Change of mechanical properties (Brindle et al., 2011; Jones et al., 2011; Rühs et al., 2013) of biofilm upon antibiotic treatment can be a mediator to determine the operating mode and efficiency of an antibiotic (Zrelli et al., 2013). These parameters would act as biomarkers of biofilm-related infection progression or slowdown. Mechanical properties are used to determinate the impact of biocides on EPS matrix integrity. Several studies have observed the effect of biocides on the biofilm mechanical response (Rodgers and Murdaugh, 2016). For instance, Pseudomonas aeruginosa and Streptococcus epidermis biofilms are modified by ciprofloxacin, glutaraldehyde and urea (Jones et al., 2011). The study of the time course of mechanical properties before and after a treatment allows the screening of new entities able to inhibit or delay the formation of biofilms. Mechanical properties help determine the operating mode of an antibiotic, a biocide or any compound, e.g. whether it merely disperses the biofilm by impairing biofilm cohesion, or actually kills the bacteria. Moreover, one promising prospect is to combine chemical and mechanical strategies (Bjarnsholt et al., 2013a; Zrelli et al., 2013) to target viscoelastic properties of bacterial biofilms. The chemical treatment reduces the cohesiveness (Stewart, 2014) or the stiffness (Rodgers and Murdaugh, 2016) of biofilms, and thus decreases the force needed to eradicate them or enhance the diffusion of biocides within the EPS matrix (He et al., 2013). The mechanical properties of biofilm could be used to probe quantitatively the biofilm cohesiveness, make clinical diagnoses, or adapt therapies to types of infection. Another need in chemical screening is the development of methods or devices to detect the presence of biofilms promptly before (Chavant et al., 2007) and after selected treatments, or simply to diagnose biofilm-associated infection stages (Hall-Stoodley et al., 2012).

Designing mechanical monitoring strategies

Both harmful and beneficial biofilms are challenged naturally by mechanical forces. In the first case, the design of mechanical cleaning strategies requires knowledge of biofilm strength. In the second case, a study of the mechanical properties of the biofilm is needed to sustain the reliability of the biofilm functions. Understanding what determines the strength of the biofilm is thus a major issue for microbiologists. Controlling the mechanical stability of biofilm offers one lever for monitoring their presence.

Mechanical removal of biofilms Using biocides in antibiofilm strategies is sometimes inappropriate for biofilms outside the body or unsuccessful due to increasing resilience of biofilms to antibiotics and remaining biological substrates susceptible to be reused by bacteria (Koo et al., 2017). Repeated applications of cleaning cycles on industrial setup (Al Ashhab et al., 2017) or on medical devices as endoscopes (Alfa and Howie, 2009), tracheostomy tube (Rodney et al., 2016) have been shown to be a failure or to enhance the opposite effect and promote the resistance of bacteria. Mechanical force is another management approach in order to weaken and clear biofilms while bacteria show rising antibiotic resistance. Unlike the chemical strategy, mechanical removal is not a species-specific way to eliminate the biofilms. Biofilm management involves removing biofilms by imposing a flow or a mechanical load to overcome forces which keep the biofilm together and bonded to the surface. The detachment can be partial - cohesion loss - or complete - adhesion loss. The EPS matrix supports the mechanical stability of the biofilm through physico-chemical interactions. The aim is to disassemble EPS matrix or to detach biofilm clusters by weakening the cohesive forces. Measuring the ability of biofilms to withstand stress provides information and indicates future directions for the design of biofilm-cleaning tools. Mechanical studies measure parameters which enrich mechanical models and then improve the comprehension of the behavior of biofilms subjected to forces. Many studies have accordingly sought to determine at what point a biofilm fails or disperses when exposed to loading, in particular under the influence of hydrodynamics stress (Irsfeld et al., 2014). In medical devices, surfaces are often cleaned using a pressurized water brush, in the same way that cariogenic biofilms are commonly removed mechanically with a toothbrush, but a more drastic method consists in generating a fluid stress in the form of high-velocity water droplets (Rmaile et al., 2015; Cense et al., 2006c), microsprays, water jets, or air bubbles (Fabbri et al., 2016b). Actually, fluid jet lavage is used to remove infected bacteria from tissue or abiotic surface. Moreover, it is now well known that the biofilm life-cycle includes dispersal (McDougald et al., 2012; Uppuluri and Lopez-Ribot, 2016) of planktonic bacteria that enables biofilms to spread. The detachment of biofilm fragments driven by the flow can also lead to the transmission of pathogens to drinkable water (Liu et al., 2016; Abe et al., 2011). To limit contamination, microbiologists have to know precisely when detachment of biofilm fragments under flow stress occurs. Particularly interesting is then the study of biofilms behavior under fluid solicitation. The latter can cause biofilm to flow across surfaces in ripple and wrinkle structures. Another problem is the management of channel clogging by filamentous streamers (Rusconi et al., 2010). For instance, the tolerance of *Streptococcus mutans* to shear stress has been extensively studied to improve the mechanical removal of dental plaque (Cense et al., 2006a). Reclamation and reuse is problematic in terms of microirrigation issues (Peck et al., 2015). Actually, biofilm formation provokes pipes clogging and industry has to process mechanical blockages. The use of adapted flow rate of water is based on the knowledge of the shear strength of the biofilm which cover pipes. Food and engineering industries need physical biofilm cleaning with strong shear flow (Ferrando et al., 2017; Houari et al., 2008). In addition to being reliable, the mechanical cleaning solutions should be eco-friendly (Peck et al., 2015). Furthermore, mechanics can be used as a mean to deliver more efficaciously antibiotics (Fabbri et al., 2016a). Mechanical action is a possible way to increase the antibiotic susceptibility by enhancing chemical diffusion or the action of antibiotics (Aggarwal et al., 2016) which are more efficacious on planktonic bacteria.

Preventing biofilm formation The most obvious strategy to forestall biofilm formation is to prevent the attachment of planktonic cells. Concerning biofilm prevention, the main antifouling strategies are surface coating (Vasilev et al., 2009) and surface physicochemical modification (Hasan et al., 2013). Development of such surfaces is highly inspired of biomimetics (Bixler and Bhushan, 2012). The principle is to offer an unfavorable substratum to avoid the bacterial adhesion and the biofilm formation. Understanding and quantifying biofilm adhesion capacities provides a way to compare surfaces and environmental living conditions, opening perspectives for designing hygienic surfaces to which bacteria cannot initially adhere and where a biofilm will thus not form. Mechanical properties can serve as quantitative criteria against which performance can be measured. Release of biocides or silver from surface coatings, micropillars (Chew et al., 2016; Epstein et al., 2011) or bioinspired nanostructural topography (Tripathy et al., 2017) are some examples of strategies used in low adhesion surfaces. The control of topographical and physio-chemical properties of the substratum such as roughness, charge, tension, and hydrophobicity, stiffness (Song et al., 2015) may offer insights for developing surfaces that inhibit biofilm formation. The conditioning film, the layer formed on a solid surface by the adsorption of organic matter, can either enhance or reduce initial attachment of bacteria according to its composition.

Benefiting from biofilms in bioprocesses Biofilm stability, availability and low cost make the biofilms the solution for many bioprocesses, in which they are used for these actions on deleterious organic and inorganic components (Schachter, 2003) or for these bio-electrochemical properties. Actually, due to the stress protection and adaptation provided by the matrix, bacteria living in biofilms are preferred over planktonic one in many bioprocesses. Bioremediation benefits from the metabolic reactions for the clean-up of environmental pollutants such as hydrocarbon contaminants or heavy metals using microorganisms (Singh et al., 2006). Biofilms are used in bioreactors for the production of desired compounds or for these applications in bio-nanotechnology (Ng et al., 2015). Benefiting biofilm formation and mechanical stability must be controlled as biofilms experience compressive, tensile or shear forces in real-world situations and these solicitations can damage beneficial biofilm.

Knowledge on biofilm mechanics is of particular interests for effective design and use of applications in which biofilms are either actively or passively involved. More specifically, parameters inferred from mechanical studies enrich mechanical models and help improve the comprehension of the behavior of biofilms subjected to environmental stress or user stimulus. For instance, knowing when the biofilms loss its rigidity is an appealing outcome to better deliver drugs in the case of cleaning procedures. Furthermore, cohesive forces can be sought using mechanical models to optimize operational parameters in physical removing strategies. Hence, developing an interdisciplinary understanding of bacterial biofilms behavior seems to be relevant to prevent their formation, treat biofilm-related infections, disrupt recalcitrant biofilms or harness the metabolic properties of biofilms.

Measuring relevant mechanical parameters

The biofilmology community has to reach an agreement on the parameters at stakes for each of the microbiological issues. The antimicrobial screening mediated by biofilm mechanical properties, the biofilm release under the influence of an adapted flow rate of water in clogging pipes or the development of effective cleaning strategies are some of appealing issues of the mechanics of biofilms. Biofilm mechanics requires a common terminology to avoid fallacious analogies between results obtained following different routes. In the following part, we look at microbiological issues of interest in biofilms from a mechanical standpoint. The measurement of these properties following common bases is significant as it allows the determination of important tool as an antimicrobial screening index or an accurate shear stress needed to overcome clogging in water pipe. Depending on the microbiological issue discussed in the previous part, mechanical parameters can be used for several purposes : as indicators allowing to follow a change in the mechanical behavior or as a threshold value for monitoring the presence of a biofilm. A conceptual overview of the place of mechanics in the microbiological community often addressed in the literature is given in Table 2.1.

What are the microbiological needs ?	Which place for mechanics ?	Which mechanical parameter ?	Applications		
Knowledge	Indicator of	Change in material properties before failure (elastic moduli, strain)	Understanding the physical stability of biofilms Helping the development of		
about the biofilm life-cycle	behavior change	Qualitative understanding viscoelastic behavior)	therapeutics strategies (antibiotic screening) Understanding the streamer formation		
Mechanical control strategies	Threshold value	Loss of cohesive or adhesive strength	Improvement of operational parameters in irrigation systems Improvement of biofouling management in hydrated environments and cleaning procedures (detaching biofilm clusters or disrupting extracellular matrix)		

TABLE 2.1. Roles of mechanics in microbiological communi-	TA	BLE :	2.1.	Roles	of	mechanics	in	micro	bio	logical	commun	it	y
---	----	-------	------	-------	----	-----------	----	-------	-----	---------	--------	----	---

Defining mechanical variables as microbiological proxy

Defining quantitative enough mechanical parameters to transpose physical properties into an indicator allows a monitoring of the change in the rheological behavior of the biofilm, the stiffness of the biofilm matrix and other physical features of the biofilm. Especially, the study of biofilm behavior without failure is interesting to understand mechanisms governing the biofilm life-cycle. A biofilm experiencing a mechanical perturbation changes its static equilibrium. Under external load, the equilibrium is broken, molecules constituting the biofilm are rearranged and polymeric chains of the matrix are modified. When loads are below a critical value, a biofilm sample will only deform without breaking. In mechanics, the parameters at stakes for the evaluation of the material properties are defined by the framework of continuum mechanics. Contrary to discrete approaches, continuum model treats the matter as a homogenous whole in terms of mechanical properties. It is a simplification where biofilm spatial heterogeneities are smoothed. Stress and strain experienced by a sample during a mechanical test are linked by a behavior law, introducing material parameters. Parameters probe the resistance to shape deformation or the deformability of the biofilm. These parameters are of great interest as quantitative probes to study mechanisms of biofilm growth and development. Indeed, it is interesting to conduct mechanical analysis according to bacterial gene expression or environmental conditions to reveal potential differences in mechanisms of biofilm formation (Galy et al., 2012). Mechanical parameters allow a further understanding of how chemical treatments act, and of how mechanical loading or nutrient stress affects biological differentiation. In the case of small deformations, the molecules within the biofilm come back in their original position when the solicitation is removed. The mechanical behavior of a bacterial biofilm experiencing low loadings can be described within the framework of elasticity. The deformations are so small that the deviation from the original geometry is imperceptible, and the small errors introduced by ignoring the deformation do not warrant complicating the mathematical problem. Elastic materials have the ability to absorb strain energy. Hence a biofilm can withstand transient stress events by reversible deformation. The stiffness of a biofilm influences its behavior under a stress such as flow in channels or an air-jet on teeth (Vinogradov et al., 2004). The study of strength and stiffness can explain phenomena such as rippling or streaming behavior of biofilms under shear stress. To characterize the mechanical response of a biofilm subjected to low external load, the experimentalist can calculate various parameters, depending on the magnitude, the direction and the frequency of the load. In the case of an axial force, the Young's modulus (often written E) can be calculated as a stiffness indicator. For a transverse solicitation (parallel to the surface), the shear modulus (often written G) corresponds to the stiffness indicator. Nevertheless, biofilms may be deformed even more, may ripple or flow across the surface. Moreover, biofilms can also feature time-dependent properties like viscoelastic materials. Indeed, it is known that biofilms behave like viscoelastic materials (Peterson et al., 2013; Körstgens et al., 2001) for larger disturbances, until a yield point from which, biofilms behave like a highly viscous liquid (Körstgens et al., 2001). This means that, depending on how fast the load is applied or removed from the biofilm, the latter is able to either store or dissipate the potential energy supplied by the load. Entanglement between polymer molecules partially governs the mechanical behavior of biofilms. For small perturbations, physical repartition of entangled molecules reorganizes temporarily but the link between the molecules acts as a permanent joint. For greater perturbations, molecules are able to slide and the global behavior of biofilm becomes more viscous (Wloka et al., 2004). Energy dissipation is an important property that most biofilms possess, because it lets them adapt to high forces instead of being destroyed. The use of the linear elasticity assumptions would be an oversimplification and elastic moduli evoked before are no longer valid. In this case, the viscoelasticity framework is preferably used. Viscoelasticity models are identified with rheological tests such as creep recovery test or relaxation test. In a relaxation test, the sample is rapidly strained to a fixed length and the stress is recorded as a function of time. Creep recovery tests are conducted by imposing a constant stress and measuring the deformation through the time. Some rheological models are classically used to fit the viscoelastic behavior such as the Burger's model (Vinogradov et al., 2004), the Kelvin-Voigt model (Abe et al., 2012) or the generalized Maxwell model (He et al., 2013). These latter allow to identified parameters such as apparent elastic moduli (often written E_i) or apparent viscosity (often written η_i), for traction, compression or shear loadings. Elastic moduli are time-dependent. Another type of test used to measure the moduli is the Dynamical Mechanical Analysis (DMA). The sample is solicitepd by a sinusoidal oscillating stress. Parameters inferred from these tests are called storage modulus (often written E') and loss modulus (often written E''). Elastic, viscoelastic and plastic parameters have often been studied in the literature to determine behavior before failure under load, or the dissipative effects of the biofilm behavior. Viscoelastic modulus has already been measured under shear stress (Klapper et al., 2002; Towler et al., 2003; Houari et al., 2004). Static tests report values of thickness (Paramonova et al., 2007), elastic parameters (Körstgens et al., 2001; Dunsmore et al., 2002) and tensile strength until mechanical failure (Poppele and Hozalski, 2003).

Characterizing biofilm failure

The EPS matrix largely contributes to the biofilm together and the biofilm failure is related to the EPS loss of integrity. EPS matrix is made of many components among which polysaccharides, proteins, nucleic acid or lipids. The concentration of polysaccharides is generally high and polymer chains are therefore entangled. The composition of EPS matrix changes according to bacteria strain, growth conditions and nutriment availability. Through the life cycle of biofilm, physico-chemical binding forces (Flemming et al., 2000) between these components manage the biofilm formation. At early stage, the contact of planktonic bacteria with the substratum involves electrostatic and Van der Waals forces. Then bacteria enhance the adhesion with ionic attractive forces or hydrogen bonds (Flemming and Wingender, 2010). Biofilm failure management consists in overcoming or controlling these internal forces. When dealing with biofilm failure, these physico-chemical force have to be overcome. Cell-to-surface adherence is measured to control tolerance to shear, and so the potential of biofilm survival under mechanical solicitation. Adhesion characteristics include adhesive pressure, which measures the applied stress needed to induce the removal of biofilm fragments from the substratum. Adhesive capacities of a biofilm can be inferred from tests in hydrodynamic conditions to simulate microirrigation conditions (Ohashi and Harada, 1994; Peck et al., 2015; Shumi et al., 2013), or with directly imposed forces (Lau et al., 2009b; Chen et al., 2005). Under hydrodynamic conditions, the biofilm undergoes a pressure due to the fluid, and the percentage reduction of the biomass or of the surface coverage is measured. Another relevant physical property is biofilm stickiness, a measure of the retraction capacity between a biofilm and a surface after a brief contact. Adhesive strength depends closely on surface properties : roughness, wettability, surface energy and hydrophobicity of the substratum (Das et al., 2011; Bohinc, 2014). Biofilm detachment is a natural phase in the biofilm cycle (Uppuluri and Lopez-Ribot, 2016; Mc-Dougald et al., 2012). The biofilm life cycle includes a phase of active dispersal, triggered by various signals such as starvation, which allows the cycle to continue. However, biofilm dispersal is also due to passive dispersal by sloughing (Rice et al., 2005), erosion or rippling in the case of shear stress. Biofilm bacteria can move in numerous ways : collectively, by rippling, rolling across the surface, or by separating in clumps, and individually, through a "swarming and seeding" dispersal. Two modes of detachment have so far been observed. Erosion is a surface phenomenon : it can be summarized as a detachment of a few cells or small aggregates at the top of the biofilm, at the fluid/surface interface. Sloughing is a more significant phenomenon in terms of quantities of detachment : sloughing is the term used to define the detachment of large pieces of biofilm (Telgmann et al., 2004). The link between the location of a decrease in bacteria density and the detachment of large pieces of biofilm has already been studied. In both cases, the detachment of biofilm results from a loss of integrity of the matrix, also called failure. Cohesive failure occurs when parts of the biofilm separate, while some others remain attached to the substratum. When the biofilm detaches from its base at the biofilm/surface interface, the failure is referred to as adhesive failure. Cohesive failure occurs when load exceeds ultimate strength of the biofilm itself, adhesive failure when stress is greater than adhesive resistance. These latter two are expressed as the ratio of a force and a surface area, or an energy. These are the relevant parameters to use when studying the conditions under which biofilm failure occurs. The relevant variables are limit shear stress (Coufort et al., 2007; Shumi et al., 2013), adhesion strength (Ohashi and Harada, 1994, 1996; Cross et al., 2007; Safari et al., 2015), and cohesive energy (Ahimou et al., 2007). The overall aim is to find the right conditions under which the biofilm can be actually destroyed (Hwang et al., 2014). Moreover, viscoelasticity has to be studied to define the resistance to biofilms destruction by mechanical forces. Actually, the viscoelasticity of biofilms participates to their recalcitrance.

Challenges in biofilm mechanics

A biofilm is not a straightforward material : it is a complex, highly heterogeneous living medium, and so is constantly evolving. Such properties yield high variability in results that have to be taken into account. This section draws attention to the high variability in the mechanical responses of biofilms and the difficulty to have repeatable results, which are among the main obstacles when dealing with the standardization of the biofilm mechanical characterization. The measurement of mechanical properties needs to reach an agreement in the community in order to validate protocols such as screening of molecules, cleaning procedures or adjusting operational parameters in industry impacted by biofilms presence.

A biofilm is a living material

Because a biofilm is a living structure, its shape and mechanical characteristics change over time. Biofilm structure and mechanical properties depend strongly on the growing environment (Oh et al., 2007, 2009). The temperature, surface energy and hydrophobicity of the substratum (Das et al., 2011), pH (Rühs et al., 2013), flow rate in fluid conditions (Paramonova et al., 2009b), and nutrient and oxygen availability are some parameters liable to affect the differentiation of bacteria and biofilm formation. Changes in the growth conditions may impact the physical properties of a biofilm, which in turn are linked to its mechanical properties (Paul et al., 2012). Overall, the growth conditions act on the biological and physical behavior of bacteria according to their survival potential. Bacterial specificity can change during the life of a biofilm due to the properties of bacteria as living organisms. This is why, it is nearly impossible to have a standardized sample shape like a test specimen of an engineering material and inter- testing method variability are expected. Sample configuration and experiment conditions should affect the result of the mechanical test and the comparison between two experiments. Biofilms are fragile living tissues, and are liable to be reshaped in the course of handling. This raises the possibility that the biofilm self-adapts under a mechanical load, and alters its mechanical properties to persist. Moreover, reported plastic deformations (Hollenbeck and others., 2016), i.e. permanent deformations, emphasize the need to grow biofilm *in situ*. The sample is thus not damaged before testing. In vitro studies are often used for greater convenience and minimal changes in biofilm matter. However, in vitro biofilms differ from in vivo biofilms (Bjarnsholt et al., 2013b) in their structure. The results of *in vitro* tests are only an approximation of the reality for which assumptions have to be clarified. Moreover, due to the viscoelasticity of biofilms, flow conditions may infer modification in biofilm shape. In irrigation conditions, biofilm can roll or turn into streamers (Wang et al., 2016; Stoodley et al., 1999). In that case, the experimentalist has to adapt the way he identifies the mechanical properties in terms of force applied on the biofilm and deformation of the sample. The living property of biofilm forms a significant hurdle towards the standardization of mechanical tests. It challenges the inter-experience comparison and the accuracy of the mechanical identification.

A biofilm is a heterogeneous material

A biofilm is a multiscale composite material. Depending on the point of view, the biofilm material can be seen as an homogeneous entity or as an highly heterogeneous and complex material formed of cells embedded in an extracellular matrix. As composite materials, biofilms are made of reinforcements, here the bacteria, and of a matrix, here the EPS. Moreover, biofilms is a porous matter since the EPS matrix is crossed by pores and channels through which fluid charged with nutriments can move. Fig. 2.1 represents the complex structure of a biofilm. Structural heterogeneity of biofilm is increased by permeability, nutrients and oxygen gradients (Stewart and Franklin, 2008). These gradients result in shifts in metabolic activity and impact EPS production. This stratification is accompanied by corresponding physical properties. The heterogeneity of its mechanical properties is directly related to the local microstructure of the biofilm. There is a correlation between microscale morphology, macroscale configuration and mechanical behavior of a biofilm. For example, the Young's modulus evolves with microcolony size and biofilm shape (Kundukad et al., 2016) in *P.aeruginosa* biofilms. This phenomenon is due to the increase in polymer secretion at later stages of development. The Young's modulus of the matrix polymers influences the way the biofilm develops. The mechanical parameters differ along the directions of the biofilm sample (Galy et al., 2012). Beyond the heterogeneity of the EPS matrix, the variation of cell density within the biofilm infers particular mechanical behavior of the biofilm. Homogenization techniques have been used (Guélon et al., 2013) to study the influence of the biofilm spatial structure on the mechanical parameters. Homogenization techniques showed that the stiffness of a biofilm is linked to the density of the bacteria embedded in the matrix. They also proved that the detachment phenomenon in a biofilm obtained with wall shear stress is directly correlated with the heterogeneities in stiffness within the biofilm. The volume fraction of cells embedded in the EPS matrix is then a significant factor in the biofilm integrity. Actually, the bacteria within the EPS matrix constitutes solid pores which can influence the matrix strength according to the fraction of cells. Moreover, the water content in the biofilm impacts the physical properties of the matter (Wilking et al., 2011).

FIG. 2.1. Physical heterogeneities of biofilms : biofilms are heterogeneous in their composition. a) Biofilms are made of reinforcements (bacteria) surrounded with matrix (EPS). The influence of the scale of the mechanical study is not insignificant. Moreover, metabolic gradients (oxygen, nutrient, physical stress, etc.) result in heterogeneity in mechanical parameters. b) A focus on the internal composition reveals that EPS matrix is made of many components. Entanglements of molecules within the EPS matrix have a key role in the biofilm behavior.



The biofilm characteristics discussed above make mechanical study challenging. Most experimentalists consider biofilm to be a homogeneous material, and so analyze mechanical responses averaged over the whole sample material. However, almost all biofilm characteristic properties such as biomass, concentration of chemicals or gene expression, measured at the micron scale, have been shown to exhibit strongly heterogeneous spatial distributions. Averaging biofilm at the macroscale smooths out its heterogeneity. Bulk parameters may be significantly different than microscale parameters (Safari et al., 2015). Thus the choice of the scale of the mechanical study is important.

Implications in mechanical characterization

Any practitioner in biofilm mechanics has to be aware of the variability in the results of the measurements. Different setup lead to different result. Actually, medium used, planktonic model, flow situation, temperature and sampling point are various parameters which can vary the results. Moreover, in mechanics of materials, a test sample is assumed to be homogeneous or structurally determined, although a test result is always disturbed by noise during measurement, and so there is some variance in the results. By contrast, in biofilm mechanics, the sample is always different between two successive tests because of the inherent variability of the biofilm : in addition to the variance of the measurements, there is thus a further variability in the values which are reported. In the literature, deviations among reported values for the mechanical parameters may be due in part to differences in sample origin : bacterial EPS production or physical and chemical origin. However, it is likely that the difficulties met in conducting any mechanical study of biofilms include non-biological sources of variation. The complexity of this material makes any mechanical study of biofilms challenging, and identifying mechanical parameters especially difficult. This following section aims to call the reader's attention to the intricacies of biofilm study, when several microbiological targets need reliable quantitative indicators to draw up and compare protocols for improved control of biofilms.

Mechanical tests are abundant

Lack of standardization results in a great diversity of biofilm tests. The practitioner wanting to test a biofilm sample is faced with a bewildering array of available tests. Furthermore, methods for identifying parameters are not always clear. For classic engineering materials such as steel or concrete, testing devices and methods for the identification of mechanical parameters are largely known, and machines for standardized tests are available in most laboratories. It is tempting to transpose to biofilms, techniques that are applied to classical engineering materials, but the complexity of biofilm structure means that the conventional mechanical test benches used in industrial engineering is unsuitable. Most mechanical testing machines are sized to develop forces up to thousands of Newtons. Moreover, it is nearly impossible to secure a biofilm sample with grips for a tensile strength test and extensiometric sensors are inefficient for the measurement of biofilm deformation. The experimental determination of mechanical properties is thus a quite demanding task for materials like biofilms. In addition, the properties that describe the mechanical capacities of a biofilm are remarkably numerous and varied. Their identification is a further challenge, in view of the diversity of testing methods that take various approaches and report different results.

Dedicated mechanical devices

The difficulty of any mechanical study lies in best matching the model with the real behavior of the biofilm, and identifying its parameters. This generally relies on reverse approaches, i.e. the determination of causes from effects. In practical terms, we measure the stationary or the time-dependent response to an imposed load or displacement. The process of identification then requires experimental data obtained from mechanical testing. Identification and testing steps are thus highly interdependent. Characterizing the mechanical properties of a biofilm relies then on the consistent combination of practical devices, microscopic techniques, and analytical methods. There is no method that will identify all the mechanical characteristics of a biofilm with a single test. Each method provides one or two parameters, based on a set of mechanical assumptions. The large number of methods emerged from several scientific groups attests to the complexity of the mechanical study of biofilms. The choice of the mechanical test and measurement device depends on the type of biofilm (biofilms on a solid surface or at the air-liquid interface), the spatial scale of the parameter involved (cf. section "Measuring relevant mechanical parameters"), the identification model and the range of the load or of the corresponding parameters. Knowing how to choose the most relevant technique to obtain the data needed requires specialist insight, knowledge, and experience. The literature seldom specifies a domain of validity for each method of characterizing biofilms. The techniques used for their characterization have been fully described in previous work (Guélon et al., 2011; Böl et al., 2013; Billings et al., 2015). They are based on rheology, microrheology or engineering test. They are briefly reviewed in what follows. The main criteria for the validity of a standard method are reproducibility, repeatability, relevance, and ruggedness. Two main strategies for loading and measurement are outlined : the measurement of macroscopic properties for the whole tested biofilm, and the calculation of microscopic properties within the biofilm. The methods are illustrated in Fig. 2.2. Their domains of applicability will be fully exposed to the reader in the following guideline section "Guidelines for studying mechanics".

Biofilm considered as a homogeneous material

Despite the heterogeneity of biofilms, bulk parameter testing devices are still often used to characterize their macroscopic mechanical properties. Bulk rheology offers the advantage of being easier, but it requires making significant simplifications to the mechanical parameters. The best-known tool for the rheology of viscoelastic materials is the rheometer. It is still largely used because of its ease of application and its availability in most laboratories (Safari et al., 2015; Hollenbeck and others., 2014). It is also possible to cultivate *in situ* biofilms on the rheometer disks in a growth reactor under a rotational fluid shear stress, and so biofilms samples are not scraped. Moreover, the rheometer allows to conduct dynamic tests thanks to its oscillatory mode (Klein et al., 2015). One of the limitations of this device is the need for a large amount of biofilm to cover the rheometer plate. Another drawback of this method is the non-constant shear rate across the radius

FIG. 2.2. Illustrations of the most popular mechanical tests on biofilms available in the literature. (a) Uniaxial compression test; (b) Shear stress in a rheometer;(c) Hydrodynamic shear stress imposed with a Couette-Taylor reactor; (d) Fluid dynamic gauging; (e) Microirrigation condition in a flow cell; (f) Microscale tensile test with a micropipette cantilever; (g) Microscale indentation test; (h) Atomic force spectroscopy – nanoindentation; (i) Microbead force spectroscopy; (j) Microrheology with magnetic tweezers; (k) Particle tracking



of the sample, which complicates the mechanical identification. It is worth noting that, usual rheometers can also be used to perform uniaxial compressive tests. Stress/strain curves are derived from the measurements of biofilm depth and axial force exerted by the upper plate (Körstgens et al., 2001). The main remaining difficulty is the biofilm sample bulging. Compression testing has also been implemented between two glass rods (Safari et al., 2016). Low load compression testing (LLCT) has been more recently developed for uniaxial compressive tests. The difference is the 2.5 mm diameter cylinder upper plate that bears down on the biofilm sample with up to 20% strain (Paramonova et al., 2009b, 2007). The same properties as for compressive tests are then inferred. Other custom-built devices have emerged since the early 1990s but have been used with more sparsity. Centrifugation (Ohashi and Harada, 1994) technique have been used to measure cohesive shear stress. Biofilm-bearing plates are placed on a rotary table, perpendicularly to the radius of rotation. The biofilm experiences a body force acting in the plate's normal direction that pulls it away from the adhesion area. This leads to the detachment of the biofilm when the adhesion strength is overcome. This corresponds to the stress before the detachment of the biofilm. However, the output data are not easy to interpret. Much depends on the intrinsic parameters of the centrifuge machine such as the discretization of the centripetal acceleration. Moreover, extraneous effects can occur : gravitational force may cause vertical deformation during the fixation of the sample on the rotary table; continuous acceleration may cause gradual detachment of different masses; the centrifugation results in residual inertial force causing shear stress that may contribute to premature detachment of the biofilm. For tensile strength tests at macroscopic scale, biofilm grows at the external surface of a pair of adjacent tubes (Ohashi et al., 1999). One of the tubes is loaded axially so that the tubes are pulled apart until they separate. Using a camera, measurement can be made to determine detachment and plot a stress/strain curve. For tensile test on pellicle-shaped biofilm (Hollenbeck and others., 2016), the device is reconsidered as the

tension is applied in the horizontal plan, at the air liquid interface (Trejo et al., 2013). Flow-cell remain a largely used technique for the study of cohesive shear strength or of the viscoelastic behavior of biofilm in irrigation conditions. In flow shear stress experiments, a biofilm grows in a microscale channel under a laminar flow. To test the biofilm, the flow shear rate is modified and the displacements of biofilm clusters are imaged with a camera. The flow cell is a versatile and relatively cheap technique which allows a precise manipulation of the fluid flow. Most laboratories already use this well-known method. These main practical drawbacks are the uncertain knowledge of the force applied to the biofilm surface and the need of numerical integration. Basically, the main source of problems in mechanical measurement is the uncertain value of the stress directly applied to the biofilm. More recently, fluid dynamic gauging has been implemented for testing biofilms in microirrigation conditions to circumvent this. This uses a biofilm-non-contact device : a gauge nozzle of known diameter is immersed in a liquid and placed under a thin biofilm, at a set distance. A pressure drop is imposed across the nozzle, causing flow of liquid through it. This technique determines thickness, cohesive and adhesive strength of the biofilm in resistance to shear stress (Peck et al., 2015; Ali et al., 2015; Möhle et al., 2007). The shear stress imposed on the biofilm depends on the pressure drop, the nozzle-to-biofilm distance, and the nozzle diameter (Chew et al., 2004) and is thus known.

Considering biofilm heterogeneity

As discussed previously, biofilm mechanical properties present spatial heterogeneities due to the biofilm structural organization. Since the beginnings of biofilm observation, the development of technologies such as confocal laser scanning microscopy (CLSM) (Lawrence et al., 1991) have allowed the tracking of biofilm deformation under loads at smaller length scales. The testing devices developed in the community for the study of biofilm sometimes derive from living cell mechanics or from classical rheology. At the microscale, uniaxial compression tests are possible with microindentation devices. The microindentation device is a testing machine that applies a known force at the surface of a biofilm grown on a glass surface with an indenter. In microscopic compression, a microindenter of known geometry (conical, spherical, flat plate), and of small dimensions compared with the sample to be characterized is used. The indenter compresses the material locally and gradually. A curve of applied load versus indenter depth is experimentally plotted during a cycle of loads and during an unload. The displacement of the tip is recorded and a stress/strain displacement is plotted. This method determines elastic parameters during compression experiments or viscoelastic characteristics in relaxation tests. The advantage of microindentation is the possibility it offers of determining mechanical properties at a small scale (Cense et al., 2006b). One of its main drawbacks is that compression is not the natural force a biofilm is most likely to undergo. For several years atomic force microscopy (AFM) has been largely used for the characterization of viscoelastic parameters and adhesive properties. This technique is feasible in static or dynamic mode. AFM measures adhesion and cohesion force (Ahimou et al., 2007; Lau et al., 2009b). AFM is also a common technique used for imaging surfaces, and probing the 3D mapping of surface roughness. For the study of adhesion, diverse modified tips have been implemented in AFM, such as coating or probe tips. The range of applied forces is wide : from piconewtons to several nanonewtons. Coated tips have been used to characterize adhesive properties and viscoelastic characteristics (Lau et al., 2009b). Thanks to its simplicity which signifies here reliability and easiness of implementation, numerous mechanical testing devices rely on cantilever. For instance, a microcantilever is used to test biofilms with tensile stress (Poppele and Hozalski, 2003). The biofilm sample is pipetted with one or two pipettes. One pipette serves as a microcantilever. The tensile test is recorded with a video capture device to obtain the deformation of the biofilm part. Stress is deduced from the deflection of the cantilever from its initial position and its bending stiffness. Adhesive profiles have recently been investigated with the retraction curves based on a microscale AFM method (Safari et al., 2016). Some research groups have designed custom-built devices for the characterization of biofilm properties. The T-shaped probe (Chen et al., 2005) is a micromanipulation technique used to study adhesive strength. The work per unit of area needed to remove the biofilm with the T-shaped probe is measured. More recently, several microrheology techniques have been adapted to the study of biofilms (Rogers et al., 2008; Galy et al., 2012; Cheong et al., 2009). Optical tweezers use a laser beam focused on a polarizable particle. Magnetic tweezers are paramagnetic beads embedded in the biofilm, which are moved with a permanent magnet or an electromagnet (Galy et al., 2012). These techniques give access to the microscopic, localized properties of biofilms. They use microscopic probes embedded in the biofilm medium. In the same way, passive microrheology consists in recording the movements of inert beads embedded in the biofilm. No forces are applied on the beads : their displacement is thus due only to the thermal fluctuations. To determine the elastic properties, the particle motion is assumed to be driven solely by thermal fluctuations. However, the activity of motor proteins and other non-equilibrium processes in cells also contribute to motion. Omitting to consider these effects can produce erroneous results (Savin and Doyle, 2005).

Identifying mechanical parameters : a source of confusion

In mechanics, identification means finding the values of constitutive model parameters from experimental data. The experimental measurements made with each of the above devices provide raw data. The processing of these data and the matching of mechanical forces with resulting transformation are used to infer mechanical parameters. It transpires that several methods can lead to the same parameters because they target the same mechanical phenomenon. The difficulty is to be able to choose a combination of test device and identification method that is right for both the sample and the parameters concerned. Besides the choices of mechanical test device, the identification method needs to be thought out in depth. Overall, the choice of the identification method must be made according to the mechanical parameter at stake. Likewise, the testing method should emphasize the mechanical behavior consistent with the aforementioned mechanical parameter. Fig. 2.3 shows the global methodology for the mechanical identification of parameters in biofilms study and reveals challenges that currently hampered the standardization.

FIG. 2.3. Global life cycle of biofilm mechanical studies : due to the complex structure and living properties of biofilms, challenges exist in each step of the identification of mechanical parameters. The red double lines indicate the points that are addressed in this manuscript. Overcoming these challenges is appealing as the applications of the mechanical properties must be of particular interest.



Misleading about identification

Because of the special features of biofilm matter and the diversity of available methods to test biofilms, the identification step can be a source of major discrepancies. Owing to the

variety of experimental conditions reported in the literature, caution should be exercised in interpreting data resulting from a mechanical study. As discussed above, variability is expected in the results of the same test on two samples of a biofilm grown in the same conditions. Due to these difficulties, the literature contains some misleading links between experimental data and identification methods. Most confusion occurs in the choice of the definition of elastic moduli or the choice of the behavior laws. The various ways to identify parameters might lead to different interpretations of the test and sometimes would infer unreliable results if wrong assumptions are made. In the literature, the question of whether an identification method is relevant to a particular problem is seldom addressed. A common mistake is to associate any stress / strain ratio to Young's modulus, even when the material does not behave linearly or when the geometry of the sample and the applied load is inappropriate. Young's modulus is the ratio of axial stress to axial strain. Under no circumstances must Young's modulus be calculated as the ratio of shear stress to longitudinal deformation. Moreover, many research confuse elastic and linear. Stress/strain curves and force/displacement curves are strongly interdependent in the simple case of geometric and material linearity and for axial loading. In this case, stiffness is a linear characteristic. In other cases, depending on the material behavior, loading and non linearity will affect the stress/strain curve. Nonlinear elasticity is an other existing type of behavior. In classical engineering, loadings are usually well known, in terms of direction and area of application. In the case of biofilms, surface areas under load are often imperfectly known because of the roughness of the biofilm surface or their non-regular shape. Moreover, biasing means are sometimes hydrodynamic or indentation within the matter and thus unchecked precisely. The reader has to be mindful of the homogeneity of the stress applied before using formulas. After reporting mistaken identification of Young modulus in a previous study, a research group presented a methodology (Aravas and Laspidou, 2008) for the calculation of Young's modulus of biofilm streamers. The method, based on a correct calculation of elastic parameters, explains the deviations of one order of magnitude between two results. This is the case in the linear elastic theory. Finally, the reader has to make a choice in terms of measurement resolution. We can consider a biofilm as a heterogeneous material whose properties depend on the scale at which they are calculated. Two main scales of exploration of biofilm properties are possible and relevant depending on the target of the mechanical study. Microscale parameters can be relevant for the study of biofilm metabolism and physical organization within the biofilm. Mesoscale or macroscale studies allow the determination of the influence of fluid/biofilm surface interaction or stress tolerance whereas emerging imaging techniques can be used to study biofilms with microscale resolution. Since biofilm structure is complex, biofilm properties change markedly from one point to another. Depending on the scale of the measurements, results may be different. Homogenization techniques have been applied to quantify macroscopic mechanical properties of heterogeneous materials such as bacterial biofilms (Guélon et al., 2013).

Full-field measurement methods

The heterogeneity of biofilms is one of the main challenges when we are studying mechanical behavior. We have seen that mechanical devices allow microscale parameters to be determined. However, some testing techniques probe microscale parameters in a localized part of the biofilm, whereas biofilms often exhibit different mechanical properties depending on location. An emerging tool to access the real behavior of the sample under loading is the use of full-field measurements methods. Full-field measurement techniques provide full maps of mechanical quantities of interest such as strain map over a specific biofilm region. These methods are useful when we cannot use a sensor. They are non-invasive, an important feature given that we know biofilms can be disrupted by any modifications to their environment. Finally such methods provides maps instead of localized measurements. Particle image velocimetry (PIV) and digital Image correlation (DIC) are still largely studied and used in the field of fluids and solid mechanics respectively. PIV has been used to map the displacement on pellicles loaded with axial tension (Hollenbeck and others., 2016). DIC has been implemented on biofilm clusters to measure the displacement of biofilms in flow cells under wall shear stress (Mathias and Stoodley, 2009). Both PIV (resp. DIC) relies on images of the material of interest before and during testing to determine velocity (resp. displacement) maps. Recently, another non-contact method, the Brillouin microscopy, has been implemented to probe the internal stiffness of biofilms colonies (Karampatzakis et al., 2017). The Brioullin microscopy measures a frequency shift of light incident upon the biofilm sample. The frequency shift is then correlated to an evolution of stiffness of the matter. Full-field measurements are promising identification methods especially since increasingly well-controlled image techniques and tools are becoming available. Confocal Scanning Laser Microscopy (CSLM) is also now largely used (Neu and Lawrence, 2015) and optical coherence tomography (OCT) (Wagner and Horn, 2017) is being developed and beginning to be used for biofilm studies (Blauert et al., 2015). OCT allows fast imaging up to real-time acquisition, is resistant to more extreme conditions of testing, and is faster than other imaging techniques. Full-field measurements methods are also consistent with the idea of "biofilm-friendly" growth conditions. They allow real-time acquisition, and hence easy addition of a temporal character to the mechanical test. Finally, full-field measurements are able to obtain in vivo, dynamic and multiscale information.

Guidelines for studying mechanics

The following part sets out some rules of good practices to avoid pitfalls and respond efficaciously to the challenges of biofilm study. The following reasoning is depicted in the guideline in Fig. 2.4. On the basis of the microbiological issues, the reader is invited to question on several features according to the relevance of the mode of solicitation of its biofilm sample. Four steps have been determined for the proper conduct of the mechanical study of a microbiological issue. In our opinion , this guideline is a necessary clarification to lay the groundwork towards potential standardization. FIG. 2.4. Guidelines for helping the choice of mechanical parameter, testing method and identification method. From left to right, the reader is invited to follow the different steps of the identification of mechanical parameters. In the first step, the microbiological target is determined. Then, a relevant mechanical parameter is advocated according to the conditions of solicitation of the biofilm sample. Final steps 3 and 4 suggest the reader, a choice for a mechanical setup and an identification method, which are relevant with its microbiological issues. Step 3 and 4 can be reversed depending on the circumstances.



Step 1 : Targeting the issue of parameter knowledge

The degree of relevance of the use of mechanical parameters depends on the microbiological issue (cf. "Biofilms mechanics : a microbiological significance"). Thus the characterization of the mechanical properties of a biofilm must begin with a clear definition of the microbiologist's objectives. For research into the physiological or morphological mechanisms operating inside biofilms and especially between EPS molecules, the experimentalist should probe a change of a quantitative mechanical indicator before the loss of biofilm integrity. In the case of the antimicrobial screening of novel drugs or the development of mechanical removal strategies, evaluating an accurate threshold value until which the biofilm remains undisturbed is more valuable for the direct application in industrial context. The properties of every material are defined relatively to a mechanical state of the biofilm, and different issues require different mechanical aspects to be considered. Some parameters are related only to low deformation, without biofilm failure, whereas others characterize the detachment or breakup of the biofilm. This latter can be viewed in terms of *i*- cohesive failure, when bulk parts of the biofilm detach whereas the rest of the biofilm remains attached, or *ii*- adhesive failure, when all the biofilm losses its adhesion on the substratum.

Step 2 : Choosing a type of mechanical test and a relevant parameter

It is necessary to know at the outset what kind of behavior a biofilm sample displays. If a biofilm is expected to have an elastic behavior, a static test may be done. Three types of loading lead to relatively well-known stress states : tension, compression and shear loads. Elastic behavior is consistent for small deformations only. Care must be taken to ensure that the displacement generated does not entail geometrical non-linearities (i.e. large strains). Strains of more than 10% shall be considered as large strains. If a pretest shows a time-dependent relation between applied stress and resulting displacement, then the biofilm shall be treated as a viscoelastic material. In that case, two types of tests can be performed. Transient tests include the creep test, in which a constant stress is applied and the strain is measured, and the relaxation test, in which the decrease in stress is measured under constant strain application (creep compliance). Spring-dashpot models are then used to determinate the viscoelastic modulus. For viscoelastic behavior, it is also possible to carry out dynamic tests, consisting in applying oscillating stress or strain with a known frequency. The phase angle on the strain or stress amplitude is then measured. If the behavior is viscoelastic, then the response to oscillating stress will be sinusoidal strain. The complex viscoelastic modulus G = G' + iG'' is determined with an oscillating loading, where the storage modulus G' represents the elastic part of the mechanical response whereas the loss modulus G'' reflects the damping capacity of the biofilm sample. Once the parameter of interest is determined, the scale of the sample has to be chosen. The type of test determines the scale of the objective mechanical parameters. Depending on the situation, the importance of having microscopic values will vary. For example, designing a device for removing a biofilm with a water flow may need only average

45

parameter values, whereas the study of physiological mechanisms within the biofilms will need the description of local properties, at least at the bacterial scale. It must be taken into account that the timescale of the mechanical test is also of particular importance as biofilm is a living matter which constantly evolves.

Step 3 : First determine which identification method is suitable

The mechanical test is going to give yield data that we need to process to infer mechanical properties according to theoretical models of behavior. Most of the existing mechanical tests measure raw data, force and displacement, for the test sample. In order to have general parameters, which do not depend on the particular sample but on the bacterial strains and the growth conditions, these values are converted into specific magnitudes (force per unit area and displacement per unit length). This step can sometimes be misleading. The complex geometries of the biofilm specimens with the limited two-dimensional view provided by the microscope require some simplifying assumptions that may introduce error into the estimates of the load (i.e. stress) applied to the specimen during testing. The choice of the identification is a significant step, because this is the main source of error, particularly regarding assumptions made and definitions. The identification of mechanical parameters is based on the hypothesis of simplified models. Resulting mechanical parameters depend directly on the assumptions about models for the shape of the biofilm and its constitutive law. The geometry of the sample is thus an important parameter in any mechanical study : the transfer of the external load to the biofilm medium depends closely on the area of contact. The experimentalist has to know the shape of the sample to investigate its mechanical properties meaningfully. We assume the material behavior of the biofilm is shown in the test curve profiles. Biofilms are known to be viscoelastic materials. In the case of small strains, biofilms can have elastic behavior. A force must be chosen that keeps the test sample in the linear elasticity domain. The Young's Modulus can be used only if a material has, even partly, a linear elastic behavior. In the simple case of elastic linearity we can determine stress/strain curves from force and displacement by dividing the applied load by the cross section, assuming the stress is constant throughout the sample. The slope of a stress/strain curve must not be unthinkingly equated to Young's modulus : there is a risk of distorting the physical identity of this property. An identification method can be selected according to the mechanical assumptions and the particular configuration of the biofilm to be tested. One test can be used to infer different parameters, but the identifying method can be different.

Step 4 : Then choose a setup

Once we know what kind of experiment we are going to do, we have to choose a mechanical device to implement it. Mechanical tests described in the literature allow the prescribing and the measurement of different quantities. The choice of the test method will depend on several parameters such as the microbiological objectives, the biofilm state of maturation

(a young biofilm can hardly be tested with attached tubes), the type of biofilm (bacterial or yeast biofilms, pellicle or surface-attached, etc.). Several methods can lead to the same parameters because they target the same phenomenon, but the optimal method for identification could be different. In any case, the duration of the test must be short in order to avoid evaporation of the hydrated part of the biofilm, and to be free of changes in the properties of the biofilm due to its living status. Each mechanical test has to be repeated to average the results. Step 4 and aforementioned step 3 are exchangeable, as appropriate.

Discussion and concluding remarks

Issues addressed in the article are discussed in the form of three main messages :

Mechanical properties are unfortunately equivocal

Although biofilm mechanisms are now increasingly well understood, there is still a need to study the mechanical response of biofilms. Mechanical parameters should be useful for better understanding the mechanisms within the biofilm throughout its life-cycle, for developing cleaning strategies by determining necessary mechanical forces of disruption, for optimizing industrial processes by finding the flow stress needed to override biofilm presence or for implementing antimicrobial screening. Examining in depth how better knowledge of mechanical properties can be taken into account to impact the aforementioned issues will justify dedicated studies. Several research topics take support from mechanical considerations to elucidate the complex mechanisms that operate within the biofilm during its growth and dispersal. However, the mechanical study of biofilms is still very challenging. We have seen here the gap between the desire to understand the material properties of bacterial biofilm and their successful mechanical characterization, which requires experimental data and their interpretation through an identification step. Because biofilms are complex, heterogeneous, living media, their mechanical study is still much more difficult than that of classic engineering materials. Dedicated mechanical devices for biofilms have accordingly been implemented. Each of these has a range of action, with advantages and drawbacks.

A guideline for testing biofilms is essential for an interdisciplinary community

Until now, research on mechanical parameters has often been disconcerting owing to the diversity of the testing machines available and the variations, over several orders of magnitude, of the results reported in the literature. It is difficult for researchers to find earlier results to compare with current ones. The deviation between two research groups can be wide for the same mechanical features and the same growth conditions. Bias still hamper the pertinence of the analysis of the mechanical measurements such as, amongst others, the scarcity of homogenized testing protocols, the lack of normalized vocabulary,

the difficulty of testing repeatability and reproducibly. Emerging platforms aim at standardizing and structuring the data sets required for the consistent publication of results. This makes easier the comparison of results obtained in different environments. Yet, the choice of a dedicated procedure for the identification of specific mechanical parameters still remains unclear and its implementation furthermore represents challenges upstream. Thus a "guide" to understand the issues and difficulties of the mechanical identification has been drawn up. Its objective is to clarify the bases of the different steps of any mechanical study of biofilms. Our purpose is for the novice to become more knowledgeable about biofilm mechanics and acquire a deeper understanding of the relevant mechanical testing. The guidelines proposed here will help the reader find a suitable testing device and obtain the data to be extracted according to the microbiological issue concerned and its attendant assumptions. This problem has seldom been addressed in the literature. Nevertheless, this does not constitute standards as the latter requires standard-setting body.

Developing standards relies on good practices

There arises the issue of standardizing biofilm mechanical studies. A key aspect of future biofilm research is the need for standards : a unified terminology and well described protocols are required. These guidelines are a preliminary step in the direction of a potential code of good practices. They are designed as a list of recommendations with rules for the proper interpretation of experimental data. Well-established quantitative mechanical data will enable a reliable comparison of experimental mechanical parameters within and across laboratories. Moreover, it will facilitate the peer-reviewing for the validation of data. Besides the current needs in terms of management strategies, the mechanical study of biofilms is required for the numerical implementation of biofilm models and the enrichment of databases for finite element analysis. Modeling biofilms with numerical simulations is an important part of future research. Modeling new sources of biofilms is beginning to be addressed in the literature, e.g. multispecies biofilms (Xavier et al.) or biofilm aggregates (Kragh et al., 2016). Numerical simulations also lead to better insight into biofilm permeability by modeling fluid on biofilm void (Bottero et al., 2013). The reliability of such simulations inherits from the accuracy of the implemented models and of their calibration thanks to consistent experimental testing.

Acknowledgments

This work has been supported by the CorImaBio project. Financial support has been provided by the Region Auvergne-Rhône-Alpes, the FEDER and BioFilm Control (SY-NERGIE AV 000 7381 - Convention 15CEB073). We gratefully thank Stéphanie BADEL and Christian PROVOT of BioFilm Control for their support and for the reviewing of the paper.

Author contributions

Conceived and designed the review : H.B. and J.D.M.; wrote the paper and designed the figures : H.B.; critically reviewed the paper : J.D.M., B.B., and M.G..

Additional information

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Data Availability :

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

Chapitre 3

Application de la corrélation d'images numériques à un matériau vivant : cas des biofilms

Sommaire

3.1	App	lication des méthodes de mesures de champs aux maté-	
	riau	x vivants : enjeux et problématiques	50
	3.1.1	Enjeux sociétaux	50
	3.1.2	Enjeux scientifiques	50
	3.1.3	Problématiques liées au vivant	51
3.2	Corr	rélation d'Images Numériques (CIN) : principe et forma-	
	lisat	ion	51
	3.2.1	Principe et notations	51
	3.2.2	Formalisation	52
	3.2.3	Métrologie	55
3.3	App	lication de la CIN au suivi de particules	56
	3.3.1	Choix du suivi de particule	56
	3.3.2	Suivi des billes au sein du matériau	59
	3.3.3	Localisation de la région d'intérêt	60
	3.3.4	Réduction de la région d'intérêt	61
3.4	\mathbf{Cas}	d'applications : les biofilms	62
	3.4.1	Validité de la métrologie du suivi de particules	62
	3.4.2	Essais de validation	64
	3.4.3	Principe expérimental du suivi de la formation du biofilm	70

3.1 Application des méthodes de mesures de champs aux matériaux vivants : enjeux et problématiques

3.1.1 Enjeux sociétaux

Il est devenu courant de réaliser des mesures de cartes de déformations par méthode de mesure de champs sur des échantillons de tissus biologiques, pour en déduire les paramètres matériaux de leur loi de comportement. Ce type d'approches ouvre de nombreuses perspectives pour le développement des techniques du génie biomédical. Meilleure compréhension des processus physiologiques, amélioration des traitements, prédiction et évolution de certaines pathologies, sont autant d'enjeux auxquels l'utilisation des méthodes de mesures de champs sont amenées à répondre. L'étude de l'évolution spatio-temporelle des propriétés mécaniques des matériaux vivants est une question cruciale pour l'étude de comportement *in vivo* sans contact.

3.1.2 Enjeux scientifiques

Depuis une vingtaine d'années, les méthodes d'acquisitions optiques sans contact se développent. Le recours aux mesures de champs cinématiques permet l'identification de propriétés mécaniques dans le cadre d'essais hétérogènes pour lesquels les informations des jauges de déformations ou d'extensiométrie ponctuelles sont difficilement exploitables ou trop localisées. Les méthodes de mesure de champs ne donnent plus une mesure ponctuelle unique mais un champ de mesures sur une surface. Grâce à un dialogue essai/calcul, les mesures de champs permettent l'aboutissement d'un processus d'identification de paramètres de lois de comportement ou de validation de simulations numériques. En effet, les mesures de champs permettent d'établir le lien entre les simulations et les expériences. Les essais peuvent être suivis, de manière dynamique, à plusieurs localisations du matériau testé. Divers procédés optiques ont été développés et appliqués pour la mesure de champs de déplacements. Toutes ces méthodes ne sont pas compatibles avec l'étude de matériaux vivants. Parmi les méthodes adaptées à ce type de matériau, on peut citer l'holographie numérique (Paturzo et al., 2018), la vélocimétrie par image de particules (Adrian and Westerweel, 2011) et la Corrélation d'Images Numériques (CIN). La corrélation d'images est beaucoup utilisée dans le cadre de la mécanique des matériaux et des structures notamment en mécanique de la rupture pour laquelle elle permet un suivi fin de la propagation des fissures. Cette aspect de suivi dynamique est intéressant dans le cadre des matériaux vivants. En effet, ceux-ci sont susceptibles de voir leur structure évoluer au cours du temps. De même, l'hétérogénéité de structure inhérente à leur composition et à leur organisation rend leurs paramètres mécaniques fortement variables spatialement. Dans ce contexte, les méthodes de mesures de champs permettent d'avoir une mesure d'un champ de déplacements et de déformations sur la surface du matériau. L'intérêt des mesures de champs dans le cadre de l'application aux matériaux vivants réside dans leur caractère sans contact et pour le fait qu'ils sont susceptibles d'observer des phénomènes locaux. Par ailleurs, les mesures de champs fournissent des jeux de données très complets pour les validations de modèles numériques par éléments finis. D'autre part, ils permettent de réaliser des méthodes multi-échelles, souvent pertinentes dans les matériaux composites et hétérogènes que sont les matériaux vivants.

3.1.3 Problématiques liées au vivant

L'hétérogénéité spatio-temporelle des biofilms représente un véritable enjeu scientifique mais les problématiques liées au caractère vivant de ce type de matériau sont des problématiques réelles. Les matériaux vivants représentent des échantillons fragiles qu'il convient de manipuler avec précaution. Les essais *in vitro* des échantillons vivants peuvent entraîner des remaniements qui biaisent les résultats. D'autre part, il faut s'attendre à une plus grande variabilité dans les résultats en comparaison aux matériaux courants de l'ingénierie qui sont quant à eux inertes. Dans le cas des biofilms, les conditions physiologiques requièrent souvent des méthodes d'imagerie non invasives mais la caractérisation précise de la géométrie de l'échantillon peut être difficile à atteindre. Aussi, la planéité des surfaces souvent requise pour les mesures de champs et le contrôle des mouvements hors-plan représentent des contraintes spécifiques à ces matériaux.

Dans le cas des études mécaniques sur les biofilms, les méthodes de mesure de champs ont été peu utilisées. Nous pouvons citer l'interférométrie holographique qui a été appliquée sur des gels reconstruits à partir de matrice polymérique de biofilm de *S. mutans* (Cheong et al., 2009). La vélocimétrie par image de particules a servi pour étudier la déformation de biofilms de *B. subtilis* à l'interface air/liquide (Hollenbeck and others., 2016). La CIN a été quant à elle utilisée pour la détermination de champs de paramètres élastiques pour des biofilms de *E. coli* cultivés en flow-cells (Mathias and Stoodley, 2009). Dans ce travail de thèse, un algorithme de suivi de particule basé sur la CIN a été appliqué pour le cas du matériau biofilm. Le principe et la formalisation de cette méthode de mesure de champs sont exposés ci-après.

3.2 Corrélation d'Images Numériques (CIN) : principe et formalisation

3.2.1 Principe et notations

Le principe de la CIN repose sur la comparaison de deux images numériques qui représentent l'état d'un objet d'intérêt avant et après sollicitations extérieures (Sutton et al., 1983). Pour introduire la terminologie nécessaire et mettre en avant les éléments clés de la méthode, ses principales lignes sont détaillées ici. Une image numérique est formée d'un quadrillage orthogonal à deux dimensions. La plus petite entité constitutive de ce quadrillage est appelée pixel (picture element). L'image numérique est donc une matrice de pixels quantifiés par leurs coordonnées et leur niveau de gris. L'amplitude des valeurs des pixels dépend du nombre de bits sur lequel est codée l'image. Si l'image est codée sur N bits, un pixel peut être quantifié par 2^N nuances de gris différentes. Dans ce travail, les images sont codées en 16 bits, ce qui représente un éventail de 65536 valeurs de niveaux de gris différentes. Cet échantillonnage de l'information dans l'espace et dans la profondeur des niveaux de gris définit la dynamique de l'image. La transposition linéaire d'un signal continu du matériau observé en un signal échantillonné constitué par une matrice de pixels nécessite quelques précautions. Pour pouvoir appliquer la CIN, la surface observée doit être et rester plane durant l'observation afin de ne pas introduire des différences d'échelles dans les images. L'éclairage doit aussi être constant et la dynamique de l'image adaptée à la mesure désirée.

L'objectif de la CIN est de trouver le déplacement mesuré \bar{u} correspondant au déplacement vrai \bar{u}_t d'un élément de surface entre un état initial (t = 0) et un état déformé (t). Le calcul du déplacement \bar{u} est réalisé en chaque pixels sur une portion restreinte de la surface du matériau. Cette portion est couramment désignée par son acronyme *RoI* de l'anglais "Region of Interest". La sélection d'une zone de l'image où se fait le calcul permet d'une part de s'affranchir des pixels de bord d'image qui sont susceptibles de disparaître lors de l'essai mécanique et d'autre part, de mettre de côté les zones où l'information mécanique n'est pas pertinente.

De par sa polyvalence et sa facilité d'utilisation, la CIN est l'une des méthodes de mesure de champs les plus utilisées, notamment en mécanique des matériaux de l'ingénierie. Par ailleurs, les progrès et développements des techniques d'acquisition d'images (Microscopie électronique à balayage, Microscopie à force atomique, Tomographie, ...) ont, en parallèle, multiplié les applications et amélioré les performances de la corrélation d'images numériques.

3.2.2 Formalisation

La formulation de la CIN s'appuie sur le principe de conservation des niveaux de gris entre deux images d'une même surface à des instants successifs. En mécanique expérimentale, les images utilisées pour la CIN correspondent aux surfaces intacte et déformée de l'objet d'étude. Elles sont représentées par des fonctions 2D f et g. La méthode est basée sur une comparaison de l'amplitude du signal entre l'image de référence et l'image de l'état déformé (Fig. 3.1). Les fonctions f et g représentent les niveaux de gris interpolés au pixel dont la position est repérée par ses cordonnées (x, y). Le problème à traduire consiste à déterminer \bar{u} , le champ de déplacements recherché au centre d'un élément de surface RoI.

Lors d'une transformation X, un point \bar{x} dans l'image de référence f se déplace en $X(\bar{x})$

dans l'image déformée g. Pour tout point de coordonnées \bar{x} appartenant à la RoI, la conservation des niveaux de gris entre les deux instants s'écrit :

$$f(\bar{x}) = g(\bar{x} + \bar{u}) \tag{3.1}$$

Cette égalité n'en est une seulement si on considère qu'il n'y a pas de perturbations externes des niveaux de gris (engendrées par des différences d'éclairage ou par le bruit de capteur par exemple) entre les deux images f et g. Le problème est alors écrit en introduisant une distance entre f et g. La minimisation de cette distance est ensuite recherchée.

FIG. 3.1. Principe de la comparaison des niveaux de gris. L'amplitude des signaux sur une *RoI*, ici en 1D, est comparée entre l'image de référence (ligne rose) et l'image de l'état déformé (ligne bleue).



En l'état, la détermination du déplacement \bar{u} est un problème mal posé. Il est donc nécessaire de le régulariser. La régularisation consiste à ajouter une information *a priori* sur la solution du problème inverse. Une méthode de régularisation couramment utilisée dans la littérature est la régularisation cinématique. On définit une base cinématique à laquelle appartient le déplacement. De manière pratique, le déplacement est approché par un ensemble de familles de transformations simples. Le champ de déplacement \bar{u} est décomposé, *a priori*, sur une base de N fonctions de forme arbitrairement choisies notées Φ_i ,
où i = 1, .., N. Les Φ_i sont les fonctions de formes formant une base décrivant le champ de déplacement.

$$\bar{u_t} \approx \bar{u} = \sum_i^N \delta_i \Phi_i \tag{3.2}$$

où, δ_i est le degré de liberté associé à la fonction de forme Φ_i .

La régularisation spatiale, par le choix de la taille des RoI, support de la cinématique conditionne aussi la solution du problème. Le choix de la régularisation est très importante et conditionne de manière significative les résultats de la corrélation d'images. La détermination des coefficients optimaux de la transformation approchée nécessite la minimisation de la distance entre f et g. Cette distance est formalisée sous la forme d'une fonction-coût. Diverses fonctions sont possibles. Elles sont discutées dans (Pan et al., 2010). La plus utilisée est la norme \mathscr{L}^2 . La conservation des niveaux de gris est recherchée en minimisant le carré de la différence des niveaux de gris :

$$u^{*} = \underset{u \in \mathscr{L}^{2}(ROI)}{\operatorname{argmin}} \int_{RoI} [f(\bar{x}) - g(\bar{x} + \bar{u}(\bar{x}))]^{2} d\bar{x}$$
(3.3)

Cette fonctionnelle est non-linéaire. En supposant qu'il s'agissent de petits déplacements, on linéarise en effectuant un développement de Taylor au premier ordre. L'équation précédente devient alors :

$$u^{*} = \underset{u \in \mathscr{L}^{2}(ROI)}{\operatorname{argmin}} \int_{RoI} [f(\bar{x}) - g(\bar{x}) - \bar{u}(\bar{x}) \cdot \nabla f(\bar{x})]^{2} d\bar{x}$$
(3.4)

En injectant \bar{u} sous sa forme de combinaison linéaire dans le sous espace d'approximation (équation (3.2)), ce système peut être mis sous forme matricielle :

$$[M_{ij}]^e[\delta_i] = [b_i] \tag{3.5}$$

Les termes M et b sont des données connues qui dépendent du gradient de l'image de référence, et du résidu entre l'image initiale et l'image "back-deformed".

$$M_{ij} = \sum_{ROI} (\Phi_i \cdot \nabla f)(\bar{x}) (\Phi_j \cdot \nabla f)(\bar{x})$$
(3.6)

$$b_i = \sum_{ROI} (f - g)(\Phi_i . \nabla f)(\bar{x})$$
(3.7)

"." correspond au produit scalaire Euclidien entre deux vecteurs.

Le problème est résolu de manière itérative en mettant à jour l'incrément de déplacement par un algorithme de Gauss-Newton. L'incrément de déplacement est obtenu par la résolution du système linéarisé équation (3.5):

$$\Delta \delta_{it} = M^{-1}b \tag{3.8}$$

La résolution du système permet de trouver $\Delta \delta_{it}$ et ainsi, de calculer le champ de déplacement sur l'élément RoI lorsque le δ optimal est trouvé.

$$\delta_{it+1} = \delta_{it} + \Delta \delta_{it+1} \tag{3.9}$$

L'algorithme de Gauss-Newton s'opère jusqu'à ce que le critère d'arrêt soit atteint. Dans cette étude, le critère d'arrêt du calcul est une valeur seuil. Le calcul s'arrête dès que $\Delta \delta_{it} \leq 10^{-5}$.

Les images sont discrétisées et donc connues au pixel près. En l'état, le déplacement calculé prend une valeur dans \mathbb{N}^2 . Pour atteindre une précision sub-pixélique, il est nécessaire de réaliser une interpolation des niveaux de gris aux coordonnées non entières. Dans cette étude, on utilise des interpolations bi-cubiques ou "spline".

3.2.3 Métrologie

Deux versions principales de CIN ont été proposées dans la littérature. La version locale est la plus populaire en CIN. Elle consiste à découper la zone d'étude de la surface en petites RoI sur lesquelles le calcul est conduit indépendamment. La manière la plus commune de répartir ces fenêtres est de quadriller l'image de façon régulière. Ce quadrillage est généré par la définition d'une taille de fenêtre et d'un pas de décalage de la fenêtre. L'avantage de cette version est qu'elle ne nécessite pas beaucoup d'a priori en termes de cinématique de déplacement à l'intérieur de la RoI. Cet avantage est au détriment de l'absence de continuité du champ de déplacements aux interfaces des RoI. La qualité de la mesure du déplacement par corrélation d'images est très dépendante des paramètres d'entrée de la méthode imposée par l'utilisateur. La taille des RoI est l'un des paramètres influençant les cartes de déplacements. En effet, le choix de la taille de la RoI est un compromis entre résolution de mesure et résolution spatiale. Une plus grande RoI aura tendance à augmenter la valeur de résolution spatiale par effet moyenne donc de la dégrader car on cherche généralement à détecter les singularités les plus petites dans un champ. Néanmoins, cette dégradation se fait au profit de la résolution de mesure en déplacement qui se voit diminuée donc améliorée. Par ailleurs, le lissage des déplacements est contrôlé par la taille du RoI et le pas des RoI. La connaissance de paramètres susceptibles de perturber le résultat du champ de déformations obtenu permet à l'utilisateur d'apprécier la qualité de ses mesures. Dans sa version globale, la CIN tire partie d'un a priori cinématique pour enrichir le sous-espace d'approximation du déplacement tout en élargissant la zone d'étude. Tous les pixels de la zone d'étude sont suivis simultanément et la minimisation du problème est envisagée pour la région d'intérêt dans son entièreté, une seule fois par image. La version locale peut se voir comme de multiples versions globales indépendantes. Plus récemment, une version intégrée de la CIN (I-DIC) a été proposée dans la littérature (Hild and Roux, 2006). L'aspect "intégré" consiste à injecter de l'information mécanique *a priori* afin de régulariser la solution et ainsi de rendre la procédure inverse moins sensible au bruit. Cette version permet d'être très proche de l'étape souvent complémentaire à la mesure de champs à savoir : l'identification de paramètres mécaniques. On peut ainsi mesurer un champ de déplacement mécaniquement admissible (e.g., solution d'un problème d'élasticité). Les différentes approches sont complémentaires puisque la version locale peut permettre d'obtenir des informations sur la cinématique de la réponse du matériau étudié pour servir d'*a priori* à des méthodes globale ou intégrée.

3.3 Application de la CIN au suivi de particules

3.3.1 Choix du suivi de particule

La CIN nécessite requiert des images numériques qui traduisent une information sur le placement des points matériels de la surface du matériau étudié. Cette information est matérialisée par un marquage de niveaux de gris. Pour de nombreux matériaux de l'ingénierie et pour les matériaux vivants durs de type os, l'application au préalable d'un mouchetis à la surface des échantillons à tester est requise. Les matériaux vivants possèdent parfois un grain naturel dû à leur texture qui rend propice l'utilisation de la corrélation d'images numériques. C'est le cas, par exemple, pour les images de biofilms prises via un microscope (Mathias and Stoodley, 2009) ou pour les tissus mous de la jambe (Bouten, 2009).

Néanmoins, l'utilisation de la texture propre du matériau vivant pour obtenir une information quantitative sur son comportement mécanique peut comporter des biais. Par son caractère vivant, ce type de matériau est susceptible de réagir de manière active au stress mécanique induit par la sollicitation lors du test. En effet, il existe de fort couplages entre la mécanique et les processus physiologiques des matériaux vivants. Dans ce contexte, l'utilisation de marqueurs inertes pour la mesure de champs est une solution. L'usage de marqueurs inertes collés régulièrement à la surface d'aorte humaine (Avril et al., 2010) a permis d'étudier les phases d'inflation et de déflation du vaisseau par mesure de champs. Fig. 3.2 illustre quelques méthodes de marquage utilisées dans le cas d'applications aux matériaux vivants. Dans ce travail de thèse, des microbilles passives sont disposées de manière aléatoire au sein du matériau. Les billes inertes ont le même rôle qu'un mouchetis artificiel. La CIN est utilisée à des fins de suivi de particules incorporées dans un milieu hétérogène et dynamique. Le milieu étudié est déposé dans un contenant de faible volume et qui permet l'observation au microscope optique inversé sans sollicitation. Les mouvements libres des billes situées directement au fond du contenant sont observés. Des séries d'images sont enregistrées via la sortie vidéo du microscope inversé.

Le principe est ensuite le même que pour les études de microrhéologie par suivi de particules ("Particle Tracking Microrheology" ou PTM en anglais). En microrhéologie, les microsondes sont insérées dans l'échantillon et mesurent, à l'échelle microscopique, la reFIG. 3.2. Exemple de la littérature de l'application de la corrélation d'images numériques sur des matériaux vivants. a) Utilisation de mouchetis artificiel sur un os (Rankin et al., 2017) - b) Texture naturelle de la surface du matériaux observé dans le cas du tissus mou de la jambe (Bouten, 2009) ou c) de biofilms bactériens (Mathias and Stoodley, 2009) - d) Utilisation de marqueurs inertes collés à la surface d'un vaisseau sanguin (Avril et al., 2010).



d)

lation entre la contrainte exercée (via la force exercée par la microbille) sur l'échantillon, et la déformation de celui-ci (via le déplacement de la bille dans le matériau). Les marqueurs utilisés en microrhéologie sont parfois sollicités. Les méthodes de sollicitation sont diverses. Dans la littérature, on peut citer les contrôles par interactions magnétiques (Ziemann et al., 1994; Galy et al., 2012) et le piégeage laser (Ashkin et al., 1987; Neuman and Nagy, 2008). Il est aussi possible de se passer d'une excitation externe et d'utiliser le mouvement brownien intrinsèque des microbilles. Le mouvement brownien consiste en un mouvement perpétuel (pas d'amortissement dû à des phénomènes de frottement), sans orientation privilégiée de particules micrométriques dans un fluide. Ce sont les collisions incessantes de la particule avec les molécules du fluide qui entraînent le déplacement de la particule colloïde. Dans ce cas, la force motrice est thermique, avec une énergie de l'ordre de k_BT , k_B étant la constante de Boltzmann et T la température, exprimée en Kelvin (Wirtz, 2009). Le mouvement brownien est lié à la probabilité de choc avec les molécules du solvant. En moyenne, la particule reste immobile puisqu'elle va aussi souvent dans l'une direction que dans l'autre.

Pour un mouvement brownien pur, la moyenne arithmétique des déplacements est nulle (Qian et al., 1991). Ce qui caractérise un mouvement brownien est la moyenne quadratique des déplacements, en anglais "Mean Square Displacement" (MSD). Il a été démontré dans la littérature que cette grandeur est dépendante des caractéristiques du milieu contenant les microbilles. Pour une diffusion brownienne pure, le déplacement carré moyen des particules de rayon *a* varie linéairement en fonction de l'intervalle de temps de mesure Δt du déplacement. Le coefficient de linéarité dépend de paramètres mécaniques du fluide dans lequel diffusent les particules. La relation entre le MSD et l'intervalle de temps Δt pour une trajectoire bidimensionnelle r(t) = (x(t), y(t)) est donnée par :

$$MSD(\Delta t) = \langle \Delta r(\vec{t})^2 \rangle = 4D\Delta t \quad \text{avec} \quad D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a}$$
 (3.10)

D est le coefficient de diffusion d'Einstein. Il est relié à la viscosité dynamique η du solvant.

$$\eta = \frac{k_B T}{6\pi Da} \tag{3.11}$$

Ces équations sont vraies pour un mouvement brownien non biaisé. Par ailleurs, l'allure de la courbe du MSD des particules en fonction de l'intervalle de temps de déplacement est caractéristique du milieu dans lequel sont plongées les microbilles (Fig. 3.3). Pour un mouvement qualifié de sous-diffusif, le MSD est proportionnel à Δt^{α} avec $\alpha \in]0, 1[$. Pour un mouvement dit super-diffusif, le MSD est proportionnel à Δt^{α} avec $\alpha > 1$. Plus l'intervalle de temps élevé, plus la barre d'erreur est grande. En effet, plus l'intervalle de temps entre deux positions est grand, moins on a de termes pour calculer la moyenne. FIG. 3.3. Courbe du MSD en fonction de l'intervalle de temps pour différents types de mouvements de particules.



3.3.2 Suivi des billes au sein du matériau

Les billes sont observées au microscope optique à l'aide d'un objectif x40 (grossissement x400). Ce grossissement permet d'avoir un bon compromis entre la résolution de l'information sur les billes (les billes sont alors codées sur 10 pixels (px) de diamètre) et le nombre de billes visibles dans une image. Des séries de quelques milliers d'images sont enregistrées. Les billes sont suivies individuellement à l'aide d'un algorithme de CIN. En effet, il est plus difficile de définir conjointement les mouvements de chacune des particules considérées, celles-ci ayant une cinématique composée de mouvements dirigés aléatoirement. On utilise la formulation de la CIN dans sa version locale : on s'intéresse à une portion de l'image réduite à un carré de $51x51 \text{ px}^2$ autour d'une bille et la zone est calculée dans son entièreté. La cinématique du déplacement reste simple et est définie sur cette portion de l'image. Elle est composée d'une composante de déplacement verticale et d'une composante de déplacement horizontale. Pour chaque bille, l'algorithme de corrélation d'images mesure le déplacement en pixels entre une image de référence et une image qui suit dans la série, ceci de manière séquentielle. Ce calcul est effectué le long de la série d'images afin de reconstituer la trajectoire de la bille. Ce tracé par CIN permet un suivi rapide, idoine et dont l'erreur est connue. Si l'algorithme montre des difficultés à converger, différentes explications sont possibles :

- la bille est sortie du cadre de l'image;
- la bille est sortie de la profondeur de champ, l'image déformée est alors trop différente de l'image initiale;
- la bille a effectué un trop grand déplacement entre l'image initiale et l'image déformée, l'algorithme aurait alors besoin d'une initialisation non nulle.

Pour le premier cas, les coordonnées de la bille permettent de considérer que la trajectoire sort de l'image. Pour les deux autres cas, le calcul est initialisé avec une image précédente dans la série puis le calcul reprend entre cette nouvelle image initiale et les images qui la suivent.

3.3.3 Localisation de la région d'intérêt

Le suivi des billes est effectué individuellement pour chaque particule. L'objectif de cette partie est de détecter la présence de billes dans l'image afin de restreindre la région d'intérêt autour d'une bille. Dans chaque série d'images, on observe un nombre de billes allant de quelques dizaines à quelques centaines. Il est convenable de pouvoir détecter les billes de manière systématique. Pour cela, un processus automatique basé sur des techniques de traitement d'images est implémenté. Pour chaque séquence d'images, la première image est ouverte. Le centre d'une bille parmi l'image est sélectionnée manuellement par l'utilisateur. Une imagette $Imagette_b$ de 20x20 px² de cette bille et de la zone environnante est créée. Afin d'enlever la spécificité intrinsèque due au choix d'une bille particulière, une nouvelle image $Imagette_v$ est créée à partir de l'imagette sélectionnée. Cette nouvelle image virtuelle est composée d'une combinaison linéaire de transformations simples de l'imagette de base. La nouvelle image virtuelle est ainsi créée (Fig. 3.4) selon la combinaison suivante :

$$Imagette_{v} = \frac{1}{4} \left[Imagette_{b} + Imagette_{b}^{T} + Imagette_{b}^{Rh} + Imagette_{b}^{Rv} \right]$$
(3.12)

où $Imagette_b$ est l'imagette brute de la zone autour d'une bille, $Imagette_b^T$ est la transposée de l'imagette brute, $Imagette_b^{Rh}$ correspond à la symétrie horizontale de l'imagette brute et $Imagette_b^{Rv}$ est la symétrie verticale de l'imagette brute. Ces transformations apportent une correction sur la symétrie du motif codant la bille.

FIG. 3.4. Imagette d'une bille utilisée dans l'algorithme de détection des billes.

(a) Imagette brute $Imagette_b$ sélectionnée par l'utilisateur







Basé sur la librairie OpenCV, l'algorithme de localisation des zones d'intérêt procède à la recherche des maximums de corrélation entre l'image entière et l'imagette $Imagette_v$ qui représente une bille indépendante. Les maximums de corrélation peuvent être présents sur plusieurs pixels aux alentours d'une bille. Le centre de gravité de chacun des clusters formés par l'ensemble des maximums de corrélation autour d'une bille est choisi pour désigner le centre de la bille, moyennant une translation de la moitié de la largeur et de la hauteur de l'imagette. Ce processus permet de détecter les centres des billes présentes dans l'image (Fig. 3.5).

FIG. 3.5. Billes détectées par l'algorithme, basé sur le calcul du maximum de corrélation entre l'image et l'imagette virtuelle créée pour représenter une bille.



3.3.4 Réduction de la région d'intérêt

Les images du fond des puits représentent une vue 2D des billes tri-dimensionnelles. Étant donnée la sphéricité des billes, celles-ce ne sont pas codées sur des niveaux de gris homogènes. En effet, le centre des billes est codé sur des pixels plus clairs de telle façon que l'image d'une bille est vue comme une couronne sombre. Afin de s'affranchir des pixels les plus clairs situés au centre, la zone d'intérêt prise en compte dans l'algorithme de corrélation d'images est réduite à la couronne formée par les pixels sombres du pourtour de la bille. La bille est codée sur 10 px de diamètre. Sur la région d'intérêt de taille 51x51 px², on masque les pixels clairs dans un rayon de 3 px autour du centre de la bille. De même, on masque les pixels codant le fond du puits au delà de 13 px autour du centre de la bille (Fig. 3.6). En effet, les pixels clairs situés au centre des billes et qui sont causés par la différence de profondeur de champ entre les bords périphériques et le centre de la bille (différence de profondeur de champ correspondant au rayon de la bille) et par des reflets de la lumière ne constituent qu'un signal bruité. Il a été démontré que l'erreur de mesure de la valeur de niveau de gris d'un pixel est proportionnelle à l'intensité lumineuse capturée (Healey and Kondepudy, 1994). Pour s'affarnchir de ces pixels, on masque la zone centrale des billes.

FIG. 3.6. Région d'intérêt utilisée pour le calcul du déplacement d'une bille par corrélation d'images. Les pixels clairs du centre de la bille sont masqués car ils n'apportent pas d'information pertinente pour le calcul par CIN. De même, les pixels de fond du puits au delà d'une petite périphérie autour de la bille ne sont pas pris en compte dans le calcul.



Dans le cadre de cette thèse, les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire de biofilms sont étudiées en incorporant des microbilles au milieu bactérien et en enregistrant leur mouvement visualisé au microscope. Cette méthode qui a fait ses preuves pour des matériaux inertes n'a rien de trivial pour des matériaux vivants comme le biofilm.

3.4 Cas d'applications : les biofilms

3.4.1 Validité de la métrologie du suivi de particules

Dans le cas où le capteur est parfait (et que la source de lumière est constante), les images d'une scène immobile sont identiques. Réellement, les images prises par le système de mesure optique sont altérées par un bruit de capteur inhérent au fonctionnement électronique de prises d'images. Le bruit engendré par le capteur se propage dans la mesure du déplacement calculé par CIN et impacte directement la résolution de mesure. Pour calculer le bruit de capteur, on acquière 1000 images d'un échantillon de billes séchées sur une boite de pétri. La mise au point sur les agrégats de billes séchées est légèrement décalée en profondeur pour créer volontairement un flou qui permet de lisser le gradient de niveaux de gris sur les images (Fig. 3.7). La dynamique des niveaux de gris doit être étendue. Pour chaque pixel p_i de position (x_i, y_i) , on calcule la moyenne du niveaux de gris Im_i ainsi que la variance Iv_i sur les 1000 images. Pour une série d'images de taille 300x200 px², 60000 couples (Im_i, Iv_i) sont calculés. Ils sont reportés sur un graphe variance fonction de la moyenne du niveau de gris du pixel en question (Fig. 3.8). La dispersion des points de mesure dans le repère (Im, Iv) montre que, comme attendu, les pixels les plus clairs présentent le plus de variabilité. Ce profil de graphe (Im, Iv) est attendu pour les caméras utilisées en mesure de champs. Le nuage de points forme un faisceau orienté selon une droite affine. D'autre part, le bombé au centre du faisceau est dû à des mouvements de solide rigide (Grediac and Sur). Pour être conservatif, l'écart-type des niveaux de gris sur l'image est arbitrairement choisi comme étant le maximum de variance observée sur cet essai. On a donc :

$$\sigma_{img} = \sqrt{max(Iv_i)} = 327.31 \tag{3.13}$$

On rappelle que les images sont codées en 16 bits. La résolution de mesure en déplacement est ensuite déterminée par l'équation suivante (Réthoré et al., 2008; Blaysat et al., 2016) :

$$\sigma_i = \sigma_{img} \sqrt{[2M^{-1}]_{ii}} \quad , \quad i \in 1,2$$

$$(3.14)$$

De manière pratique, les valeurs de la matrice de corrélation M_{ij} font en sorte qu'en moyenne, la résolution de mesure du calcul par CIN pour les deux composantes du déplacement est :

$$\sigma_x = 0.0462 \ px$$
 pour la composante horizontale du déplacement
 $\sigma_x = 0.0464 \ px$ pour la composante verticale du déplacement (3.15)

FIG. 3.7. Image utilisée pour le calcul de bruit de capteur transporté sur le calcul de CIN. La mise au point est volontairement décalée pour lisser les gradients de niveaux de gris de l'image.



FIG. 3.8. Nuage de points représentant la variance en fonction de la moyenne de la distribution du niveau de gris pour chaque pixel sur 1000 images "identiques".



3.4.2 Essais de validation

Des essais de validation ont été effectués avec des liquides étalons qui avaient pour but de simuler le matériau biofilm. Plusieurs essais préliminaires de calculs de mouvement libre de billes se déplaçant dans un milieu homogène de viscosité connue ont été réalisés afin de vérifier la méthodologie de suivi de billes expliquée auparavant. Le principe de ces essais préliminaires était d'étudier le mouvement des microbilles de 1 μm dans des liquides standards, de viscosité connue. Le but de ces manipulations était de retrouver expérimentalement les viscosités connues des liquides standards afin de valider une méthodologie qui puisse ensuite être appliquée à des biofilms formés en microplaque. Une première solution de glycérol à 68% (pourcentage massique) a été étudiée. Pour cette solution, les valeurs de viscosité sont tabulées (Takamura et al., 2012). Entre 20 °C et 25 °C, la viscosité d'une telle solution est d'environ 16.4 $mPa.s \pm 4.8 mPa.s$. L'incertitude liée à cette valeur tabulée vient de l'ignorance de la température exacte du liquide (manipulation à température ambiante mais non contrôlée) et de l'inexactitude de la pesée du mélange. Avec l'équation (3.11), la valeur expérimentale de la viscosité pour ce milieu est retrouvée en calculant au préalable le coefficient de diffusion D, obtenu grâce à la courbe $MSD = f(\Delta t)$. Ces courbes ont été tracées pour 19 billes diffusant dans la solution de glycérol (Fig. 3.9). En échelle log-log, les pentes des droites sont environ égales à 1 (1.05 ± 0.1) . Les valeurs de MSD sont donc proportionnelles à Δt et les billes diffusent bien selon une tendance aléatoire, sans écoulement, ni confinement. À partir de ces courbes, les valeurs de viscosités calculées pour ces 19 billes sont en moyenne de 16.6 $mPa.s \pm 5 mPa.s$. La même démarche a été effectuée pour retrouver la viscosité du milieu BHI (Brain Heart Infusion) utilisé pour les suspensions bactériennes initiales. Bien que la valeur théorique d'une solution de BHI n'était pas connue dans le cadre de ce travail, l'ordre de grandeur de cette valeur est de $10^{-3}Pa.s$. Le BHI étant fabriqué à partir de la mise en solution d'une poudre dans un grand volume d'eau, le liquide qui en résulte a une texture proche de celle de l'eau. De manière analogue à la démarche mise en place pour la solution de glycérol, les courbes de MSD en fonctions du Δt ont été tracées pour 39 billes diffusant dans une solution de BHI. Les mouvements des billes dans cette solution sont de type mouvement brownien. Les courbes de MSD en fonction de l'intervalle de temps confirme les observations qualitatives des trajectoires (Fig. 3.10). En effet, le MSD est dépendant de Δt . La viscosité expérimentale mesurée par cet essai est de 3.2 $mPa.s \pm 1.3 mPa.s$. Ces premiers essais ont permis de valider la mesure d'un paramètre mécanique en conditions expérimentales, pour des matériaux inertes de viscosité relativement faible.

FIG. 3.9. MSD en fonction de l'intervalle de temps Δt pour les trajectoires de 19 billes diffusant dans une solution de glycérol à 68%. Les pentes de courbes du graphe de droite sont environ égales à 1 (1.05 ± 0.1)



Dans le but d'étudier des milieux de viscosités plus élevées, deux autres liquides standards cent fois plus visqueux ont été utilisés. Les viscosités de ces deux échantillons s'échelonnent environ entre 500 et 700 mPa.s. Les liquides utilisés ont pour référence D500 et N350 (Sigma-Aldrich) de viscosité respective 498.4 mPa.s et 712.9 mPa.s (valeurs à 25 ° C). Des trajectoires de billes ont été extraites de séries d'images. La mise en œuvre de ces expériences a néanmoins été laborieuse. Il a fallu procéder à un séchage des billes pour ne pas modifier la viscosité du liquide avec la solution de billes. De plus, les liquides standards utilisés étaient hydrophobes. Un séchage rigoureux était donc indispensable pour éviter des interactions physico-chimiques supplémentaires entre les billes et le liquide. Ces liquides

FIG. 3.10. MSD en fonction de l'intervalle de temps Δt pour les trajectoires de 39 billes diffusant dans une solution de BHI. Les pentes de courbes du graphe de droite sont environ égales à 1 (0.98 ± 0.11)



se sont aussi montrés plus difficiles à stabiliser et des observations montraient parfois des écoulements des billes dans ces milieux visqueux *a priori* à l'équilibre. En effet, des observations de billes diffusant dans le liquide N350 montrent des trajectoires de billes qui semblent emmenées par un écoulement de fluide non volontaire (Fig. 3.11). Les courbes de MSD, en fonction de l'intervalle de temps considéré, associées aux trajectoires de six billes dans ce milieu sont typiques de milieux visqueux avec présence d'écoulement. D'autre part, pour ces viscosités, les déplacements moyens d'une bille de $1\mu m$ sont plus petits que pour les liquides étudiés précédemment. Les trajectoires de billes dans le liquide D500 sont des mouvements de très faibles amplitudes. La fréquence d'acquisition des images a donc été d'augmentée afin de capter des changement de direction des billes, de manière plus fine. Contrairement à l'effet escompté, l'augmentation de la fréquence d'acquisition n'a pas amélioré la qualité du suivi de la particule.

La Fig. 3.12 montre une composante du déplacement d'une bille piégée dans le liquide D500 pour différentes fréquences d'acquisition. La composante horizontale du déplacement de la bille est augmentée lorsque la fréquence d'acquisition des images est plus forte. En effet, pour des fréquences d'acquisition élevées, les déplacements mesurés sont bruités par des mouvements parasites de la caméra. Pour de hautes fréquences d'acquisition, la caméra (PCO Edge 4.2 - capteur de type CMOS 2048 x 2048 pixels) est refroidie par un ventilateur qui créé des perturbations mécaniques. Celles-ci sont amplifiées sur les images par le grossissement des optiques du microscope. Le mouvement mesuré par la CIN pour des billes piégées dans des liquides de viscosité élevée est en grande partie dû aux mouvements de solides rigides de la caméra vissée sur la monture C de la sortie vidéo du microscope. FIG. 3.11. Diffusion dans le liquide N350. a) Trajectoire d'une bille diffusant dans le liquide N350 avec la présence d'un biais dû à un écoulement du milieu. b) Mean Square Displacement de sept trajectoires de billes présentes dans le même milieu. La tendance polynomiale du second degré traduit la présence d'un écoulement dans le milieu.



Des calculs de déplacements sur des séries d'images de scènes immobiles (billes séchées à la surface d'une boîte de pétri) pour différentes fréquences d'acquisition montrent que le déplacement mesuré augmente lorsque la fréquence d'acquisition des séries d'images augmente (Fig. 3.13). Pour des fréquences en dessus de 500 fps, le biais de déplacement dû à la vibration de la caméra dépasse la valeur de la résolution de mesure et est donc transporté sur la valeur du déplacement mesuré.

Ces essais ont permis de détecter les possibilités et les limites de l'utilisation de la caméra. La méthode de mesure de déplacement de mouvements libres par CIN ne permet pas d'exploiter le mouvement brownien dans les matériaux très visqueux. Aussi, les matériaux les plus visqueux ne peuvent être mécaniquement déterminés uniquement avec l'aide de l'observation du mouvement brownien des microbilles. Le tableau 3.1 récapitule les ordres de grandeur des viscosités étudiées expérimentalement lors de ces essais de validation et les conclusions de ces manipulations. Dès lors, l'étude des états de biofilms jeunes, de faibles viscosités, a été préférée. La détermination expérimentale des viscosités du milieu de culture BHI et d'un mélange Glycérol/Eau standard a permis de valider la méthodologie pour remonter aux propriétés rhéologiques de milieux faiblement visqueux grâce à l'étude du mouvement des billes. La résolution de mesure a été déterminée en quantifiant le transport du bruit de capteur. La résolution de la méthode décrite ci-dessus détermine un cadre de validité du suivi des particules au sein du biofilm. Le cadre de validation du suivi du mouvement libre de bille par CIN est ainsi restreint aux temps précoces de la formation du biofilm.

FIG. 3.12. Composante horizontale du déplacement d'une bille diffusant dans le liquide D500 pour différentes fréquences d'acquisition.



TABLE 3.1. Échelle des viscosités observables par la méthode développée.

Ordre de grandeur (Pa.s)	Liquide	Viscosité théorique	Valeur expérimentale	Remarque
10^{-3}	BHI	$pprox 10^{-3}$	$3.2\ mPa.s\pm 1.3\ mPa.s$	Réalisation expérimentale aisée
10^{-2}	Mélange Glycérol 68%	$\begin{array}{c} 16.4 \ mPa.s \pm \\ 4.8 \ mPa.s \end{array}$	$\begin{array}{c} 16.6 \ mPa.s \pm \\ 5mPa.s \end{array}$	Réalisation expérimentale aisée
10 ⁻¹	D500	0.498	n/a	Vibrations Écoulement
	N350	0.717	n/a	Résolution de mesure dépassée

FIG. 3.13. Histogrammes des 2 composantes des déplacements mesurés en pixel sur une série d'images "identiques" pour 1000 fps, 500 fps et 200 fps



3.4.3 Principe expérimental du suivi de la formation du biofilm

La méthode de suivi de microbilles exposée ici est appliquée à l'étude de biofilms de P. aeruginosa et de S. aureus. Pour ses souches, des cinétiques de croissance de biofilm sont exécutées. Des séries d'images microscopiques sont extraites à des temps successifs de la croissance du biofilm. Suite aux remarques précédentes, les essais se sont donc focalisés sur les premiers stades de formation des biofilms étudiés, depuis la caractérisation du milieu BHI contenant les bactéries planctoniques et les microbilles, jusqu'à la détermination des premiers signes de formation du biofilms via les mouvements des microbilles. Toutefois, il peut être hasardeux de parler de mouvement libre des microbilles car les bactéries ne sont pas inertes : elles provoquent des biais dans le mouvement aléatoire des particules. Il est possible que le coefficient de diffusion varie de manière significative au cours de la trajectoires et entre deux billes différentes si les billes rencontrent des environnements du milieux différents. Aussi, il est préférable de s'intéresser à des changements de dynamique des microbilles plutôt que de calculer des paramètres mécaniques fondés sur la théorie des mouvements browniens purs. En effet, il est nécessaire de pouvoir discriminer les différents mouvements des billes sur un autre critère que celui de la comparaison de MSD qui est valable dans des milieux homogènes et inertes. Il s'agit donc d'étudier la formation de biofilms d'un point de vue mécanique, en déterminant un paramètre révélateur de la genèse d'un biofilm. En tirant parti de l'observation des mouvements de microbilles introduites dans le milieu bactérien, on peut détecter des changements de profil de trajectoires qui semblent être reliés à l'activité de bactéries sessiles (adhésion ou formation de matériel extracellulaire).

Le contexte de manipulation de microorganismes implique des conditions d'hygiènes particulières. Le laboratoire d'expérimentation est en classe de confinement P2 ("Concerne les micro-organismes non génétiquement modifiés de classe 2 qui peuvent provoquer des maladies chez l'homme mais dont la dissémination dans l'environnement est peu probable, qui sont sans risque pour la collectivité et contre lesquels une prophylaxie ou des traitements efficaces sont connus"). Par ailleurs, la taille du matériau observé nécessite des objectifs grossissants. L'utilisation d'un microscope optique de référence Olympus CX53 et la manipulation sous poste de sécurité microbiologique est de rigueur. On regarde les dynamiques des microbilles au sein du liquide bactérien au cours du temps. Le témoin est constitué d'une solution de microbilles dans le BHI utilisé pour les essais. Le mouvement libres des microbilles dans la milieu bactérien est visualisé à température ambiante en lumière transmise. À partir des enregistrements par séries d'images des observations des billes se déplaçant librement (sans sollicitation extérieures) dans le milieu bactérien, l'objectif des analyses est de déceler des changements de dynamique dans les trajectoires des billes au cours du temps. Pour cela, des séries de quelques milliers d'images à une fréquence de 200 images par seconde ont été prises à des temps successifs de la croissance de biofilm de P.aeruginosa et de S.aureus dans du BHI et en présence de microbilles paramagnétiques de diamètre 1 μm . La portion du fond du puits observée varie entre 600 μm^2 et 1000 μm^2 . FIG. 3.14. Schéma expérimental de l'étude de la formation de biofilm par le biais de microbilles piégées dans le milieu bactérien



Un nombre de microbilles de quelques dizaines à quelques centaines de microbilles peuvent être visualisées et suivies dans une même série d'images. Des séries d'images du fond des puits sont enregistrées jusqu'à avoir une immobilisation générale des billes au sein du biofilm. Le temps pour lequel le blocage se fait pour une majeure partie des billes est dépendant de la souche. Un test BRT effectué en parallèle pour la souche étudiée et dans le même milieu de culture a été effectué pour avoir une référence en termes de formation de biofilm. Les protocoles des essais sont en Annexe B. Un schéma du principe expérimental est montré en Fig. 3.14. Les résultats sur les analyses des mouvements des billes extraits par CIN sont exposés dans le chapitre suivant.

Chapitre 4

Suivi de microbilles *in situ* pour la détection de la formation de biofilm

Sommaire

4.1	Motivations
4.2	Contributions
4.3	Conclusion
4.4	Article

4.1 Motivations

Dans les chapitres précédents, nous avons discuté l'intérêt d'étudier le comportement mécanique des biofilms. Le chapitre 2 fait état des problématiques relatives au matériau biofilm en termes de test et d'identification de paramètres mécaniques. Les verrous scientifiques sont liés à la géométrie complexe, au comportement non linéaire du biofilm, aux conditions de chargement multiaxiales et à la mesure même de la réponse locale du biofilm à des sollicitations mécaniques. L'utilisation des méthodes de mesure de champs est un avantage considérable puisque celles-ci permettent d'observer l'hétérogénéité de la réponse mécanique du matériau. Par ailleurs, le caractère non invasif des méthodes optiques de mesure de champs permet de ne pas détruire l'échantillon de biofilm et ainsi de pouvoir conduire des observations temporelles. Le chapitre 3 développe une méthodologie qui utilise la corrélation d'images pour suivre le mouvement des centroïdes de billes au sein du milieu de croissance du biofilm bactérien. Dans cette utilisation de la CIN, ce n'est pas l'aspect de mesure de paramètres mécaniques sur une surface qui est recherché. Ici, la CIN est exploitée pour le suivi idoine de billes pour lequel l'erreur en termes de mesure de déplacement est maîtrisée. Néanmoins, la prise en compte de l'hétérogénéité matérielle est assurée par le suivi d'un grand nombre de microbilles dispersées au sein du milieu. La microrheologie par suivi de particules a déjà fait ses preuves pour les matériaux inertes mais néanmoins hétérogènes tels que les matériaux souple de type bio-polymère (Moschakis, 2013). Elle est aujourd'hui aussi utilisée dans les milieux vivants tels que la cellule où elle permet d'étudier les paramètres mécaniques du cytoplasme (Wirtz, 2009). Dans le cas des biofilms, en plus de l'hétérogénéité spatiale, la motilité des bactéries entraîne une activité au sein du matériau. Utiliser les bactéries comme sonde pour détecter des changements de paramètres mécaniques paraît donc biaisé. L'utilisation de billes inertes permet de passer outre ce problème de non objectivité de la sonde tout en étant au plus près de la matière.

Le chapitre suivant, développé sous forme d'un article de journal scientifique en anglais, fait état de l'utilisation de cette méthodologie pour tirer partie du déplacement de billes micrométriques non sollicitées afin de détecter des changements microbiologiques se rapportant à une adhésion de bactéries ou à la formation de biofilm. L'étape de formation du biofilm est le lieu de grands changements en termes d'expression des gènes des biofilms, de comportements des bactéries ou bien encore d'évolution de paramètres mécaniques. L'utilisation de particules inertes micrométriques insérées dans le milieu bactérien est destinée à capter ces changements à travers l'évolution des dynamiques des billes. La méthodologie exposée dans le chapitre précédent est ici utilisée pour étudier les premiers stades de formation de biofilms de *P. aeruginosa* et de *S. aureus*. Pour cela, les trajectoires de billes contenues dans la solution bactérienne initiale sont suivies pour des temps successifs durant la croissance du biofilm. À la vue de l'importance du nombre de données générées par l'extraction de ces trajectoires, il est nécessaire de déterminer des jeux de critères pour caractériser ces mouvements.

4.2 Contributions

Cet article est destiné à la soumission dans la revue *Journal of Microbiological Methods*. Les principales contributions de cet article sont :

- la détection de phénomènes discriminants par le biais des caractéristiques des trajectoires microscopiques de billes inertes. Ces phénomènes sont à relier à des changements du milieu que l'on pourrait rapprocher d'activités microbiologiques;
- la détermination de temps caractéristiques pour la formation du biofilm cohérents avec le BioFilm Ring Test[®];
- la preuve de concept par un test *in vitro* non invasif qui permet un suivi temporel de la cinétique de formation du biofilm.

4.3 Conclusion

Les résultats issus de cette méthodologie originale permettent de valider une preuve de concept concernant l'étude de la formation de biofilm. La méthodologie développée qui consiste à se servir des mouvements passifs de microbilles inertes au sein d'un milieu bactérien a montré qu'il est possible de discriminer des phénomènes et des temps caractéristiques lors de la cinétique de croissance de biofilms de *P. aeruginosa* et de *S. aureus*. Ces résultats sont cohérents avec les méthodes disponibles dans la littérature comme par exemple, le dénombrement par dilution de bactéries adhérées ou le BioFilm Ring Test[®]. Néanmoins, l'utilisation d'un dispositif optique sans contact couplé à une méthode de suivi de particules par CIN permet un contrôle de la cinétique de croissance de biofilm, noninvasif et non-destructif. Cette caractéristique est très importante car elle permet de multiplier les lectures à des temps d'incubation aussi rapprochés que souhaités contrairement aux méthodes citées précédemment. L'apport en termes d'informations sur la cinétique de croissance du biofilm pourrait aussi être appuyé par une meilleure reproductibilité temporelle. De même, l'aspect microscopique de la méthode permet d'avoir une information qui peut être localisée.

4.4 Article

Tracking *in situ* microbeads for detecting biofilm formation

Héloïse Boudarel^(a), Jean-Denis Mathias^(b), Benoît Blaysat^(a), Michel Grédiac^(a)

(a) Université Clermont Auvergne, CNRS, SIGMA Clermont, Institut Pascal, F-63000 Clermont-Ferrand, France

(b) Irstea, UR LISC Laboratoire d'ingénierie des systèmes complexes, 9 avenue Blaise Pascal, CS 20085, 63178 Aubière, France

Correspondence to H. Boudarel e-mail : heloise.boudarel@uca.fr

1. Introduction

Biofilms are commonly defined as complex communities of microorganisms adhered on a surface and embedded in a self-produced extracellular matrix. Unlike the planktonic lifestyle, biofilms offer bacteria high survival potential to address environmental, chemical, and mechanical stresses. The matrix fills the space between bacteria and produces a mechanical cohesive stability. The difficulty to remove biofilms particularly arises from the mechanical integrity of the biofilm matrix. The viscoelasticity of biofilm allows it to stay attached to surfaces even under high shear stress (Stoodley et al.; Peterson et al., 2015). The biofilm matrix promotes cell-cell communication (Flemming and Wingender, 2010) and thus increases resistance and virulence (Ceri et al., 1999; Mah, 2012). The poor penetration of antibiotics and the high gradients of oxygen and nutriments due to the physical barrier formed by the extracellular matrix provide a protection from host immune and drug treatments. Mechanical disruption of biofilms makes the bacteria more susceptible to antimicrobial agents (Bjarnsholt et al., 2013a) and is sometimes a preferred method in biofilm cleaning protocols. Mechanical integrity and behaviour of the biofilm matrix under an external force are therefore key issues concerning the efficiency of drug treatments and the possibility to sustainably clean harmful biofilms. Studying biofilms from a mechanical standpoint is thus a societal challenge. The physical properties of the biofilm and especially of the extrapolymeric substances (EPS) of the matrix are relevant for the strength of the biofilm. Various methods and technologies have been developed to study the biofilm mechanics. They have been extensively reviewed elsewhere (Billings et al., 2015). These methods are often invasive and do not provide insight into dynamic changes over time. Furthermore, they sometimes require the destruction of biofilm structure by scrapping samples. All this results in high variability in results (Böl et al., 2013). Due to heterogeneity in EPS composition and structure within a biofilm, the mechanical study of biofilms is not trivial (Boudarel et al., 2018).

In this context, full field measurements and microrheolohgical technics allow to locally describe the biofilm behaviour. Digital image correlation (Mathias and Stoodley, 2009) has been used to locally measure elastic parameters of E. coli biofilm grown in flowcell. Microrheological technics take advantages of the motion of microscopic particles embedded in the medium to probe its mechanical properties. Microscopic particle tracking techniques have been used to study the microrheology of reconstructed polymer gel (Cheong et al., 2009). The mechanical behaviour as well as the dynamic organization of mature E. coli biofilms has been studied using particle tracking microrheology (Birjiniuk et al., 2014). For the same purpose, magnetic particles have been used to enhance the mobility of the beads and then the penetration in viscous matter (McGill et al., 2009). Particle tracking has recently allowed to detect the effect of growth condition on the mechanical parameters of stiffer *E. coli* biofilms thanks to controlled magnetic microbeads (Galy et al., 2012). Based on bacteria displacements, particle-tracking microrheology has been applied to infer quantitative measurements of the strength of *P. aeruginosa* and *S. aureus* biofilms (Rogers et al., 2008). Yet, active bacteria are able to propel themselves with directed motion, and thus drive themselves out of equilibrium. The resulting motion is characterized by a crossover from ballistic motion at short times to enhanced diffusion at longer times, the latter being due to random changes in the swimming direction (Feng and He, 2017). As a result, passive beads embedded in swimming bacterial bath experience enhanced diffusion, as shown previously for E. coli (Wu and Libchaber, 2000; Kim and Breuer, 2004) or B. subtilis (Valeriani et al., 2011). Table 4.1 lists some types of bacteria motion reported in the literature. Moreover, the EPS secretion comes directly from bacteria. Hence, the average rheology of the local environment is biased by the activity of the bacteria. Tracking the motion of passive beads has been an indirect way to study the dynamics of bacteria (Chen et al., 2007; Hinz et al., 2014) since the beads are believed to be pushed around by bacteria. Nevertheless, these studies concern planktonik cells and do not address biofilms lifestyle.

In this work, we study the biofilm formation capacity of two strains - P. aeruginosa and S. aureus - by the mean of the motion of microbeads embedded in an initial bacterial suspension. We observe the early stages of formation of the biofilm. Inert microbeads provide local and statistically unbiased insights on the bacterial bath. Qualitative observations on their microscopic trajectories during the biofilm growth show that the beads motion does not only correspond to a passive motion. We started creating a qualitative classification of motion occurring over growth time, distinguishing free motion from dragged beads or bounded trajectories using particle tracking. Then, we take advantage of the random motion of particle within single-specie bacterial biofilms to probe the physical behaviour of the medium surrounding the beads, namely the biofilm in formation. Based on the assumptions that the analysis of the bead motion reflects the viscous character

of the medium, we studied the change of bead trajectories during the biofilm growth to probe microbiological phenomena at the microscopic level. The beads motion is a sum of a Brownian contribution and an active part according to the bacterial strain since we identified two major types of motion : a ballistic and a random one. We quantified biofilm formation with a non contact measurement technique. This method relies on optical microscope observation coupled with digital image correlation to track the motion of the beads embedded in the initial bacterial suspension. The analysis of the bead displacement during the biofilm growth allows quantifying criteria for the evaluation of the biofilm formation. The assay was compared to the BioFilm Ring Test[®] method (Chavant et al., 2007). The biofilm growth was finally quantified by an adhered bacterial enumeration.

TABLE 4.1. Different types of particle movement reported in the literature. * Brain Heart Infusion

Particles	Medium	Type of Motion	Ref.	
P. aeruginosa	Growth medium	Superdiffusive and subdiffusive motion	(Rogers et al., 2008)	
Microbeads in P.aeruginosa	BHI* medium	Free, dragged, slowed and bounded motion	This study (section 3.2)	
S. aureus	Growth medium	Brownian motion without active motion	(Rogers et al., 2008)	
Microbeads in S . <i>aureus</i>	BHI medium	Brownian motion	This study (section 3.2)	
E. coli	Polymer solution	Run and tumble, swimming with flagella	(Patteson et al., 2015)	
Microbeads in <i>E. coli</i>	Soap film	Enhanced diffusion, erratic mo- tion	(Wu and Libchaber, 2000)	
Microbeads in E . coli	Dextran	Enhanced diffusion, erratic mo- tion	(Kim and Breuer, 2004)	
M. xanthus	n/a	Smooth gliding, stick-slip move- ments	(Nan et al., 2014)	
Microbeads in E . coli	Growth medium	Mobile and confined motion	(Birjiniuk et al., 2014)	

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

P. aeruginosa A002 and *S. aureus* A087 are analysed in this study. Bacteria cells are resuspended in 100 mL of sterile Brain Heart Infusion medium (BHI) to an optical density at 600 nm $OD_{600} = 0.004$. This corresponds to the Initial Bacterial Suspension (IBS). The same IBS is used for the BioFilm Ring Test[®], and for the microscopic assays. The Toner is added in IBS to get a final concentration of $10\mu l/ml$. The mixture is homogenized by vortexing and 96-well polystyrene microplates were inoculated with 200 $\mu l/well$ of IBS. One plate is prepared for each read incubation time. The cultures grow at 37 °C without agitation. The bottom part of the wells has a 5mm diameter and are coating free. Each plates is undisturbed during the growth until they are used for the experiments. For *S. aureus*, the effect of two antibiotics is studied in order to detect the capacities of antibiotics. The two antibiotics tested are Vancomycin and Fusidic acid at concentration $4\mu g/mL$ and $2\mu g/mL$, respectively. In these cases, the wells are inoculated after being loaded with 20 μl of antibiotic concentrations. These two antibiotics are known to have various mechanism of action. Vancomycin acts on bacteria wall whereas Fusidic acid modifies the protein synthesis.

2.2. Microscopy and image processing

Adhesion kinetic is analysed each 5 minutes for P. aeruginosa and each 10 minutes for S. *aureus* until immobilization of the beads. For each read incubation time, one plate is taken out of the oven and placed on a Olympus CKX53 inverted light microscope equipped with a 40x objective. This magnification is a good compromise between the number of observed and tracked beads and the resolution of the beads. Frames are taken with a PCO Edge camera or a Basler Ace camera connected to the video output of the microscope. The first one features a CCD sensor with 4.2 millions of pixels whereas the second features a CMOS sensor with 1.3 millions of pixels. The difference between both sensors has no impact on the study. Images series are captured at a frame rate of 200 frames per second with 0.5 ms of illumination time per frame to comply with the saving capacity of the computer and the frequency of the measurements. Several thousands images per series are taken for each well, at a varying location, near the center of the wells. The portion of the bottom part of the well captured represents between 600 μm^2 and 1000 μm^2 area according to the image size. The motion of the beads is vertically confined by observing the bottom part of the well. Nevertheless, beads are allowed to leave the field of view. The first microplate is immediately read, without being put in the oven. The principe of the experimental procedure is described Fig. 4.1.

2.3. Particle tracking

We developed an image processing algorithm for the tracking of embedded beads based on digital images correlation (DIC) (Sutton et al., 1986; Chu et al., 1985). The algorithm allows to find the displacement of the bead centers between two consecutive images. The displacements along all the images of the series are used to obtain the trajectory of each particle under study. The displacement resolution of our optical setup and tracking algorithm is evaluated to be ± 0.045 pixel. The processing allows to reject the beads that are skewed or eccentric. It drops the beads who leaves the field of view. Using such single particle tracking, we monitored the tracks of 1 μm microbeads embedded in the bacterial suspension, averaging about few dozen to few hundreds of particles, during the biofilm growth.



FIG. 4.1. Principle of biofilm growth, BRT, microscopy and image processing.

2.4. Biofilm evaluation with the BioFilm Ring Test[®]

Verification of biofilm formation is performed after each microscopic capture with the socalled Biofilm Ring Test[®] (BRT). The BRT has been developed by BioFilm Control. It is described in Chavant et al. (2007). It is based on the immobilization of magnetic beads inoculated in bacterial suspension due to adherent cells. Wells of the strip are covered with contrast liquid. Then, the plate is placed for one minute on the block test consisting of permanent magnets placed under each center of the wells. After magnetization, the plate is scanned to get an image of the bottom of the plate. The adhesion capability of each strain is expressed as the Biofilm Index (BFI) calculated by the companion Biofilm Element software, that relies on the spot contrast of the beads.

2.5. Adhered bacterial enumeration

An enumeration of adhered bacteria has been done to link the biofilm formation with the microbiological activity for S. *aureus* strain. The effect of the antibiotics is evaluated through the number of colonies adhered during the growth of the biofilm.

2.6. Trajectories analysis

2.6.1. Bulk analysis

The first analysis on bead trajectories is the study of the change on standard deviation of the displacements distribution from all the beads tracked for each incubation time. The observed trajectory p_i is comprised of $N_{t,i}$ successive displacements travelled by the bead during a constant time interval corresponding to the time between two images as $p_i = (x_i, y_i), i = 1, ..., N_{t,i}$. $N_{t,i}$ is the length of the trajectory *i*. We concatenate all the displacements travelled by each bead in one vector *P* as $P = \{p_1, p_2, ..., p_{N_b}\}$. N_b is the number of tracked beads for a given incution time. *P* is reshaped so that it is a one dimensional vector of size $\left(1, \sum_{i=1}^{N_b} N_{t,i}\right)$. For each incubation time, we evaluated the standard deviation of the displacement distribution given by the vector *P*:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{m} \sum_{i=1}^{m} (P_i - \bar{P})^2} \quad \text{, with } m = length(P) \text{ and } \bar{P} = mean(P) \tag{4.1}$$

For each incubation time, we now have one aggregated value representing the global state of the biofilm growth.

2.6.2. Individual bead contributions

As each trajectory provides information on its surrounding environment, the bead motions are also individually evaluated. Vector of displacements provided by tracking process for all beads constitute a lot of data for observations of hundreds of beads during all the biofilm growth. In order to describe these trajectories with a small number of values, the track vectors are replaced by few characteristic criteria describing the distribution of the displacement along the motion. Each criteria aggregates information given by each bead displacement measured with the DIC algorithm. The motion can be analysed more quantitatively using these various criteria. For each track, discriminating parameters are calculated. These parameters are based on the statistical distribution of the displacements and the geometry of the whole trajectory. From the time-dependent displacement [X(t), Y(t)] of each microsphere, each track is associated with a n-uplets of seven parameters :

• the diagonal of the minimal rectangular box that encompass a given trajectory :

$$c_1 = \sqrt{(max(cumsum(X)) - min(cumsum(X)))^2 + (max(cumsum(Y)) - min(cumsum(Y)))^2}$$

$$(4.2)$$

• the mean velocity along the trajectory :

$$c_2 = mean\left(\sqrt{\frac{X^2 + Y^2}{\Delta t}}\right) \quad ; \tag{4.3}$$

• the standard-deviation of the velocities distribution of the bead at each point of the trajectory :

$$c_3 = std\left(\sqrt{\frac{X^2 + Y^2}{\Delta t}}\right) \quad ; \tag{4.4}$$

• the standard deviation of the displacement distribution along the transverse and vertical directions (one parameter for each component) :

$$c_4 = std(X)$$

$$c_5 = std(Y) \quad ; \tag{4.5}$$

• the skewness of the distribution of the displacement along the transverse and vertical directions (one parameter for each component) :

$$c_6 = skw(X)$$

$$c_7 = skw(Y) \quad . \tag{4.6}$$

These parameters are expected to evaluate how the motion of the beads within the bacterial suspension are far away from a normal diffusion. Then, they are used to classify the trajectories in clusters in order to clearly differentiated the active motions, the random tracks and the blocked beads. In order to restrict the trajectories criteria to the most influential, a principal component analysis (PCA) is carried out. It allows to describe the more information on the tracks with the less number of criteria. From seven parameters, three principal components are constructed. Each trajectory is represented in the new coordinate system of the three principal components (PC1,PC2,PC3). From the three principal components found above, a Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise (DBSCAN) algorithm (Ester et al., 1996) is used to detect two unsupervised clusters in the graph of the first 3 principal components. These principal components are subsequently related to the trajectories shape and thus the bead behaviour.

2.7. Repeatability Testing

Each experiment for S. aureus strain has been performed twice. In the following, the two replicates of test are referred as Replicate 1 and Replicate 2. For P. aeruginosa strain, the kinetic of growth has been performed only one time. The sensitivity of the biofilm growth is very dependent of the environmental conditions. More replicates of the tests would infer a lot of additional data, which represents a lot of analysis time.

3.Results

We cultivated *S. aureus* and *P. aeruginosa* in BHI medium in microplates at $37 \degree \text{C}$ in presence of microbeads. We observed the motion of the beads moving directly above the bottom part of the well. These inert beads provide a spherical geometry, no size variation and non-deformable probes of the behaviour of the medium surrounding the bacteria.

3.1. Kinetics of biofilms growth

The two strains were chosen for their various biofilm formation capacities and specificities as the BRT shows Fig. 4.2(a). The kinetic of biofilm growth inferred with the BRT for *S.aureus* shows that the immobilization of the beads occurs at 120 minutes. Furthermore, the beginning of the blockage occurs at 40 minutes. For *P.aeruginosa* strain, the blockage of the beads starts since the beginning of the incubation. The total vanishing of the spot, meaning the blockage of the beads, occurs near 80 minutes. Qualitatively, *P. aeruginosa* produces a very mucous matrix in a relatively short term as compared to *S. aureus* which forms biofilm in more time. rBFI for *P.aeruginosa* increases since the beginning whereas it doesn't for *S. aureus*. Thus, various behaviours of beads dynamics had to be expected in what follows. These various trends are shown Fig. 4.2(b).

FIG. 4.2. Relative BioFilm Indexes (rBFI) as a function of incubation time for P. aeruginosa and S. aureus.





3.2. Qualitative analysis of bead motion

By imaging the embedded beads with a high magnification, immediately above the bottom of the wells, we track the motion of individual particles at short timescales, for each incubation time. We first observe beads motions of two different bacterial mediums. The first bacterial suspension is made with a *P. aeruginosa* strain whereas the second is made with a *S. aureus* strain. Our experimental observations show that the motion of beads embedded in a bacterial suspension at 37 °C is a combination of active and thermal motion. Moreover, it appears that the beads motion differs according to the type of bacteria embedded in the growth medium. The path of beads that results of P. aeruginosa suspension differs from purely Brownian motion. Visual observations on beads trajectory within bacterial suspension during biofilm growth show that beads tend to move according to a privileged direction in the P. aeruginosa suspension. While the control beads undergoes a characteristic Brownian motion, the bacterial suspension beads sometimes shows an enhancement of the diffusion in its motion at the early time of incubation. For sufficient long times, particle tracks may be randomized, giving rise to Brownian-like behaviour. For S. aureus bath, the beads seem less mobile. They experience random motion, possibly disrupted by interactions with other particles. As the biofilm grows, the beads are slowed down until a complete blockage.

Four scenarios of bead motion were observed during the biofilm growth :

- purely passive motion : bead in a quasi-homogeneous medium ;
- dragged or ejected : homogeneously active or partially propelled bead;
- slowed down : bead in a viscous matter ;
- bounded passive : bead in a more viscous matter, where the thermal energy $k_B T$ is not enough.

These types of motion are variously observed in the two strain suspensions. The expression of the type of movement according to the strain is reported table 4.2. Fig. 4.3 illustrates the displacements of the bead along their track for different types of motion.

Motion Type Strain	Passive bead	Dragged/Ejected bead	Slowed down bead	Bounded bead
S. aureus	×		×	×
P. aeruginosa	×	×	×	×

TABLE 4.2. Types of observed motions for two strains

We suggest that the dragged and ejected motions are induced by bacterial bombardments in short-times. Microorganisms as *P. aeruginosa* swim and scan the surface. Whereas inert particles experience Brownian motion when they are embedded in a liquid medium, active bacteria are able to propel themselves with directed motion, and thus drive themselves out of equilibrium, entraining beads. Motion of beads embedded in a solution of BHI medium and *S. aureus* bacteria behaves like random diffusion at uniform velocity. There is no erratic superdiffusive motion. As biofilm grows, the amplitude of the motion decreases while keeping randomness characteristics. Without bacteria action, the passive beads experience Brownian motion trend for which directed motion are interrupted by random changes of direction. The Brownian motion is characterized by the mean squared displacement (MSD) $< \Delta r^2(\Delta t) >$ proportional to the time interval Δt between positions. Δr is the radial displacement during a time interval Δt . Theory predicts that, for a bead experiencing a purely two dimensional Brownian motion, $< \Delta r^2(\Delta t) >= 4D\Delta t^{\alpha}$ with $\alpha > 1$. In this study, the average values of the squared displacement of the microbeads embedded





in the bacterial solutions are calculated during the biofilm growth. For each trajectory, the average mean square displacement has been computed and curves of MSD as a function of time interval have been ploted. Fig. 4.4 and Fig. 4.5 represent the curves of the mean square displacement as a function of time interval for the two strains during the biofilm growth. For *P. aeruginosa*, few beads experiences superdiffusive motions, whereas for *S. aureus*, these behaviours have been barely observed.

FIG. 4.4. Mean square displacement as a function of time scale for beads embedded in P. *aeruginosa* suspension for different incubation times



From these previous observations, it appears that the bead motions can provide insights on the microbiological activity of bacteria. Whereas the motion of bead embedded in *S. aureus* suspension is relatively simple, the beads within *P. aeruginosa* biofilm exhibit different behaviours. This is consistent with the visual observations Fig. 4.3 which showed that particle tracks consisted of straight segments of different lengths (ballistic-like motion) more or less significant according to the interactions with bacteria and the surrounding medium. The random motion due to thermal agitation is biased by the active motility of the bacteria. Observing some bead trajectories is a first step to develop convenient strategy for the bead motion study. As MSD is valid for an homogeneous medium, it can not be used to define the motion of the beads embedded in the bacterial solutions. Through the lens of these qualitative observations, we then turn to a quantitative analysis by the definition of quantitative criteria to describe the beads motion.

FIG. 4.5. Mean square displacement as a function of time scale for beads embedded in S. *aureus* suspension for different incubation times

(a) Diffusion of beads embedde in *P. aeruginosa* suspension



3.3. S. aureus : quantitative analysis of the biofilm formation

First, the analysis of the distribution of the bulk displacements of all beads tracked for each read incubation time has been performed as described in the section 2.6.1. Fig. 4.6 represents the standard deviation of the distribution of the displacements of beads as a function of the incubation time for two replicates of *S. aureus* suspension and for the two replicates of blank well (composed of the same microbeads in BHI medium). The standard deviation increases at the early stage of the biofilm growth. This increasing period is also observed in the control blank. Then, at 20 minutes, the standard deviation decreases for the beads in the bacterial bath whereas it stabilizes for the control blank. After about 140 minutes, the standard deviation of the displacements drops. In view of the smooth distribution of points, curves are fitted with piecewise linear function. Bi-linear or trilinear functions are used to fit the curves depending on the condition tested. We fisrt fit the curves with a bilinear function. If the \mathbb{R}^2 coefficient is too low, a tri-linear function is choosen to fit the curves. The equations of the two types of fit curves are :

Bi-linear regression :
$$\begin{cases} \alpha . t + b & \text{for } t \leq \tau_1 \\ \alpha_1 (t - \tau_1) + \alpha . \tau_1 + b & \text{for } \tau_1 \leq t \end{cases}$$
(4.7)

Tri-linear regression :
$$\begin{cases} \alpha.t+b \quad \text{for } t \leq \tau_1 \\ \alpha_1(t-\tau_1) + \alpha.\tau_1 + b \quad \text{for } \tau_1 \leq t \leq \tau_2 \\ \alpha_2(t-\tau_2) + \alpha\tau_1 + \alpha_1(\tau_2 - \tau_1) \quad \text{for } \tau_2 \leq t \end{cases}$$
(4.8)

This regression allows to identify analytical parameters and describes the standard deviation change with few indicators. The models and their parameters are schematically described Fig. 4.7. The slopes of the second and third parts of the multi-linear fits α_1 and α_2 as well as the times of the break in slope τ_1 and τ_2 are reported. α_1 and α_2 represent a change in the beads behaviour; τ_1 and τ_2 are the times of these shifts. Their numerical values for the two replicates are reported Table 4.4.

By modelling the change of standard deviation as a function of incubation time by various regular curves, we discriminate two series of conditions. Furthermore, the models can describe the two series of conditions with a small number of parameters.

In a second phase, an analysis of the individual bead contributions has been performed in order to take into account the local beads surroundings. For each trajectory, seven criteria based on the distribution of the displacements are measured as described in the section 2.6.2. A PCA is implemented in order to reduce the dimension of the dataset. The first principal component (PC1) represents on average 60% of the total information whereas PC2 and PC3 represent on average 14% of information each. We represented all the tracked trajectories for all observation times in the new coordinate system built up with (PC1,PC2,PC3). Differences in point densities can be detected in the distribution of FIG. 4.6. Standard deviation of all the displacements for each incubation time for S. aureus bath.



FIG. 4.7. Models for the standard deviation of all the displacement for each incubation time and inferred parameter. In a), bilinear model is described by the time of the break in slope τ_1 and the slope of the second part of the bilinear regression α_1 . In b), Tri-linear fit is characterized by the times of the break in slope τ_1 and τ_2 as well as the slopes of the second and third parts of the tri-linear regression α_1 and α_2 . In both cases, α and b represent respectively the slope of the first linear part and the vertical interception.


trajectories in the new coordinate system (Fig. 4.8(a)). All trajectories can be divided in two clusters as seen Fig. 4.8(b)). The proportion of beads in each cluster according to the incubation time is calculated and reported on a graph (Fig. 4.8(c)). The change in the proportion of beads in each cluster is very smooth and can be divided in three steps. The times of these step breaks are reported in table 4.3. For the control blank, only one cluster is distinguished as seen Fig. 4.9. The analysis of the second replicate shows similar results.

FIG. 4.8. Principal component analysis and clusterization - The yellow cluster gathers the beads experiencing blocked motions

(a) Distribution of trajectories in the new coor- (b) Clusters in the new coordinate system dinate system (PC1,PC2,PC3) (2D projection)



(c) Trajectory proportion as a function of incubation time in violet cluster



TABLE 4.3. Parameters inferred from the proportion curves in figure 4.8

Replicate	Strain	$\tau_1 \ (\min)$	$ au_2 (\min)$
1	S. aureus	97.2	142.7
2	S. aureus	70.9	160

3.4. P. aeruginosa : quantitative analysis of the biofilm formation

As previously, we first analyse the distribution of the bulk displacements of all beads tracked for each observation time for P. aeruginosa suspension. Fig. 4.10 represents the

FIG. 4.9. Principal component analysis and clusterization - Blank

(a) Distribution of trajectories in the new coor- (b) Clusters in the new coordinate system dinate system (PC1,PC2,PC3) (2D projection)



(c) Trajectory proportion as a function of incubation time in violet cluster



standard deviation of the beads displacements distribution as a function of the incubation time. As for *S. aureus* suspension, the change in the standard deviation is modelled by a piecewise linear function. A slight increase in the standard deviation is detected in the first moments, then the standard deviation decreases very slightly. This behaviour is valid for both the blank and the bacterial suspension.

FIG. 4.10. Standard deviation of all the displacements for each incubation time for P. *aeruginosa* bath.



We also analysed the individual bead motion. We compute the seven parameters, previously defined, for each particle. After a PCA on the dataset comprised of the seven parameters of each trajectories, we group all the trajectories reported during the biofilm growth in a final new coordinate system built up with (PC1,PC2,PC3). As previously, we make clusters to gather beads corresponding to the same motion features. Each trajectory belongs to a cluster or is considered as noise. We then enumerate the number of trajectories in each clusters according to the incubation time. Similarly to what has been done for *S. aureus*, Fig. 4.11(b) shows the clusters repartition. Fig. 4.11(c) shows the change in the number of beads belonging to one cluster during the biofilm growth for *P.aeruginosa* strain. As the biofilm grows, the global trend shows an increase of the blocked beads. Nevertheless, the decrease is not regular. There is a high variability in the values according to the incubation times. This variability may be due to the heterogeneity of the *P. aeruginosa* biofilm formation.

The variability of the proportion of blocked beads through the growth time shows that the number of blocked beads can vary significantly. Results on P. aeruginosa may explain that the biofilm formation is more heterogeneous. We note that the analysis of the individual bead behaviour shows that the beginning of a particular activity in the bacterial suspension occurs since the first minutes of growth. For comparison, Fig. 4.12 shows the distribution of the trajectories of beads in the blank solution. One principle cluster is determine. No bead seems blocked.

FIG. 4.11. Principal component analysis and clusterization - P.aeruginosa

⁽a) Distribution of trajectories in the new coor- (b) Clusters in the new coordinate system dinate system (PC1,PC2,PC3) (2D projection)



(c) Trajectory proportion as a function of incubation time in violet cluster



3.5. S. aureus : effect of antibiotics on biofilm formation

The characterization of the the effect of antibiotics is an important issue in the pharmaceutical industry. We tested here two antibiotics to detect their ability to delay or stop the biofilm formation. Vancomycin and Fusidic Acid at concentration $4\mu g/mL$ and $2\mu g/mL$ respectively are added to the bacterial suspension. The same processing of experimental data is realized. Fig. 4.13 shows the change in the standard deviation as a function of incubation time for a *S. aureus* suspension including antibiotics. As the biofilm grows in presence of Vancomycin or Fusidic acid, the standard deviation increases in early periods of the biofilm growth and then decrease more slowly than without antibiotic. Bi-linear functions fit the curves of the standard deviation for the bacterial suspension with antibiotics are reported and compared with blank control and *S. aureus* suspension without antibiotic in Table 4.4. The change in the standard deviation of the distribution of the displacements

FIG. 4.12. Principal component analysis and clusterization - Blank

(a) Distribution of trajectories in the new coor- (b) Clusters in the new coordinate system dinate system (PC1,PC2,PC3) (2D projection)



(c) Trajectory proportion as a function of incubation time in violet cluster



allows us to discriminate the presence of antibiotics in the bacterial bath. In presence of antibiotics, the standard deviation curves look like those of blank control.

FIG. 4.13. Standard deviation of all the displacement for each incubation time in presence of antibiotics



TABLE 4.4. Parameters inferred from the standard deviation curves

Replicate	Condition	$ au_1 \ (\min)$	$ au_2 \ (\min)$	$\alpha_1 \text{ (pixel/min)}$	$\alpha_2 \text{ (pixel/min)}$
1	S.aureus	13.95	143.44	-0.00026	-0.0031
	Blank	21.79	n/a	$1.63 \ 10^{-5}$	n/a
	S.aureus + Vancomycin	22.64	n/a	-0.00014	n/a
	S.aureus + Fusidic ac.	15.44	n/a	-0.00011	n/a
2	S.aureus	27.88	129.44	-0.00034	-0.0025
	Blank	26.50	n/a	$-7.28 10^{-5}$	n/a
	S.aureus + Vancomycin	22.93	n/a	-0.00011	n/a
	S.aureus + Fusidic ac.	28.61	n/a	$-7.54 \ 10^{-5}$	n/a

Furthermore, the analysis of individual beads motion through the determination of three equivalent parameters in a new coordinate system (PC1,PC2,PC3) shows that the DBS-CAN algorithm allows the detection of one principal cluster and an other smaller one (Fig. 4.14 and Fig. 4.15). The scatter-plot in Fig. 4.14(b) and in Fig. 4.15(b) are more expended in the direction of the first principal component than the scatter-plot resulting for the blank (BHI + beads only). A small proportion of beads corresponds to a different type of motion, but these beads are not the major part. According to our method, the two antibiotics avoid the immobilization of the beads.

A BRT has been realized in order to compare the results of our method with the change in BFI according to the incubation time. For *S. aureus* suspension in presence of antibiotics,

FIG. 4.14. Principal component analysis and clusterization - S. aureus in presence of Vancomycin

(a) Distribution of trajectories in the new coor- (b) Clusters in the new coordinate system dinate system (PC1,PC2,PC3) (2D projection)



(c) Trajectory proportion as a function of incubation time in violet cluster



FIG. 4.15. Principal component analysis and clusterization - S. aureus in presence of Fusidic acid

(a) Distribution of trajectories in the new coor- (b) Clusters in the new coordinate system dinate system (PC1,PC2,PC3) (2D projection)



(c) Trajectory proportion as a function of incubation time in violet cluster



the curves of rBFI as a function of incubation time (Fig. 4.16) show that antibiotics limit the beads adhesion. The enumeration of adhered bacteria in the wells of S. aureus suspension with or without antibiotics (Fig. 4.17) proves the action of both antibiotics on the bacterial adhesion.

FIG. 4.16. Relative BioFilm Index as a function of incubation time for S. aureus in presence of antibiotics



FIG. 4.17. Adhered bacterial enumeration for S. aureus with and without antibiotics (CFU)



4. Discussion and Conclusion

The qualitative observations of beads motion during the biofilm growth of *P. aeruginosa* and S. aureus reveal various types of displacement of beads. For both strains, biofilm formation induces trapped beads. Generally, for the S. aureus strain, the amplitude of the motion decreases with biofilm growth while keeping randomness characteristics whereas the beads embedded in *P. aeruginosa* suspension often experienced erratic ejection. In this paper, our method detects, at the microscale level, biological events which can be related to bacterial adhesion or biofilm growth. To this end, the motion of microscopic beads embedded in bacterial suspensions of S. aureus or P. aeruginosa has been tracked thanks to an optical setup coupled with a DIC algorithm. Due to the large number of data generated by the measure of the trajectories, the later have been characterized by specific features. On one hand, all the displacements during the elementary time intervals of all the trajectories tracked are mixed together for each read incubation time. On the other hand, the beads are take into account individually and our criteria allow to describe the bead behaviour. Thanks to this tracking and analysis methodology, we discriminate quantitative characteristic times during the biofilm growth. For analysis of the bulk displacements as well as the analysis of the individual bead displacements, we detect a biological event at around 140 minutes of incubation for S. aureus. Moreover, the classification of beads in two clusters in a well chosen frame allows to detect in a fine way the beginning of the blockage of the bead. For S. aureus, the beginning of the blockage appears around 71 minutes and 97 minutes according to the replicate at stake. A second event seems to appear at around 143 and 160 minutes. These trend are consistent with the BRT results. No adhesion occurs in the first times (rBFI = 0), then the blockage of the beads appears progressively (increase of rBFI) until a major part of the beads is blocked (rBFI maximum). The study of the action of two antibiotics on S. aureus biofilm has shown that the analysis of microscopic displacements of inert beads allows to discriminate the efficiency of the antibiotics as compared with bacterial suspension without antibiotics. Indeed, in presence of antibiotics (indifferently for one or the other antibiotic), the change in standard deviation of the bulk displacements according to the incubation time follows the same trend than the blank control. For P. aeruginosa biofilm, the results are more variable. Even if the global trend of the curves tends to validate the BRT results, the variability of the reported values limits the accurate detection of the timing of the change in physical behaviour within the growing biofilm. Nevertheless, this variability is not meaningless. It may relies on the heterogeneous way P. aeruginosa forms biofilm. Indeed, the literature has reported P. aeruginosa biofilms as scattered flocs of bacterial microcolonies (also known as "mushrooms") (Rogers et al., 2008).

These results are consistent with the BioFilm Ring Test[®] and the adhered bacterial enumeration results. Nevertheless, this methodology has the advantage of being potentially fast and being conducted continuously. Indeed, the use of a non-contact measurement enables a non invasive test which allows a lot of consecutive incubation time analysis with a reduce cost in terms of consumables and labour.

Chapitre 5

Biofilm sous chargement volumique à l'aide d'un champ magnétique : travaux préliminaires

Sommaire

5.1 Motivations			
5.2 Magnétisme dans les applications biologiques			
5.2.1 Superparamagnétisme $\dots \dots \dots$			
5.2.2 Pinces magnétiques $\dots \dots \dots$			
5.3 Problématiques			
5.4 Configurations des aimants			
5.5 Marquages			
5.5.1 Marquages macroscopiques $\dots \dots \dots$			
5.5.2 Marquage microscopique			

5.1 Motivations

L'objectif de ce chapitre est de constituer un résumé des travaux préliminaires qui ont été effectués dans l'optique de la mise au point d'un essai mécanique du biofilm suivi par une méthode de corrélation d'images numériques. Ces travaux sont sous la forme de synthèse bibliographique, de simultations et d'essais expérimentaux. Le déroulement de ce travail de thèse a commencé avec une étude sur la possibilité d'adapter le BioFilm Ring Test[®] en une version de banc d'essai mécanique. L'aspect banc d'essai a été envisagé par le contrôle des mouvements des microbilles par un champ magnétique afin de solliciter le biofilm déjà formé. Les microbilles magnétiques, contrôlées par un aimant, peuvent s'agréger sous une forme particulière ou être soumises à des forces qui engendrent un déplacement individuel maîtrisé. L'objectif était de tirer partie de la méthode de corrélation d'images numériques (CIN) pour suivre le déplacement des billes individuelles ou du groupe de microbilles pour remonter aux propriétés mécaniques du matériau biofilm. Dans ce cas, ce sont les billes ou le groupe de billes qui créent le marquage dont les déplacements pourraient être mesurés par la CIN. L'aspect non-invasif du marquage par le biais des billes et de la mesure des déplacements par une méthode de CIN a l'avantage de rendre le test mécanique du biofilm dynamique. L'utilisation de champ magnétique permet de solliciter les billes de telle sorte que la force appliquée est assez grande pour déformer le biofilm mature.

Avant de découvrir le potentiel des analyses à l'échelle microscopique, et en l'absence de microscope adapté à l'observation et à l'enregistrement d'images en champ proche, les premiers essais se sont donc focalisés sur l'étude d'un protocole pour l'observation du mouvement des microbilles piégées au sein du biofilm et contrôlées par un aimant. Aussi, dans les premiers temps de ces travaux, le mode de sollicitation des billes au sein du biofilm était le même que pour le BioFilm Ring Test[®] : l'aimantation permanente. Toutefois, pour avoir plus de contrôle sur la sollicitation, la mise en place d'un électroaimant a très vite été envisagée. Des cartographies du champ magnétique et de la force magnétique agissant sur les microbilles et générée par différentes configurations d'électroaimants ont été obtenues par simulations éléments finis afin de se rendre compte de la pertinence de ce mode de sollicitation.

5.2 Magnétisme dans les applications biologiques

Nous détaillons dans cette section, quelques aspects relatifs au contrôle de billes superparamagnétiques par l'application d'un champ magnétique qui sont nécessaires pour la mise en place d'une stratégie de test mécanique des biofilms par des forces volumiques.

5.2.1 Superparamagnétisme

Les champs magnétiques peuvent être créés par des matériaux magnétiques ou des courants électriques. En électromagnétisme, le champ magnétique \vec{B} résulte de ces deux contribu-

tions :

$$\vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{M})$$
 (5.1)

 \vec{H} correspond à l'aimantation locale de la matière sous l'effet d'un champ électromagnétique externe généré par un courant contrôlable. \vec{M} correspond au champ magnétique dû à la magnétisation du matériau magnétique. $\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7} \text{ T.m.A}^{-1}$ est la perméabilité magnétique du vide.

Les matériaux magnétiques sont classés selon leur susceptibilité magnétique c'est-à-dire leur capacité à délivrer un champ magnétique. Le champ magnétique peut être permanent (matériaux ferromagnétiques) ou induit (matériaux paramagnétiques ou diamagnétiques). Les matériaux ferromagnétiques sont responsables du magnétisme permanent. Les atomes de ces matériaux sont regroupés en régions microscopiques dans lesquels les moments magnétiques de tous les atomes sont orientés dans la même direction. Ces régions sont appelées domaines. À partir d'un matériau désaimanté ($B = \mu_0 H = 0$), l'application d'un champ magnétique extérieur oriente les moments magnétiques dans la même direction que le champ jusqu'à l'aimantation de saturation M_S , lorsque tous les moments sont orientés dans la même direction. Lorsque que le champ externe est retiré, le matériau retient une partie de l'aimantation M_R . Il existe une aimantation rémanente. La magnétisation d'un matériau ferromagnétique n'est pas linéaire et dépend de l'histoire du champ qui lui a été appliqué : c'est l'hystérésis magnétique (Fig. 5.1).

Les matériaux paramagnétiques ont un champ magnétique induit et non rémanent. En l'absence de champ magnétique, les moments dipolaires des atomes magnétiques du matériau paramagnétique n'ont pas de direction privilégiée et par conséquent, l'aimantation du matériau est nulle. À l'inverse, en présence d'un champ magnétique extérieur, le matériau paramagnétique acquiert une aimantation due à l'alignement des moments magnétiques de ses atomes dans la direction du champ magnétique. L'aimantation induite est proportionnelle au champ extérieur \vec{H} . La capacité pour un matériau à s'aimanter est donnée par la susceptibilité magnétique χ_M (sans dimension) :

$$\vec{M} = \chi_M \vec{H} \tag{5.2}$$

Le superparamagnétisme est un cas particulier des matériaux ferromagnétiques lorsque ceux-ci sont réduits à un seul domaine, généralement lorsque le matériau est réduit à une nanoparticule. Le matériau superparamagnétique se comporte comme un matériau paramagnétique (aimantation induite et absence de champ rémanent) mais sa similarité avec les matériaux ferromagnétiques fait que la susceptibilité des matériaux superparamagnétiques est bien supérieure à celle des matériaux paramagnétiques.

Les microbilles superparamagnétiques sont des composites constitués de plusieurs cen-

taines à plusieurs milliers de grains d'oxyde de fer magnétiques de taille nanométrique inclus dans une matrice sphérique polymère. Chaque nanocristal possède un moment dipolaire magnétique dont la direction n'a pas d'orientation privilégiée en l'absence de champ magnétique extérieur (Fig. 5.2). En présence d'un champ magnétique extérieur, les microbilles atteignent rapidement leur saturation d'aimantation grâce à la susceptibilité élevée ($\chi \approx 1$) des nanoparticules superparamagnétiques. À l'arrêt du champ extérieur, les directions des moments magnétiques se désordonnent et la bille retrouve son état nonmagnétique. L'allure de l'aimantation d'une bille superparamagnétique est représentée Fig. 5.1.

FIG. 5.1. Courbe d'aimantation pour différents types de matériaux magnétiques. Les matériaux ferromagnétiques (rose) présentent une hystérésis d'aimantation. L'aimantation induite arrivée à saturation M_S ne retourne pas à 0 à l'arrêt du champ magnétique extérieur; il subsiste une aimantation rémanente M_R . Les matériaux paramagnétiques (vert) sont capables d'avoir une aimantation induite sans aimantation rémanente à l'arrêt du champ magnétique. Le superparamagnétisme (bleu) se comporte comme un matériau paramagnétique mais a une susceptibilité magnétique élevée comme les matériaux ferromagnétiques.



5.2.2 Pinces magnétiques

Les billes superparamagnétiques possèdent un moment magnétique \vec{m} qui dépend de l'orientation et de l'intensité du champ magnétique extérieur. Sous l'effet du champ, la microbille est soumise à un couple qui tend à aligner son moment magnétique avec le champ \vec{B} . La force magnétique agissant sur une bille superparamagnétique dans un champ magnétique $H = B/\mu_0$ est proportionnelle au volume de la bille V et à sa susceptibilité magnétique relative $\Delta \chi$:

$$\vec{F}_{mag} = \frac{V\Delta\chi}{\mu_0} (\vec{B}\nabla)\vec{B}$$
(5.3)

La susceptibilité détermine le comportement magnétique du matériau magnétique dans un champ, s'il est attiré ou repoussé dans le champ. La force dépend de $\nabla \vec{B}$ et $\Delta \chi$ est positif pour un matériau superparamagnétique, ce qui signifie que la force qui agit sur la bille tend à faire avancer la bille vers les endroits à fort gradient de champ magnétique (Fig. 5.2).

FIG. 5.2. Principe d'une microbille superparamagnétique dans un champ magnétique



En dehors de la force d'aimantation, les microbilles sont aussi soumises à des forces de gravité et à des forces hydrodynamiques. La valeur des forces de gravité s'exprime par la relation :

$$F_{qrav} = m_{rel}.g\tag{5.4}$$

où $m_{rel} = (\rho_b - \rho_{BHI}) \times V$ est la masse de la bille en prenant en compte la poussée d'Archimède. ρ_b et ρ_{BHI} sont respectivement les masses volumiques de la bille et du milieu BHI. Néanmoins, cette force peut souvent être négligée du fait de sa très faible intensité relative dans le cas de particules micrométriques (Lipfert et al., 2009).

La force hydrodynamique est exprimée par l'équation de Stockes :

$$F_d = 6\pi\eta a v_p \tag{5.5}$$

où η est la viscosité dynamique du milieu dans lequel se trouve la bille, *a* est le rayon de la particule, v_p est la vitesse de la particule.

Il est donc possible de contrôler le déplacement de billes superparamagnétiques par le biais de l'application d'un gradient de champ magnétique. Les billes ainsi contrôlées permettent d'exercer des forces de compression, de traction ou de torsion sur des surfaces ou au sein même de matériaux. C'est le principe des pinces magnétiques (Sarkar and Rybenkov, 2016). Les pinces magnétiques délivrent un champ magnétique calibré de manière à pouvoir contrôler à distance le déplacement des billes magnétiques qui ont alors un rôle précis : manipuler des molécules accrochées à la bille (ADN par exemple) ou exercer des forces sur le matériau dans lequel les billes sont insérées pour des essais de microrhéologie afin de déterminer des propriétés locales de matériaux mous. Ces techniques de micromanipulation ont été utilisées pour la manipulation de billes magnétiques à l'intérieur de cellule dans plusieurs directions (de Vries et al., 2005), pour des études mécaniques de matériaux polymères (Ziemann et al., 1994) ou plus récemment, pour cartographier des paramètres mécaniques au sein de biofilm d'*E. coli* (Galy et al., 2012). Dans les applications de microrhéologie, la force magnétique agissant sur la bille est calibrée par un équilibre des forces avec la force hydrodynamique (voir équation (5.5)). Les forces développées par le magnétisme des pinces sont relativement faibles. Elles s'échelonnent entre quelques dizaines de piconewtons à quelques dizaines de nanonewtons (Kilinc and Lee, 2014). Les configurations des pinces magnétiques sont souvent adaptées à l'application désirée. Elles varient en termes de nombre d'aimants, du choix de la source d'aimantation (aimantation permanente ou électroaimant) et de la forme des pôles magnétiques. Ces paramètres sont déterminés par rapport aux directions et à l'intensité de la force nécessaire au déplacement des billes dans l'application ciblée (Lipfert et al., 2009).

5.3 Problématiques

Afin de répondre au troisième objectif de cette thèse qui concerne l'étude du suivi de la déformation du biofilm sous sollicitation volumique, des essais préliminaires ont été réalisés. L'objectif était de prospecter les solutions envisageables afin d'adapter le BRT en banc d'essai. Ces premiers travaux se sont décomposés en l'examen de deux problèmes : 1) le contrôle de la source de champ magnétique et 2) la définition d'un marquage constitué de billes au sein du biofilm et capable d'être suivi par CIN. D'après ce qui précède, il est possible de contrôler le déplacement des billes en générant un champ magnétique hétérogène ayant un gradient homogène afin de pouvoir activer le déplacement des billes superparamagnétiques. Des configurations d'électroaimants sont donc étudiées. Elles sont basées sur le principe des pinces magnétiques. En parallèle, la définition d'un motif composé de l'agrégation des billes doit être établie afin de pouvoir servir de marquage pour une analyse par une méthode de corrélation d'images numériques. Nous avons étudié deux types de marquage, en champ lointain et en champ proche.

5.4 Configurations des aimants

Afin de comprendre comment les lignes de champ magnétique sont réparties dans un espace contenant le biofilm à étudier, des simulations par éléments finis ont été réalisées. Plusieurs configurations ont été envisagées.

Une première étude a consisté à simuler le champ magnétique délivré par les aimants utilisés dans le BRT (Fig. 5.3). Le champ magnétique délivré est fort. Il est de quelques centaines de mili Tesla juste au dessus de l'aimant. Les billes au fond des puits des microplaques de 96 puits sont donc soumises à un champ magnétique relativement fort. Néanmoins, dès que l'on s'éloigne du pôle de l'aimant, le champ s'atténue très rapidement, les forces magnétiques aussi.

FIG. 5.3. Simulation avec FEMM du champ magnétique (Tesla) délivré par l'aimant du BRT.



Les aimants permanents, bien que puissants en termes de champ magnétique délivré, ont pour inconvénient de ne pas être contrôlable en intensité. Générer un champ magnétique avec un électroaimant est rapidement devenu une solution préférée dans la suite. Les électroaimants sont constitués de bobines de N spires de fil de cuivre de diamètre d parcourues par un courant I et d'un noyau en matériau ferromagnétique. Lorsque le courant circule dans les spires, un champ magnétique est généré au centre de celles-ci et le noyau ferromagnétique s'aimante. Si le matériau qui sert de noyau est bien choisi, il n'existe pas d'aimantation rémanente à l'arrêt du courant.

A partir de la configuration utilisée dans Galy et al. (2012), plusieurs configurations d'électroaimants ont été simulées numériquement avec le logiciel FEMM (Meeker, 2015) afin de calibrer le champ magnétique disponible pour contrôler les microbilles. Dans les travaux de Galy et al. (2012), N = 2120, d = 0.56 mm et I = 4 A. Ces paramètres ont été fixés et l'influence du nombre de pôle(s), de la forme du(des) pôle(s) et de la distance entre deux pôles a été étudiée dans 4 autres configurations. Le récapitulatif des configurations est donné dans le tableau 5.1.

La cartographie des forces magnétiques s'appliquant sur une microbille superparamagnétique de diamètre $2.8\mu m$ a été définie à partir de la simulation par éléments finis du champ magnétique et de l'équation (5.3).

Config.	Nombre de pôles	Distance entre pôle	Schéma
1	2	$1.7~\mathrm{mm}$	
2	2	10 mm	
3	2 - Aiguisé	$10 \mathrm{~mm}$	
4	2	$35~\mathrm{mm}$	
5	1	n/a	

TABLE 5.1. Récapitulatif des différentes configurations de pinces magnétiques simulées

Configuration 1 Dans le cadre des essais de Galy et al. (2012), le biofilm était observé dans une flow cell. Les pôles aimantés étaient séparés d'une distance de 1.7 mm. Dans ce cas, le champ magnétique généré par les électroaimants permet d'engendrer une force sur les billes allant de quelques dizaines de pN à une centaine de pN pour les endroits les plus proches des pôles. La présence de deux pôles en face l'un de l'autre (pôle nord face au pôle nord) permet de concentrer les lignes de champ qui partent des pôles, au centre de ceux-ci (Fig. 5.4).

FIG. 5.4. Configuration 1 : simulation d'aimants autour d'une chambre à flux.



(a) Champ magnétique délivré. L'échelle est graduée par des intervalles de $0.05~{\rm Tesla}$ - de 0 à 1 Tesla.

(b) Cartographie de la force appliquée à une bille. L'échelle est en pN.



Configuration 2 Afin de pouvoir adapter un électroaimant sur le protocole du BRT, une simulation du champ magnétique généré par la configuration précédemment utilisée pour le biofilm en flow cell a été étudiée avec une distance entre pôles de 10 mm qui est la valeur du diamètre d'un puits de microplaque (Fig. 5.5). Dans ce cas, le gradient du champ magnétique est plus fort dans la partie centrale entre les deux pôles, donc la force magnétique agissant sur une bille est plus grande mais reste inférieure à quelques dizaines de pN. Cette configuration permet de disperser les lignes de champ entre les deux pôles mais la valeur du champ magnétique reste moins importante que dans le cas de la configuration 1, ce qui engendre des forces magnétiques moins importantes.

FIG. 5.5. Configuration 2 : simulation d'aimants autour d'un puits de microplaque de 96 puits.





(b) Cartographie de la force appliquée à une bille. L'échelle est en pN.



Configuration 3 Des simulations numériques ont ensuite permis de calculer les champs magnétiques pour une forme de pôles différente. La forme aiguisée des pôles entraîne des concentrations de champ magnétique élevées. Cependant, le gradient de champ magnétique est élevé de manière très locale, ce qui engendre des concentrations de hautes forces magnétiques au niveau des pointes des pôles seulement (Fig. 5.6).

FIG. 5.6. Configuration 3 : influence de la forme des pôles.



(a) Champ magnétique délivré. L'échelle est graduée par des intervalles de $0.05~{\rm Tesla}$ - de 0 à 1 Tesla.

(b) Cartographie de la force appliquée à une bille. L'échelle est en pN.



Configuration 4 Dans cette configuration, les deux pôles de forme carrée sont éloignés d'une distance de 35 mm, ce qui correspond à une taille standard d'une boîte de pétri. Dans ce cas, les forces magnétiques générées proches des pôles sont de l'ordre de quelques dizaines de pN (Fig. 5.7). Néanmoins, dans la zone qui correspond virtuellement au centre

de la boîte de pétri, les forces sont nulles. Dans le cas d'un biofilm formé en boite de pétri, l'utilisation d'une telle configuration d'aimant entraîne donc une grande surface sur laquelle les billes ne sont pas contrôlables.

FIG. 5.7. Configuration 4 : simulation d'aimants autour d'une boîte de pétri.



(a) Champ magnétique délivré. L'échelle est graduée par des intervalles de 0.05 Tesla - de 0 à 1 Tesla.

(b) Cartographie de la force appliquée à une bille. L'échelle est en pN.



Configuration 5 Cette configuration correspond à celle du BRT mais avec l'utilisation d'un électroaimant. De plus, la taille du noyau ferromagnétique est plus grande (10 mm) que celle de l'aimant permanent présent dans le BRT (quelques mm). De manière similaire à la configuration du BRT (Fig. 5.3), le champ magnétique délivré juste au-dessus du pôle est assez fort. Les forces magnétiques sont très localisées sur les angles du pôles (Fig. 5.8).

FIG. 5.8. Configuration 5 : simulation du BRT avec une aimantation contrôlée.



(a) Champ magnétique délivré. L'échelle est graduée par des intervalles de $0.05~{\rm Tesla}$ - de 0 à 1 Tesla.

(b) Cartographie de la force appliquée à une bille. L'échelle est en pN.



Le champ magnétique entre deux pôles est dépendant de la constitution (choix de la bobine et du matériau du noyau) des aimants mais aussi du placement relatif de ceux-ci. L'éloignement des deux pôles diminue l'intensité de la force magnétique applicable à des billes magnétiques. Par ailleurs, les angles de la forme du noyau magnétique créent des concentrations des lignes de champ magnétique. Ceci engendre des forces magnétiques élevées au niveau des angles du pôle.

5.5 Marquages

5.5.1 Marquages macroscopiques

Des possibilités de marquages macroscopiques ont été examinées lors de ce travail. À l'instar du spot formé dans le cas de BRT, l'assemblage de microbilles peut, sous certaines conditions, former un motif visible à l'œil nu. Le déplacement de ce motif, sous l'effet d'un champ magnétique, pourrait être suivi par CIN. Dans le même principe que le BRT, la mise en place d'un électroaimant (du même type que celui de la configuration 5 évoquée précédemment) en dessous d'une boîte de pétri remplie d'une solution de microbilles superparamagnétiques permet de former une couronne de microbilles. En déplaçant l'aimant latéralement (schéma en Fig. 5.9), le marquage constitué de microbilles commence dans un premier temps à se diffuser puis les billes reforment un marquage en couronne au dessus du nouvel emplacement de l'aimant. Les images obtenues expérimentalement pour ce type de sollicitation sont montrées en Fig. 5.10.

FIG. 5.9. Schéma de principe pour un marquage par un cercle lorsque l'électroaimant se déplace latéralement



Par le même principe, à partir d'un marquage de microbilles en forme de couronne, un déplacement vertical de l'aimant qui s'éloigne du fond de la boîte de pétri entraîne un élargissement diffus de la couronne de billes. Selon l'éloignement de l'électroaimant, le gradient de champ magnétique peut être assez élevé pour permettre au marquage en couronne de se reformer avec un diamètre plus grand (schéma en Fig. 5.11). Si le gradient de champ magnétique n'est pas assez élevé, la couronne de billes reste diffuse. Les images

FIG. 5.10. Effet du déplacement latéral de l'aimant sur le marquage (expérimental)



obtenues expérimentalement pour ce type de sollicitation sont montrées en Fig. 5.12.

FIG. 5.11. Schéma de principe pour un marquage par un cercle lorsque l'électroaimant se déplace verticalement



FIG. 5.12. Effet du déplacement vertical de l'aimant sur le marquage (expérimental)



5.5.2 Marquage microscopique

Afin d'envisager une étude en champ proche du biofilm sollicité en son sein par des billes contrôlées par champ magnétique, des prises d'images au microscope droit ont été réalisées. En présence de l'aimantation, les interactions dipolaires entre les billes sont changées. Les billes ont alors tendance à s'auto-assembler en différentes structures comme par exemple les chaînes, les colonnes ou les labyrinthes. Les billes s'agrègent sous forme de chaînes parallèles orientées selon la direction du champ (Fig. 5.13). Selon la densité de billes du rapport du champ magnétique sur l'énergie thermique (Furst and Gast, 2000), ces comportements d'agrégation ont lieu ou non. Avec un champ suffisamment fort, les particules s'agrègent et restent agrégées. Cet auto-assemblage doit être pris en considération pour envisager le suivi de billes sous champ magnétique, en champ proche.



FIG. 5.13. Effet microscopique de l'aimantation des billes

Ces premières pistes établissent un travail préliminaire afin de mettre au point un protocole de suivi par CIN de la déformation du biofilm sous sollicitation volumique. Les simulations du champ magnétique et de la cartographie des forces magnétiques apportent des informations quant à la constitution des électroaimants et à la configuration de ceux-ci pour engendrer un déplacement convenable du marquage de microbilles. La concrétisation de ce protocole n'a pas eu lieu dans le laps de temps du travail de thèse. Ces travaux préliminaires qui rassemblent éléments théoriques, simulations et essais expérimentaux pourront servir de socle à des travaux futurs. Par la suite, il sera nécessaire de tester la possibilité de réaliser le suivi d'un marquage macroscopique sur un échantillon de biofilm réel et de développer la méthode de corrélation d'images permettant de suivre le déformation d'un motif macroscopique de microbilles particulier.

Chapitre 6

Conclusion générale et perspectives

6.1 Conclusion générale

Le contrôle des biofilms bactériens nécessite des approches interdisciplinaires. L'association d'une équipe de l'Institut Pascal et de l'IRSTEA, et d'une entreprise de recherche et développement spécialisée notamment dans le criblage de molécules anti-biofilm, a permis d'étudier des problématiques microbiologiques avec des outils de la mécanique des matériaux classiques de l'ingénierie. Dans ce travail de thèse, le biofilm est vu comme un continuum mécanique. Dans ce cadre, l'objectif du travail était de déterminer l'évolution de l'état de formation du biofilm à l'aide de l'analyse de ses propriétés matérielles.

Bien que souvent indispensable, la transversalité des approches est parfois entravée par le manque de normes communes. Basée sur le constat du manque de protocoles normalisés dans la littérature pour l'étude mécanique des biofilms, un premier travail de synthèse critique a été réalisé. Une réflexion sur la place de la mécanique dans la communauté microbiologique en termes d'analyse du biofilm a été exposée. La complexité du biofilm en tant que matériau est démontrée et une mise en garde sur la variabilité inhérente au caractère vivant des biofilms a été rappelée. Un premier pas vers la normalisation est l'utilisation d'un vocabulaire unifié et de méthodologies communes pour la caractérisation mécanique de biofilms. Au-delà d'une nouvelle explication technique de la mise en place de ces tests, l'originalité de ce travail est d'apporter une aide au choix i- d'un paramètre mécanique pertinent par rapport à la problématique microbiologique en jeu, ii- de la méthode de test mécanique du biofilm et iii- de la méthode d'identification du paramètre mécanique. Ces quatre étapes critiques sur la mise en place de la détermination expérimentale de paramètres matériaux sont mises en exergue. L'apport de ce travail publié est destiné à établir un guide de bonnes pratiques pour les profanes de la conduite d'essais mécaniques. Dans un dialogue mécanique/microbiologie, ce travail contribue à faire le lien entre les bases des essais mécaniques et la particularité du matériau biofilm.

Le deuxième objectif de ce travail était d'apporter un aspect dynamique à l'étude du déve-

loppement de biofilm. Le BioFilm Ring Test[®] est actuellement un test dont le résultat est ponctuel dans le temps. Le développement d'une méthode de suivi du centre de particules insérées au sein d'un matériau vivant apporte une dimension temporelle à la mesure. Cette méthode, basée sur un algorithme de corrélation d'images numériques, permet de suivre des modifications du milieu au sein duquel sont piégées les microbilles. Cette méthodologie a été mise en place pour l'étude des premiers stades de formation de biofilms de *P. aeruginosa* et de *S. aureus*. La contribution principale de la méthode développée est la détection non-destructive de phénomènes discriminants par le biais des caractéristiques des trajectoires microscopiques de billes inertes. Ces phénomènes sont à relier à des changements du milieu que l'on pourrait corréler à des activités microbiologiques. Ce travail apporte la preuve de concept d'un test *in vitro* et non invasif qui permet un suivi temporel, quasi continu, de la cinétique de formation du biofilm, et qui est cohérent avec le BioFilm Ring Test[®].

Le troisième objectif de la thèse était d'étudier la résistance du biofilm sollicité par des forces extérieures. Dans le cas où les billes ne sont pas dans un champ magnétique, leur mouvement libre ne suffit pas à solliciter le biofilm jusqu'à sa déformation. Il a alors été nécessaire d'envisager un moyen de déplacer les billes de manière contrôlée. Dans le cas où l'on veut déformer le biofilm, ce sont les billes ou le groupe de billes qui pourraient créer le marquage. Ce serait les déplacements du marquage de billes qui pourraient être mesurés par la CIN. L'aspect non-invasif du marquage par le biais des billes et de la mesure des déplacements par une méthode de CIN a l'avantage de rendre le test mécanique du biofilm dynamique. La concrétisation de ce protocole n'a pas eu lieu dans le laps de temps du travail de thèse. Seules des prises de vue permettant de regrouper des premières preuves de concept de marquage et des simulations du champ magnétique ont été développées. Notamment, le développement de la mesure de champ avec ce type de marquage n'a pas été abordé dans ce travail. Ces travaux préliminaires qui rassemblent éléments théoriques, simulations et essais expérimentaux pourront servir de socle à des travaux futurs.

6.2 Perspectives

Ce travail de thèse répond à des objectifs fixés mais d'autres questions ont émergé au cours de sa réalisation. De manière naturelle, des perspectives se sont dessinées, tant dans la manière d'utiliser la méthode de corrélation d'images numériques que dans les applications potentielles de la méthodologie développée pendant ce travail de thèse.

Le premier objectif à court terme est de développer et valider un protocole d'essai mécanique du biofilm mature par une sollicitation volumique, ceci à l'aide des microbilles. Les travaux préliminaires développés dans le chapitre 5 ont pour but de préparer des travaux futurs sur l'utilisation du marquage par des microbilles qui, en se déplaçant sous une sollicitation magnétique, permettent de déformer le biofilm. Les premières images en champ lointain de microbilles dans un milieu inerte ont permis d'avoir des pistes de recherche quant à une forme de marquage appropriée au suivi par CIN. Le développement d'une méthode idoine de CIN pour ce motif particulier pourrait être intéressant.

Par ailleurs, un projet de brevet est discuté entre les partenaires du projet. La brevetabilité porte notamment sur l'utilisation d'une analyse de critères numériques pour caractériser le mouvement de billes inertes au sein du biofilm, basée sur les résultats reportés dans le chapitre 4. L'aspect non-invasif, facile à mettre en place, et la possibilité de suivi temporel de l'utilisation du suivi par une méthode optique à distance, s'avèrent être intéressants dans des applications de criblage de molécules anti-biofilm. En vue de la concrétisation de ce brevet, des applications de la méthode devront être testées afin d'enrichir la valeur scientifique de celui-ci. Notamment, l'effet d'antibiotiques sur la souche *P. aeruginosa* devra être étudiée.

Une autre application potentielle de la méthodologie concerne une adaptation de l'Enzyme Ring Test[®]. Développé par BioFilm Control, ce test mesure l'activité de clivage enzymatique. Les enzymes de clivage sont utilisées pour diminuer le degré de polymérisation des polysaccharides. Plus le degré de polymérisation est grand, plus les billes insérées dans le polysaccharides en question sont bloquées dans les enchevêtrements de polymères. Sous l'effet des enzymes de clivage, les chaînes de polymères se coupent, libérant progressivement les billes. Le suivi du mouvements des billes et l'analyse de leur mobilité pourrait être une adaptation pertinente des travaux développés dans ce travail de thèse.

Bibliographie

- Abe, Y., Polyakov, P., Skali-Lami, S., and Francius, G. (2011). Elasticity and physico-chemical properties during drinking water biofilm formation. *Biofouling*, 27(7):739–750.
- Abe, Y., Skali-Lami, S., Block, J., and Francius, G. (2012). Cohesiveness and hydrodynamic properties of young drinking water biofilms. *Water Research*, 46(4) :1155 – 1166.
- Adrian, R. and Westerweel, J. (2011). Particle Image Velocimetry. Cambridge University Press.
- Aggarwal, S. and Hozalski, R. M. (2010). Determination of biofilm mechanical properties from tensile tests performed using a micro-cantilever method. *Biofouling*, 26(4):479–486.
- Aggarwal, S., Stewart, P. S., and Hozalski, R. M. (2016). Biofilm cohesive strength as a basis for biofilm recalcitrance : are bacterial biofilms overdesigned? *Microbiology insights*, 2015(Suppl. 2) :29–32.
- Ahimou, F., Semmens, M. J., Novak, P. J., and Haugstad, G. (2007). Biofilm cohesiveness measurement using a novel atomic force microscopy methodology. *Applied and environmental microbiology*, 73(9) :2897–2904.
- Al Ashhab, A., Sweity, A., Bayramoglu, B., Herzberg, M., and Gillor, O. (2017). Biofouling of reverse osmosis membranes : effects of cleaning on biofilm microbial communities, membrane performance, and adherence of extracellular polymeric substances. *Biofouling*, 33(5) :397–409.
- Alfa, M. J. and Howie, R. (2009). Modeling microbial survival in buildup biofilm for complex medical devices. BMC infectious diseases, 9(1):56.
- Ali, A., Alam, Z., Ward, G., and Wilson, D. I. (2015). Using the scanning fluid dynamic gauging device to understand the cleaning of baked lard soiling layers. *Journal of Surfactants and Detergents*, 18(6) :933–947.
- Araújo, P. A. et al. (2016). Influence of flow velocity on the characteristics of pseudomonas fluorescens biofilms. *Journal of Environmental Engineering*, 142(7) :04016031.
- Aravas, N. and Laspidou, C. (2008). On the calculation of the elastic modulus of a biofilm streamer. Biotechnology and bioengineering, 101(1) :196–200.
- Arias-Moliz, M., Ferrer-Luque, C., González-Rodríguez, M., Valderrama, M., and Baca, P. (2010). Eradication of enterococcus faecalis biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *Journal of Endodontics*, 36(1) :87–90.

- Ashkin, A., Dziedzic, J. M., and Yamane, T. (1987). Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, 330(769).
- ASTM (2008). Method E2647-08 Standard test method for quantification of a Pseudomonas aeruginosa biofilm grown using a drip flow biofilm reactor with low shear and continuous flow. Annual Book of ASTM Standards Vol. 11.06 (ASTM International), West Conshohocken, PA.
- Avril, S., Badel, P., and Duprey, A. (2010). Anisotropic and hyperelastic identification of in vitro human arteries from full-field optical measurements. *Journal of Biomechanics*, 43(15):2978 – 2985.
- Azeredo, J. et al. (2017). Critical review on biofilm methods. Critical reviews in microbiology, 43(3):313–351.
- Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. Trends in microbiology, 22(9):517–527.
- Benoit, M. R., Conant, C. G., Ionescu-Zanetti, C., Schwartz, M., and Matin, A. (2010). New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. 76(13) :4136–4142.
- Billings, N., Birjiniuk, A., Samad, T. S., Doyle, P. S., and Ribbeck, K. (2015). Material properties of biofilms—a review of methods for understanding permeability and mechanics. *Reports on Progress in Physics*, 78(3) :036601.
- Birjiniuk, A., Billings, N., Nance, E., Hanes, J., Ribbeck, K., and Doyle, P. S. (2014). Single particle tracking reveals spatial and dynamic organization of the escherichia coli biofilm matrix. *New Journal of Physics*, 16(8) :085014.
- Bixler, G. D. and Bhushan, B. (2012). Biofouling : lessons from nature. *Phil. Trans. R. Soc. A*, 370(1967) :2381–2417.
- Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M., and Høiby, N. (2013a). Applying insights from biofilm biology to drug development [mdash] can a new approach be developed? *Nature Reviews* Drug Discovery, 12(10) :791–808.
- Bjarnsholt, T. et al. (2013b). The in vivo biofilm. Trends in microbiology, 21(9):466-474.
- Blauert, F., Horn, H., and Wagner, M. (2015). Time-resolved biofilm deformation measurements using optical coherence tomography. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(9) :1893–1905.
- Blaysat, B., Grédiac, M., and Sur, F. (2016). On the propagation of camera sensor noise to displacement maps obtained by dic - an experimental study. *Experimental Mechanics*, 56(6):919– 944.
- Bohinc, K. (2014). Available surface dictates microbial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion and Adhesives*, 50(Supplement C) :265 272.
- Böl, M., Ehret, A. E., Bolea Albero, A., and Hellriegel, J.and Krull, R. (2013). Recent advances in mechanical characterisation of biofilm and their significance for material modelling. *Critical reviews in biotechnology*, 33(2) :145–171.
- Bottero, S. et al. (2013). Biofilm development and the dynamics of preferential flow paths in porous media. *Biofouling*, 29(9) :1069–1086.

- Boudarel, H., Mathias, J.-D., Blaysat, B., and Grédiac, M. (2018). Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms : analysis and critical review. *npj Biofilms and Microbiomes*, 4(17).
- Bouten, L. (2009). Identification of mechanical properties of the leg's constitutive tissues for the mechanical study of the support. Theses, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne. 181 pages.
- Brindle, E. R., Miller, D. A., and Stewart, P. S. (2011). Hydrodynamic deformation and removal of staphylococcus epidermidis biofilms treated with urea, chlorhexidine, iron chloride, or dispersinb. *Biotechnology and bioengineering*, 108(12) :2968–2977.
- Bryers, J. (2008). Medical biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, 100(1):1–18.
- Busscher, H. et al. (2012). Biomaterial-associated infection : Locating the finish line in the race for the surface. *Science Translational Medicine*, 4(153) :153rv10–153rv10.
- Cense, A. et al. (2006a). Mechanical properties and failure of streptococcus mutans biofilms, studied using a microindentation device. *Journal of microbiological methods*, 67(3):463–472.
- Cense, A., Peeters, E., Gottenbos, B., Baaijens, F., Nuijs, A., and van Dongen, M. (2006b). Mechanical properties and failure of streptococcus mutans biofilms, studied using a microindentation device. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3):463 472.
- Cense, A., Van Dongen, M., Gottenbos, B., Nuijs, A., and Shulepov, S. (2006c). Removal of biofilms by impinging water droplets. *Journal of applied physics*, 100(12) :124701.
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., and Buret, A. (1999). The calgary biofilm device : New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6) :1771–1776.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M., and Bernardi, T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of microbiological methods*, 68(3) :605–612.
- Chen, D. T. N., Lau, A. W. C., Hough, L. A., Islam, M. F., Goulian, M., Lubensky, T. C., and Yodh, A. G. (2007). Fluctuations and rheology in active bacterial suspensions. *Phys. Rev. Lett.*, 99 :148302.
- Chen, M., Zhang, Z., and Bott, T. (2005). Effects of operating conditions on the adhesive strength of pseudomonas fluorescens biofilms in tubes. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 43(2):61–71.
- Cheong, F. C., Duarte, S., Lee, S.-H., and Grier, D. G. (2009). Holographic microrheology of polysaccharides from streptococcus mutans biofilms. *Rheologica Acta*, 48(1):109–115.
- Chew, J., Paterson, W., and Wilson, D. (2004). Fluid dynamic gauging for measuring the strength of soft deposits. *Journal of Food Engineering*, 65(2):175 187.
- Chew, S. et al. (2014). Dynamic remodeling of microbial biofilms by functionally distinct exopolysaccharides. *MBio*, 5(4) :e01536–14.

- Chew, S. et al. (2016). Mechanical signatures of microbial biofilms in micropillar-embedded growth chambers. *Soft matter*, 12(23) :5224–5232.
- Chu, T. C., Ranson, W. F., and Sutton, M. A. (1985). Applications of digital-image-correlation techniques to experimental mechanics. *Experimental Mechanics*, 25:232–244.
- Coenye, T., De Prijck, K., De Wever, B., and Nelis, H. (2008). Use of the modified robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of nitradineTM, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. *Journal of Applied Microbiology*, 105(3):733–740.
- Costerton, J., Geesey, G., and Cheng, K. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1):86–95.
- Coufort, C., Derlon, N., Ochoa-Chaves, J., Liné, A., and Paul, E. (2007). Cohesion and detachment in biofilm systems for different electron acceptor and donors. *Water Science and Technology*, 55(8-9) :421–428.
- Cross, S. E., Kreth, J.and Zhu, L., Sullivan, R., Shi, W., Qi, F., and Gimzewski, J. K. (2007). Nanomechanical properties of glucans and associated cell-surface adhesion of streptococcus mutans probed by atomic force microscopy under in situ conditions. *Microbiology*, 153(9) :3124–3132.
- Das, T., Sehar, S., and Manefield, M. (2013). The roles of extracellular dna in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6) :778–786.
- Das, T., Sharma, P. K., Krom, B. P., van der Mei, H. C., and Busscher, H. J. (2011). Role of edna on the adhesion forces between streptococcus mutans and substratum surfaces : Influence of ionic strength and substratum hydrophobicity. *Langmuir*, 27(16) :10113–10118. PMID : 21740034.
- Davies, D. G. and Marques, C. N. H. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191(5) :1393–1403.
- de Vries, A. H., Krenn, B. E., van Driel, R., and Kanger, J. S. (2005). Micro magnetic tweezers for nanomanipulation inside live cells. *Biophysical Journal*, 88(3):2137 2144.
- Di Stefano, A. et al. (2009). Viscoelastic properties of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis mono-microbial biofilms. *Microbial biotechnology*, 2(6):634–641.
- Diaz, P. I., Xie, Z., Sobue, T., Thompson, A., Biyikoglu, B., Ricker, A., Ikonomou, L., and Dongari-Bagtzoglou, A. (2012). Synergistic interaction between candida albicans and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infection and Immunity*, 80(2) :620–632.
- Donlan, R. and Costerton, J. (2002). Biofilms : Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2) :167–193.
- Dunsmore, B. C. et al. (2002). The influence of fluid shear on the structure and material properties of sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6) :347–353.
- Epstein, A., Hochbaum, A., Kim, P., and Aizenberg, J. (2011). Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry. *Nanotechnology*, 22(49) :494007.

- Ester, M., Kriegel, H.-P., Sander, J., and Xu, X. (1996). A density-based algorithm for discovering clusters a density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise. In *Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*, KDD'96, pages 226–231. AAAI Press.
- Even, C., Marlière, C., Ghigo, J., Allain, J., Marcellan, A., and Raspaud, E. (2017). Recent advances in studying single bacteria and biofilm mechanics. Advances in Colloid and Interface Science, 247:573 – 588.
- Fabbri, S. et al. (2016a). High-velocity microsprays enhance antimicrobial activity in streptococcus mutans biofilms. *Journal of dental research*, 95(13) :1494–1500.
- Fabbri, S. et al. (2016b). Streptococcus mutans biofilm transient viscoelastic fluid behaviour during high-velocity microsprays. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 59 :197–206.
- Fabbri, S. and Stoodley, P. (2016). Mechanical properties of biofilms. The Perfect Slime—Microbial Extracellular Polymeric Substances; Flemming, H.-C., Wingender, J., Neu, T., Eds, pages 153– 178.
- Feng, J. and He, Y. (2017). Collective motion of bacteria and their dynamic assembly behavior. Science China Materials, 60(11) :1079–1092.
- Ferrando, D., Ziemba, C., and Herzberg, M. (2017). Revisiting interrelated effects of extracellular polysaccharides during biofouling of reverse osmosis membranes : Viscoelastic properties and biofilm enhanced osmotic pressure. *Journal of Membrane Science*, 523 :394–401.
- Fisher, R., Gollan, B., and Helaine, S. (2017). Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology.*
- Flemming, H. et al. (2016). Biofilms : an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology, 14(9) :563–575.
- Flemming, H. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology, 8(9):623–633.
- Flemming, H., Wingender, J., Mayer, C., Körstgens, V., and Borchard, W. (2000). Cohesiveness in biofilm matrix polymers, pages 87–106. Society for General Microbiology Symposia. Cambridge University Press.
- Flemming, H.-C., Neu, T. R., and Wozniak, D. J. (2007). The eps matrix : The "house of biofilm cells". Journal of Bacteriology, 189(22) :7945–7947.
- Furst, E. M. and Gast, A. P. (2000). Dynamics and lateral interactions of dipolar chains. *Phys. Rev. E*, 62 :6916–6925.
- Galy, O., Latour-Lambert, P., Zrelli, K., Ghigo, J., Beloin, C., and Henry, N. (2012). Mapping of bacterial biofilm local mechanics by magnetic microparticle actuation. *Biophysical Journa*, 103 :1400 – 1408.
- Ghanbari, A. et al. (2016). Inoculation density and nutrient level determine the formation of mushroom-shaped structures in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Scientific reports*, 6:32097.
- Ghigo, J.-M. (2003). Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? Research in Microbiology, 154(1):1 – 8.
- Godain, A. (2018). Étude de l'activité électrocatalytique des biofilms microbiens en fonction des forces d'adhésion pour l'optimisation des performances des biopiles microbiennes. PhD thesis, Université Claude Bernard Lyon 1.
- Goeres, D. M., Loetterle, L. R., Hamilton, M. A., Murga, R., Kirby, D. W., and Donlan, R. M. (2005). Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology*, 151(3):757–762.
- Gordon, V. D., Davis-Fields, M., Kovach, K., and Rodesney, C. A. (2017). Biofilms and mechanics : a review of experimental techniques and findings. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 50(22) :223002.
- Grediac, M. and Sur, F. 50th anniversary article : Effect of sensor noise on the resolution and spatial resolution of displacement and strain maps estimated with the grid method. *Strain*, 50(1) :1–27.
- Guélon, T., Hunter, R., Mathias, J., and Deffuant, G. (2013). Homogenization of pseudomonas aeruginosa paol biofilms visualized by freeze-substitution electron microscopy. *Biotechnology* and bioengineering, 110(5):1405–1418.
- Guélon, T., Mathias, J., and Stoodley, P. (2011). Advances in Biofilm Mechanics, pages 111–139. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Kathju, S., Høiby, N., Moser, C., William Costerton, J., Moter, A., and Bjarnsholt, T. (2012). Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2) :127–145.
- Harrison, J., Stremick, C., Turner, R., Allan, N., Olson, M., and Ceri, H. M. (2010). Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids : a miniaturized biofilm model for highthroughput screening. *Nature Protocols*, 5 :1236–1254.
- Hasan, J., Crawford, R., and Ivanova, E. P. (2013). Antibacterial surfaces : the quest for a new generation of biomaterials. *Trends in biotechnology*, 31(5) :295–304.
- He, Y. et al. (2013). Stress relaxation analysis facilitates a quantitative approach towards antimicrobial penetration into biofilms. *PloS one*, 8(5) :1–9.
- He, Y., Peterson, B. W., Ren, Y., van der Mei, H. C., and Busscher, H. J. (2014). Antimicrobial penetration in a dual-species oral biofilm after noncontact brushing : an in vitro study. *Clinical Oral Investigations*, 18(4) :1103–1109.
- Healey, G. E. and Kondepudy, R. (1994). Radiometric ccd camera calibration and noise estimation. IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence, 16(3):267–276.
- Høiby, N. (2014). A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathogens and Disease*, 70(3):205–211.
- Hild, F. and Roux, S. (2006). Measuring stress intensity factors with a camera : Integrated digital image correlation (i-dic). Comptes Rendus Mécanique, 334(1) :8 – 12.

- Hinz, D. F., Panchenko, A., Kim, T.-Y., and Fried, E. (2014). Motility versus fluctuations in mixtures of self-motile and passive agents. *Soft Matter*, 10 :9082–9089.
- Hohne, D. N., Younger, J. G., and Solomon, M. (2009). Flexible microfluidic device for mechanical property characterization of soft viscoelastic solids such as bacterial biofilms. *Langmuir*, 25(13) :7743–7751.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4):322–332.
- Hollenbeck, E. and others. (2016). Mechanical behavior of a bacillus subtilis pellicle. *The Journal* of *Physical Chemistry B*, 120(26) :6080–6088.
- Hollenbeck, E. C. and others. (2014). Molecular determinants of mechanical properties of v. cholerae biofilms at the air-liquid interface. *Biophysical Journal*, 107(10) :2245 2252.
- Houari, A. et al. (2008). Rheology of biofilms formed at the surface of nf membranes in a drinking water production unit. *Biofouling*, 24(4) :235–240.
- Hwang, G., Klein, M. I., and Koo, H. (2014). Analysis of the mechanical stability and surface detachment of mature streptococcus mutans biofilms by applying a range of external shear forces. *Biofouling*, 30(9) :1079–1091.
- Irsfeld, M., Prüß, B. M., and Stafslien, S. J. (2014). Screening the mechanical stability of escherichia coli biofilms through exposure to external, hydrodynamic shear forces. *Journal of basic microbiology*, 54(12) :1403–1409.
- Jones, W. L., Sutton, M. P., McKittrick, L., and Stewart, P. S. (2011). Chemical and antimicrobial treatments change the viscoelastic properties of bacterial biofilms. *Biofouling*, 27(2):207–215.
- Karampatzakis, A., Song, C. Z., Allsopp, L. P., Filloux, A., Rice, S. A., Cohen, Y., Wohland, T., and Torok, P. (2017). Probing the internal micromechanical properties of Pseudomonas aeruginosa biofilms by Brillouin imaging. *npj Biofilms and Microbiomes*, 20.
- Karimi, A., Karig, D., Kumar, A., and Ardekani, A. (2015). Interplay of physical mechanisms and biofilm processes : review of microfluidic methods. Lab on a Chip, 15(1) :23–42.
- Kharazmi, A., Giwercman, B., and Høiby, N. (1999). Robbins device in biofilm research. Methods in Enzymology, 310 :207 – 215.
- Kilinc, D. and Lee, G. U. (2014). Advances in magnetic tweezers for single molecule and cell biophysics. *Integr. Biol.*, 6 :27–34.
- Kim, M. J. and Breuer, K. S. (2004). Enhanced diffusion due to motile bacteria. *Physics of Fluids*, 16(9) :L78–L81.
- Kim, M. K., Drescher, K., Pak, O. S., Bassler, B. L., and Stone, H. A. (2014). Filaments in curved streamlines : rapid formation of staphylococcus aureus biofilm streamers. *New journal of physics*, 16(6) :065024.
- Klapper, I., Rupp, C. J., Cargo, R., Purvedorj, B., and Stoodley, P. (2002). Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnology and bioengineering*, 80(3):289– 296.

- Klausen, M., Aaes-Jørgensen, A., and Molin, S.and Tolker-Nielsen, T. (2003). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Molecular microbiology*, 50(1):61–68.
- Klein, M., Hwang, G., Santos, P., Campanella, O., and Koo, H. (2015). Streptococcus mutansderived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(10).
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., and Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms : current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12) :740.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms : development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor* perspectives in medicine, 3(4) :a010306.
- Kragh, K. N., Hutchison, J. B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A. E. L., Irie, Y., Jensen, P. Ø., Diggle, S. P., Allen, R. J., Gordon, V., and Bjarnsholt, T. (2016). Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *mBio*, 7(2).
- Körstgens, V., Flemming, H., Wingender, J., and Borchard, W. (2001). Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 46(1) :9 – 17.
- Kundukad, B. et al. (2016). Mechanical properties of the superficial biofilm layer determine the architecture of biofilms. *Soft matter*, 12(26) :5718–5726.
- Lau, P. C., Dutcher, J. R., Beveridge, T. J., and Lam, J. S. (2009a). Absolute quantitation of bacterial biofilm adhesion and viscoelasticity by microbead force spectroscopy. *Biophysical Journal*, 96(7) :2935 – 2948.
- Lau, P. C., Lindhout, T., Beveridge, T. J., Dutcher, J. R., and Lam, J. S. (2009b). Differential lipopolysaccharide core capping leads to quantitative and correlated modifications of mechanical and structural properties in pseudomonas aeruginosa biofilms. *Journal of bacteriology*, 191(21):6618–6631.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., and Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 173(20) :6558–6567.
- Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., and Simões, M. (2015). The effect of shear stress on the formation and removal of bacillus cereus biofilms. *Food and Bioproducts Processing*, 93 :242– 248.
- Lieleg, O., Caldara, M., Baumgärtel, R., and Ribbeck, K. (2011). Mechanical robustness of pseudomonas aeruginosa biofilms. Soft Matter, 7(7) :3307–3314.
- Lipfert, J., Hao, X., and Dekker, N. H. (2009). Quantitative modeling and optimization of magnetic tweezers. *Biophysical Journal*, 96(12) :5040 – 5049.
- Liu, S. et al. (2016). Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems. *Environmental science & technology*, 50(17):8954–8976.

- Lourenço, A. et al. (2012). Biofomics : a web platform for the systematic and standardized collection of high-throughput biofilm data. *PloS one*, 7(6) :e39960.
- Lourenço, A. et al. (2014). Minimum information about a biofilm experiment (miable) : standards for reporting experiments and data on sessile microbial communities living at interfaces. *Pathogens and disease*, 70(3) :250–256.
- Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H., and Sørensen, S. J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2):183–195.
- Mah, T.-F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. Future Microbiology, 7(9):1061–1072.
- Martin, K. J. and Nerenberg, R. (2012). The membrane biofilm reactor (mbfr) for water and wastewater treatment : principles, applications, and recent developments. *Bioresource technology*, 122 :83–94.
- Mathias, J. D. and Stoodley, P. (2009). Applying the digital image correlation method to estimate the mechanical properties of bacterial biofilms subjected to a wall shear stress. *Biofouling*, 25(8):695–703. PMID : 20183128.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., and Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go : mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1) :39–50.
- McGill, S. L., Cuylear, C. L.and Adolphi, N. L. O. M., and Smyth, S. L. (2009). Magnetically responsive nanoparticles for drug delivery applications using low magnetic field strengths. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 8(1):33–42.
- Meeker, D. (2015). "femm reference manual" disponible en ligne :. http://www.femm.info/ Archives/doc/manual42.pdf.
- Melchior, M., Fink-Gremmels, J., and Gaastra, W. (2007). Extended antimicrobial susceptibility assay for staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis growing in biofilms. *Veterinary Microbiology*, 125(1):141 149.
- Möhle, R. B. et al. (2007). Structure and shear strength of microbial biofilms as determined with confocal laser scanning microscopy and fluid dynamic gauging using a novel rotating disc biofilm reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4):747–755.
- Moschakis, T. (2013). Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 18(4):311 323.
- Nan, B., McBride, M. J., Chen, J., Zusman, D. R., and Oster, G. (2014). Bacteria that glide with helical tracks. *Current Biology*, 24(4) :R169 – R173.
- Neu, T. R. and Lawrence, J. R. (2015). Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends in Microbiology*, 23(4) :233 242.
- Neuman, K. C. and Nagy, A. (2008). Single-molecule force spectroscopy : optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nature Methods*, 5(491).

- Ng, C. K., Mohanty, A., and Cao, B. (2015). Biofilms in bio-nanotechnology. *Bio-Nanoparticles : Biosynthesis and Sustainable Biotechnological Implications*, pages 83–100.
- Nickel, J., Ruseska, I., Wright, J. B., and Costerton, J. (1985). Tobramycin resistance of pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents* and Chemotherapy, 27(4):619–624.
- Oh, Y., Jo, W., Yang, Y., and Park, S. (2007). Influence of culture conditions on escherichia coli o157 :h7 biofilm formation by atomic force microscopy. Ultramicroscopy, 107(10) :869 – 874.
- Oh, Y., Lee, N., Jo, W., Jung, W., and Lim, J. (2009). Effects of substrates on biofilm formation observed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, 109(8) :874 – 880.
- Ohashi, A. and Harada, H. (1994). Adhesion strength of biofilm developed in an attached-growth reactor. Water Science and Technology, 29(10-11) :281–288.
- Ohashi, A. and Harada, H. (1996). A novel concept for evaluation of biofilm adhesion strength by applying tensile force and shear force. *Water Science and Technology*, 34(5):201 211.
- Ohashi, A., Koyama, T., Syutsubo, K., and Harada, H. (1999). A novel method for evaluation of biofilm tensile strength resisting erosion. Water Science and Technology, 39(7):261 – 268.
- O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations.
- Pan, B., Xie, H., and Wang, Z. (2010). Equivalence of digital image correlation criteria for pattern matching. Appl. Opt., 49(28) :5501–5509.
- Paramonova, E. et al. (2007). Low-load compression testing : a novel way of measuring biofilm thickness. Applied and Environmental Microbiology, 73(21) :7023–7028.
- Paramonova, E., Kalmykowa, O., van der Mei, H., Busscher, H., and Sharma, P. (2009a). Impact of hydrodynamics on oral biofilm strength. *Journal of Dental Research*, 88(10) :922–926.
- Paramonova, E., Krom, B. P., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., and Sharma, P. K. (2009b). Hyphal content determines the compression strength of candida albicans biofilms. *Microbiology*, 155(6):1997–2003.
- Patteson, A. E., Gopinath, A., Goulian, M., and Arratia, P. E. (2015). Running and tumbling with e. coli in polymeric solutions. *Scientific Reports*, 5:15761.
- Paturzo, M., Pagliarulo, V., Bianco, V., Memmolo, P., Miccio, L., Merola, F., and Ferraro, P. (2018). Digital holography, a metrological tool for quantitative analysis : Trends and future applications. *Optics and Lasers in Engineering*, 104 :32 – 47.
- Paul, E., Ochoa, J., Pechaud, Y., Liu, Y., and Liné, A. (2012). Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilm. *Water Research*, 46 :5499–5508.
- Pavlovsky, L., Younger, J. G., and Solomon, M. (2013). In situ rheology of staphylococcus epidermidis bacterial biofilms. Soft Matter, 9(1):122–131.
- Peck, O. P., John Chew, Y., Bird, M. R., and Bolhuis, A. (2015). Application of fluid dynamic gauging in the characterization and removal of biofouling deposits. *Heat Transfer Engineering*, 36(7-8) :685–694.

- Peterson, B. W. et al. (2015). Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS microbiology reviews*, 39(2) :234–245.
- Peterson, B. W., van der Mei, H. C., Sjollema, J., Busscher, H. J., and Sharma, P. K. (2013). A distinguishable role of edna in the viscoelastic relaxation of biofilms. *MBio*, 4(5) :e00497–13.
- Poppele, E. H. and Hozalski, R. M. (2003). Micro-cantilever method for measuring the tensile strength of biofilms and microbial flocs. *Journal of microbiological methods*, 55(3):607–615.
- Qian, H., Sheetz, M. P., and Elson, E. L. (1991). Single particle tracking. analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophysical Journal*, 60(4) :910–921.
- Rankin, K., Browne, M., and Dickinson, A. (2017). Chapter 5 digital image correlation for strain analysis of whole bones and implants. In Zdero, R., editor, *Experimental Methods in Orthopaedic Biomechanics*, pages 65 – 83. Academic Press.
- Ribbe, J., Baker, A. E., Euler, S., O'Toole, G. A., and Maier, B. (2017). Role of cyclic di-gmp and exopolysaccharide in type iv pilus dynamics. *Journal of bacteriology*, 199(8) :e00859–16.
- Rice, S. A. et al. (2005). Biofilm formation and sloughing in servatia marcescens are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *Journal of Bacteriology*, 187(10) :3477–3485.
- Rmaile, A. et al. (2015). An experimental and computational study of the hydrodynamics of highvelocity water microdrops for interproximal tooth cleaning. *Journal of the mechanical behavior* of biomedical materials, 46 :148–157.
- Rodesney, C. A., Roman, B., Dhamani, N., Cooley, B. J., Touhami, A., and Gordon, V. D. (2017). Mechanosensing of shear by pseudomonas aeruginosa leads to increased levels of the cyclic-digmp signal initiating biofilm development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(23) :5906–5911.
- Rodgers, N. and Murdaugh, A. (2016). Chlorhexidine-induced elastic and adhesive changes of escherichia coli cells within a biofilm. *Biointerphases*, 11(3):031011.
- Rodney, J., Ojano-Dirain, C. P., Antonelli, P. J., and Silva, R. C. (2016). Effect of repeated tracheostomy tube reprocessing on biofilm formation. *The Laryngoscope*, 126(4):996–999.
- Rogers, S. S., van der Walle, C., and Waigh, T. A. (2008). Microrheology of bacterial biofilms in vitro : Staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa. *Langmuir*, 24(23) :13549–13555. PMID : 18980352.
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., and Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms : A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1) :522–554.
- Réthoré, J., Besnard, G., Vivier, G., Hild, F., and Roux, S. (2008). Experimental investigation of localized phenomena using digital image correlation. *Philosophical Magazine*, 88(28-29) :3339– 3355.
- Rühs, P., Böni, L., Fuller, G. G., Inglis, R. F., and Fischer, P. (2013). In-situ quantification of the interfacial rheological response of bacterial biofilms to environmental stimuli. *PloS one*, 8(11) :e78524.

- Rupp, C. J., Fux, C. A., and Stoodley, P. (2005). Viscoelasticity of staphylococcus aureus biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Applied* and Environmental Microbiology, 71(4) :2175–2178.
- Rusconi, R., Lecuyer, S., Guglielmini, L., and Stone, H. A. (2010). Laminar flow around corners triggers the formation of biofilm streamers. *Journal of The Royal Society Interface*, 7(50) :1293–1299.
- Safari, A. et al. (2016). Interfacial separation of a mature biofilm from a glass surface a combined experimental and cohesive zone modelling approach. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 54(Supplement C) :205 – 218.
- Safari, A., Tukovic, Z., Walter, M., Casey, E., and Ivankovic, A. (2015). Mechanical properties of a mature biofilm from a wastewater system : from microscale to macroscale level. *Biofouling*, 31(8):651–664.
- Sarkar, R. and Rybenkov, V. V. (2016). A guide to magnetic tweeszers and their applications. Frontiers in Physics, 4:48.
- Savin, T. and Doyle, P. S. (2005). Static and dynamic errors in particle tracking microrheology. *Biophysical journal*, 88(1) :623–638.
- Schachter, B. (2003). Slimy business—the biotechnology of biofilms. *Nature biotechnology*, 21(4):361–365.
- Schultz, M. P., Bendick, J. A., Holm, E. R., and Hertel, W. M. (2011). Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling*, 27(1):87–98.
- Shaw, T., Winston, M., Rupp, C. J., Klapper, I., and Stoodley, P. (2004). Commonality of elastic relaxation times in biofilms. *Physical review letters*, 93(9):098102.
- Shumi, W., Kim, S. H., Lim, J., Cho, K., Han, H., and Park, S. (2013). Shear stress tolerance of streptococcus mutans aggregates determined by microfluidic funnel device (µffd). Journal of microbiological methods, 93(2) :85–89.
- Singh, R., Paul, D., and Jain, R. (2006). Biofilms : implications in bioremediation. Trends in microbiology, 14(9) :389–397.
- Song, F., Koo, H., and Ren, D. (2015). Effects of material properties on bacterial adhesion and biofilm formation. *Journal of dental research*, 94(8) :1027–1034.
- Stewart, P. and Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The Lancet, 358(9276):135 – 138.
- Stewart, P. and Franklin, M. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. Nature Reviews Microbiology, 6 :199–210.
- Stewart, P. S. (2014). Biophysics of biofilm infection. Pathogens and disease, 70(3):212-218.
- Stoodley, P., Boyle, J., Cunningham, A., Dodds, I., Lappin-Scott, H., and Lewandowski, Z. (1999). Biofilm structure and influence on biofouling under laminar and turbulent flows.

- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S., and Klapper, I. (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6) :361–367.
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J. D., and Lappin-Scott, H. M. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear : An in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(1):83–92.
- Sutton, M., Mingqi, C., Peters, W., Chao, Y., and McNeill, S. (1986). Application of an optimized digital correlation method to planar deformation analysis. *Image and Vision Computing*, 4(3):143-150.
- Sutton, M., Wolters, W., Peters, W., Ranson, W., and McNeill, S. (1983). Determination of displacements using an improved digital correlation method. *Image and Vision Computing*, 1(3):133-139.
- Takamura, K., Fischer, H., and Morrow, N. R. (2012). Physical properties of aqueous glycerol solutions. Journal of Petroleum Science and Engineering, 98-99 :50 – 60.
- Tallawi, M., Opitz, M., and Lieleg, O. (2017). Modulation of the mechanical properties of bacterial biofilms in response to environmental challenges. *Biomaterials Science*, 5(5):887–900.
- Telgmann, U., Horn, H., and Morgenroth, E. (2004). Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. Water Research, 38(17):3671 – 3684.
- Tierra, G., Pavissich, J. P., Nerenberg, R., Xu, Z., and Alber, M. S. (2015). Multicomponent model of deformation and detachment of a biofilm under fluid flow. *Journal of The Royal Society Interface*, 12(106) :20150045.
- Towler, B. W., Rupp, C. J., Cunningham, A. B., and Stoodley, P. (2003). Viscoelastic properties of a mixed culture biofilm from rheometer creep analysis. *Biofouling*, 19(5):279–285.
- Trejo, M. et al. (2013). Elasticity and wrinkled morphology of bacillus subtilis pellicles. *Proceedings* of the National Academy of Sciences, 110(6) :2011–2016.
- Tripathy, A., Sen, P., Su, B., and Briscoe, W. H. (2017). Natural and bioinspired nanostructured bactericidal surfaces. Advances in colloid and interface science, 248 :85–104.
- Uppuluri, P. and Lopez-Ribot, J. L. (2016). Go forth and colonize : Dispersal from clinically important microbial biofilms. *PLoS pathogens*, 12(2) :e1005397.
- Valeriani, C., Li, M., Novosel, J., Arlt, J., and Marenduzzo, D. (2011). Colloids in a bacterial bath : simulations and experiments. Soft Matter, 7 :5228–5238.
- Vasilev, K., Cook, J., and Griesser, H. J. (2009). Antibacterial surfaces for biomedical devices. *Expert review of medical devices*, 6(5):553–567.
- Vinogradov, A. M., Winston, M., Rupp, C. J., and Stoodley, P. (2004). Rheology of biofilms formed from the dental plaque pathogen streptococcus mutans. *Biofilms*, 1(1) :49–56.
- Wagner, M. and Horn, H. (2017). Optical coherence tomography in biofilm research : A comprehensive review. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(7) :1386–1402.

- Wang, X., Hao, M., Du, X., Wang, G., and Matsushita, J. (2016). The mechanical analysis of the biofilm streamer nucleation and geometry characterization in microfluidic channels. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2016.
- Wilking, J. N., Angelini, T. E., Seminara, A., Brenner, M. P., and Weitz, D. A. (2011). Biofilms as complex fluids. *MRS bulletin*, 36(5) :385–391.
- Wirtz, D. (2009). Particle-tracking microrheology of living cells : Principles and applications. Annual Review of Biophysics, 38(1) :301–326.
- Wloka, M., Rehage, H., Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2004). Rheological properties of viscoelastic biofilm extracellular polymeric substances and comparison to the behavior of calcium alginate gels. *Colloid and Polymer Science*, 282(10) :1067–1076.
- Wu, X.-L. and Libchaber, A. (2000). Particle diffusion in a quasi-two-dimensional bacterial bath. *Phys. Rev. Lett.*, 84 :3017–3020.
- Xavier, J. B., Picioreanu, C., and Van Loosdrecht, M. A framework for multidimensional modelling of activity and structure of multispecies biofilms. *Environmental microbiology*, 7.
- Zegans, M. E., Shanks, R., and O'toole, G. A. (2005). Bacterial biofilms and ocular infections. *The ocular surface*, 3(2):73–80.
- Ziemann, F., R\u00e4dler, J., and Sackmann, E. (1994). Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead micro-rheometer. *Biophysical Journal*, 66(6) :2210 – 2216.
- Zrelli, K., Galy, O., Latour-Lambert, P., Kirwan, L., Ghigo, J., Beloin, C., and Henry, N. (2013). Bacterial biofilm mechanical properties persist upon antibiotic treatment and survive cell death. *New Journal of Physics*, 15(12) :125026.

Annexe A

Fondamentaux mécaniques pour l'étude des biofilms

La mécanique du point matériel permet de prédire le mouvement d'un point soumis à un ensemble de force. Mais cette théorie ne permet pas de prendre en compte la rotation d'un corps sur lui même puisque la notion de rotation d'un point ou de moment de force appliquée au point n'a pas de sens. Pour cela, la théorie de la mécanique des solides indéformables intègre la notion d'inertie et de moment. Néanmoins, lorsque l'on s'intéresse à des solides qui ont la capacité de se déformer sous certaines sollicitations, la mécanique des solides indéformables atteint ses limites. La notion de "matériau" n'intervient pas en mécanique des solides indéformables : seule la masse et la forme (qui influent sur le moment d'inertie) sont considérées. Il est nécessaire de faire appel à la mécanique des milieux continus lorsque des déformations du milieu ont lieu et que le comportement matériel du milieu doit être pris en compte. Un domaine contient un milieu matériel continu si à chaque instant et en chaque point de ce domaine on peut définir des grandeurs physiques locales relatives à ce milieu matériel. La grandeur physique donnée à chaque instant et en chaque point forme ce que l'on appelle un champ (par exemple champ de contraintes). La nécessité de l'utilisation des milieux continus dépend de l'échelle d'observation. L'air enfermé dans un bocal est un milieu continu d'un point de vu macroscopique. Pourtant, si l'on se rapproche au niveau des molécules, les molécules se déplacent à grande vitesse dans le vide sous l'effet du mouvement brownien. La mécanique des milieux continus est un modèle mathématique qui permet de "moyenner" une réalité complexe. Le modèle de milieu continu est une idéalisation de la matière. Dans cette annexe, on présente les rudiments de la mécanique des milieux continus qui sont nécessaires pour pouvoir comprendre la provenance de chacun des paramètres mécaniques reportés dans la littérature. Par souci de simplification, nous considérerons un matériau homogène et ses paramètres mécaniques macroscopiques.

A.1 Comportements mécaniques

Le principal objectif des essais mécaniques est la mise en place d'une loi destinée à être utilisée pour la prévision du comportement du matériau. Les variables mises en jeu dans le cas d'un essai mécanique sont le tenseur des contraintes $\overline{\overline{\sigma}}$ et le tenseur des déformations $\overline{\overline{\varepsilon}}$. Expérimentalement, les essais mécaniques permettent de reporter des forces et des déplacements connus par l'échantillon. Ces données sont traduites en contraintes et déformations. Les graphes contraintes-déformations

relient deux scalaires qui correspondent à une composante des tenseurs $\overline{\sigma}$ et $\overline{\varepsilon}$. Ces composantes diffèrent selon le type d'essai et le type de matériau. Le choix de la direction de sollicitation est primordial. Les essais sont classés selon deux grandes catégories : les essais uniaxiaux (tractioncompression pour les biofilms) et les essais multiaxiaux (peu représentés dans la mécanique des biofilms). Dans le cas de l'essai uniaxial, l'échantillon est sollicité dans une direction de l'espace des contraintes. La loi de comportement est la relation qui permet de faire le lien entre les contraintes et les déformations pour un matériau donné. C'est la fonction de transfert qui donne l'état de contrainte en fonction de la déformation et *vice versa*.

$$\bar{\bar{\sigma}}(\vec{x},t) = \mathscr{F}[\bar{\bar{\varepsilon}}(\tau), \tau \le t] \tag{A.1}$$

La fonction \mathscr{F} signifie que l'état de contrainte en un point matériel, à l'instant t dépend de son histoire de déformation à tous les instants passés τ jusqu'à t.

Dans la suite, on expose quelques comportements mécaniques utilisés et étudiés dans le cas de l'étude mécanique des biofilms.

Elasticité linéaire Ce comportement décrit les matériaux dont la déformation est linéairement proportionnelle à la contrainte appliquée (Fig. A.1(a)). Ce comportement est décrit pour des petites déformations ($\leq 10\%$). Les matériaux élastiques ont un comportement qui ne dépend que de l'état de déformation par rapport à l'état de référence. Il ne dépend pas de leur histoire de chargement. On peut alors restreindre la relation précédente à :

$$\bar{\bar{\sigma}}(\vec{x},t) = \mathscr{F}[\bar{\bar{\varepsilon}}(t)] \tag{A.2}$$

Dans ce cas, toute déformation est réversible : lorsque l'on supprime le chargement, le matériau revient à son état non déformé. Un milieu est dit *élastique linéaire* si le rapport entre la contrainte et la déformation est constant. Pour un matériau isotrope, c'est à dire que pour un point donné, le matériau a les même propriétés quelque soit la direction, les contraintes et les déformations au sein de ce matériau sont reliées par la relation suivante :

$$\bar{\bar{\sigma}} = \begin{bmatrix} H \end{bmatrix} \bar{\bar{\varepsilon}} \tag{A.3}$$

Avec :

$$\begin{bmatrix} H \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \lambda + 2\mu & \lambda & \lambda & 0 & 0 & 0 \\ \lambda & \lambda + 2\mu & \lambda & 0 & 0 & 0 \\ \lambda & \lambda & \lambda + 2\mu & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \mu & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \mu & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \mu \end{bmatrix}$$
(A.4)

Où :

$$\lambda = \frac{E\nu}{(1+\nu)(1-2\nu)} \qquad \text{et} \qquad \mu = \frac{E}{2(1+\nu)} \tag{A.5}$$

Avec E le Module d'Young en Pa, ν le coefficient de Poisson sans unité. La loi de Hooke permet de passer de la matrice associée au tenseur des contraintes à la matrice associée au tenseur des déformations. Dans ce cas, ce sont E et ν qui sont recherchés. E correspond au rapport entre la contrainte axiale et la déformation axiale. Si E est fort, la déformation axiale sera faible et vice versa. ν correspond au rapport de la déformation radiale sur la déformation axiale, dans le cas de l'application d'une contrainte axiale. Dans le cas des biofilms, peu d'étude aboutissent à la détermination de modules d'Young car ce module impose un chargement unidirectionnel et des petites déformations. Par ailleurs, la sollicitation axiale du biofilm n'est pas la plus étudiée car elle ne correspond pas à la majorité des chargements subis par les biofilms dans leurs milieux naturels. Dans la littérature, les biofilms sont souvent exposés à des contraintes de cisaillement par des chargements hydrodynamiques ou par le chargement d'un rhéomètre. Dans ce cas, c'est le module de cisaillement qui est recherché :

$$G = \frac{E}{2(1+\nu)} \tag{A.6}$$

Elastoplasticité Un comportement plus réaliste pour un biofilm est le comportement élastoplastique (Fig. A.1(b)) : le comportement est élastique mais une déformation irréversible se développe si le seuil est atteint. La déformation engendrée au delà de la limite d'élasticité (souvent notée f_y ou σ_e) est une déformation permanente. la limite d'élasticité (en anglais "yield strength") est définie par la contrainte au delà de laquelle la phase plastique commence. Puis, si la contrainte continue d'être augmentée, le matériau atteint la contrainte ultime (souvent notée f_u ou σ_u) au delà de laquelle le matériau rompt.

Viscoélasticité La viscoélasticité est le comportement d'un matériau qui combine à la fois des caractéristiques de matériau élastique et des caractéristiques de matériau visqueux lorsqu'il est soumis à une déformation (Fig. A.1(c)). Alors que les matériaux purement élastiques répondent instantanément à l'application et au déchargement d'une contrainte, les matériaux purement visqueux s'écoulent en réponse à une sollicitation extérieure et la déformation engendrée reste permanente après l'arrêt de la force. Les matériaux viscoélastiques cumulent ces deux types de comportements. Plusieurs expérimentations montrent que le biofilm réagit comme un solide élastique et un fluide visqueux. En effet, quand une contrainte constante est appliquée sur un matériau viscoélastique (biofilm), un glissement est observé en fonction du temps avec des déformations qui augmentent progressivement. Réciproquement, quand un matériau viscoélastique est sujet à une déformation constante, une relaxation progressive de la contrainte induite est observé en fonction du temps. La contrainte au sein du matériau est dépendante de la dérivée temporelle de la déformation.

La réponse d'un matériau viscoélastique est souvent modélisée par des modèles alliant ressorts et amortisseurs. Le ressort modélise la partir élastique (déformation proportionnelle au chargement) tandis que l'amortisseur prend en compte la partie visqueuse (vitesse de déformation proprtionnelle au chargement) du comportement viscoélastique. Ces modèles sont décrits par leur équation constitutive faisant intervenir les paramètres de leurs éléments constitutifs de base : les constantes de raideur E_i et les coefficients de viscosité η_i . Les modèles viscoélastiques les plus courants sont le modèle de Mawxwell (Fig. A.2), le modèle de Kelvin-Voigt (Fig. A.3), le modèle de Zener (Fig. A.4) ou encore le modèle de Burger (Fig. A.5).

FIG. A.2. Modèle de Maxwell





FIG. A.1. Comportements matériaux étudiés dans le cas des biofilms. (Guélon et al., 2011)

FIG. A.3. Modèle de Kelvin-Voigt



FIG. A.4. Modèle de Zener ou Solide Linéaire Standard



FIG. A.5. Modèle de Burger



Dans certains cas, il est judicieux de procéder à des tests dynamiques. La viscoélasticité du matériau est alors étudiée en lui appliquant de petites oscillations. Dans le cas de matériau élastique, la déformation et la contrainte sont exactement en phase. Pour les matériaux viscoélastiques, il existe un retard entre la contrainte appliquée et la déformation du matériau. Les signaux sinusoïdaux correspondant à l'application de la contrainte et à la déformation observée sont déphasés. En notations complexes, on définit le module complexe :

$$G = G' + iG'' \tag{A.11}$$

où $i^2 = -1$. G' est appelé module de stockage, G'' est appelé module de perte.

$$G' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} cos(\delta)$$

$$G' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} sin(\delta)$$
(A.12)

où ε_0 et σ_0 sont respectivement les amplitudes de la déformation et la contrainte observées par le matériau. δ est la phase de décalage entre les deux signaux.

Rupture Une problématique majeure concernant les biofilms est la possibilité de leur élimination mais aussi le controle de leur dissémination, source de nouvelle infection. Aussi, la rupture par perte de cohésion ou par perte d'adhésion constitue une grande part des recherches mécaniques sur le biofilm. La rupture par perte de cohésion a lieu lorsque la contrainte dépasse un scertain seuil et entraîne un détachement de parties du biofilm, pendant les phases de développement, à cause d'une détéioration de la structure de la matrice. La valeur de la limite de cohésion est difficile à interpréter étant donnée l'hétérogénéité du biofilm. Cette hétérogénéité de composition et de paramètres mécaniques créé des concentrations de contrainte et des zones fusibles, moins résistantes que d'autres. La rupture et la perte d'adhésion a lieu à l'interface entre le biofilm et la surface sur laquelle il est accroché. Les valeurs de résistance en termes de cohésion et d'adhésion sont exprimées par une notion de contrainte ultime en Pascal ou d'énergie en Joule par unité de surface ou de volume.

A.2 Vocabulaire et notations

Terme	Notation usuelle	Unité	Description
Déplacement	u	m	Transformation subie par tous les points du milieu
Déformation	ε	Sans dimension	Variation de distance entre les points d'un milieu lors d'une transformation
Force	F	Ν	Action mécanique exercée par un objet sur un autre. Carac- térisée par une direction, un sens, une intensité, un point d'application.
Contrainte	σ	Pa	Force appliquée sur une surface.
Module d'Young	Е	Pa	Rapport entre la contrainte axiale et la déformation axiale appliquée dans le cas d'un comportement élastique linéaire.
Module de cisaillement	G	Pa	Rapport entre la contrainte de cisaillement appliquée et la déformation latérale relative dans le cas d'un comportement élastique linéaire.
Coefficient de Poisson	ν	Pa	Déformation du milieu dans la direction transversale à la direction de sollcitation.
Limite élastique	f_y, σ_e	Pa	Contrainte limite sollicitant le matériau au delà de laquelle, le matériau rentre en plasticité, les déformations deviennent permanentes.
Contrainte ultime	f_u, σ_u	Pa	Contrainte limite sollicitant le matériau au delà de laquelle, il y a rupture du matériau.
Viscosité	η	Pa.s	Resistance au flux
Module de stockage	G'	Pa	Pour un matériau viscoélastique, la partie élastique du mo- dule complexe. G'=0 si le matériau est purement visqueux
Module de perte	G"	Pa	Pour un matériau viscoélastique, la partie visqueuse du mo- dule complexe. G"=0 si le matériau est purement élastique
Cohésion		Pa ou J/m^2 ou J/m^3	Résistance à la perte de cohésion du biofilm qui se traduit par un détachement de parties du biofilm.
Adhésion		$\begin{array}{c} {\rm Pa~ou}\\ {\rm J/m^2~ou}\\ {\rm J/m^3} \end{array}$	Résistance à la perte d'adhésion du biofilm qui se traduit par une séparation totale du biofilm avec la surface sur laquelle il était attaché.

TABLE A.1. Vocabulaire et notations mécaniques

Annexe B

Protocoles expérimentaux

B.1 Cinétique de formation de biofilm sans antibiotique : suivi de l'installation au BRT et au microscope

But

Suivre la cinétique de formation d'un biofilm au microscope afin de déceler un critère permettant de prédire plus finement la primo-adhésion.

Principe

Observer, jusqu'à l'immobilisation des billes (quelques heures), toutes les 5 ou 10 minutes, le fond d'un puits test et d'un puits témoin.

Matériel

- 1 boîte de bactéries repiquées 2 fois;
- TON4;
- BHI;
- autant de microplaques de 96 puits que de temps d'incubation lus.

Protocole

- 1. Préparer 2 mélanges :
 - Mélange pour BRT test : une solution bactérienne à DO 0.004 et 10μ l/ml de TON4;
 - Mélange pour BRT témoin : un mélange BHI + TON 4 à $10 \mu l/ml.$
- Remplir 4 puits de chacun des mélanges dans chacune des plaques (200µl/puits) selon un plan de plaque établi au préalable;
- 3. Mettre toutes les plaques, sauf une, à l'étuve.
- 4. Avec la plaque restante, prendre une série d'image pour le puits test et pour le puits témoin ;
- 5. Ajouter liquide de contraste sur les puits et réaliser un BRT (image + analyse BFI);
- 6. Répéter le protocole depuis l'étape 4 pour tous les temps d'incubations en sortant une plaque de l'étuve au temps désiré.

Analyse

Les trajectoires de toutes les billes présentes sur les séries d'images pour le puits test et le puits témoin sont suivies, pour chaque temps d'incubation. L'évolution de la tendances des mouvements libres des billes au cours du temps est recherchée. Le BRT sert de référence.

B.2 Cinétique de formation de biofilm en présence d'antibiotique : suivi de l'installation au BRT et au microscope

But

Suivre la cinétique de formation de biofilm au microscope afin de déceler un critère permettant de prédire plus finement la primo-adhésion. Cet essai sera effectué en présence d'antibiotiques (ATB) pour essayer de détecter un caractère antibiofilm sur un intervalle de temps 0-2h (lecture toutes les 10 minutes).

Principe

Observer jusqu'à l'immobilisation des billes le fond d'un puits Test avec antibiotique, d'un puits Test sans antibiotique et d'un puits Témoin.

Matériel

- 1 boîte de bactéries repiquées 2 fois;
- billes 1 μm (TON4);
- milieu BHI;
- antibiotiques en solution : Vancomycin à 4 $\mu g/mL$ et Acide Fusidique à $2\mu g/mL$;
- autant de microplaques de 96 puits que de temps d'incubation observés.

Protocole

Préparation des plaques antibiotiques : Dans les plaques, les antibiotiques sont apportés par un dépôt de 20 μL . Comme ce dépôt va être dilué par ajout de la suspension bactérienne (180 μL / puits), les solutions déposées doivent être 10 fois plus concentrées que la valeur désirée, soit 40 $\mu g/mL$ pour la Vancomycin et $20\mu g/mL$ pour l'Acide Fusidique. Les solutions de dépôt sont préparées à partir de solutions existantes. Les solutions sont ensuite déposées dans les microplaques selon un plan de plaque établi, à raison de 20 μL /puits. L'eau pour préparation injectable (EPPI) est déposée dans les puits témoin.

Inoculation des plaques :

- 1. Préparer un mélange "Témoin" avec du BHI et du TON4 à raison de 10 $\mu L/mL$;
- 2. Préparer un mélange "Souche" avec du BHI et du TON4 à raison de 10 $\mu L/mL$;
- 3. À partir du second repiquage de la souche, prélever quelques colonies à l'œse et les remettre en suspension dans un tube avec 3ml de BHI;
- 4. Mesurer la DO_{600nm} de la suspension et calculer le volume d'inoculum à ajouter au mélange "Souche" afin d'avoir une $DO_{600nm} = 1/225 = 0.004444$ (la DO_{600nm} en puits sera de 0.004). Calcul inoculum = $0.004444 * V_{mélangeSouche}/DO_{600nm}$;
- 5. Inoculer le mélange "Souche" avec la souche;
- 6. Après homogénéisation des mélange "Témoin" et "Souche", les répartir dans les microplaques antibiotiques selon un plan de plaque établi, à raison de 180 μL / puits;

7. Les plaques sont mises immédiatement à incuber à 37 $^\circ\,\mathrm{C}.$

À chaque temps, une plaque est sortie de l'étuve et est observée au microscope. Une série d'images d'un puits pour chaque condition testée est enregistrée. La plaque est ensuite lue au BRT après ajout du liquide de contraste et l'aimantation de la plaque pendant 1 minute.

B.3 Dénombrement

But

Avoir une référence microbiologique pour les cinétiques de croissance de biofilm.

Principe

Réaliser un dénombrement des bactéries adhérées sur 6 temps différents au cours de la croissance du biofilm.

Matériel

- 1 boîte de bactéries repiquées 2 fois;
- milieu BHI;
- antibiotiques en solution : Vancomycin à 4 $\mu g/mL$ et Acide Fusidique à $2\mu g/mL$;
- 6 microplaques de 96 puits .

Protocole

Préparation des plaques antibiotiques (le cas échéant) : dans les plaques, les antibiotiques sont apportés par un dépôt de 20 μL . Comme ce dépôt va être dilué par ajout de la suspension bactérienne (180 μL / puits), les solutions déposées doivent être 10 fois plus concentrées que la valeur désirée, soit 40 $\mu g/mL$ pour la Vancomycin et $20\mu g/mL$ pour l'Acide Fusidique. Les solutions de dépôt sont préparées à partir de solutions existantes. Les solutions sont ensuite déposées dans 18 microplaques selon un plan de plaque établi, à raison de 20 μL /puits. L'eau pour préparation injectable (EPPI) est déposée dans les puits témoin.

Inoculation des plaques :

- 1. Préparer un mélange "Témoin" avec du BHI;
- 2. Préparer un mélange "Souche" avec du BHI;
- 3. À partir du second repiquage de la souche, prélever quelques colonies à l'œse et les remettre en suspension dans un tube avec 3ml de BHI;
- 4. Mesurer la DO_{600nm} de la suspension et calculer le volume d'inoculum à ajouter au mélange "Souche" afin d'avoir une $DO_{600nm} = 1/225 = 0.004444$ (la DO_{600nm} en puits sera de 0.004). Calcul inoculum = 0.004444 * $V_{mélangeSouche}/DO_{600nm}$;
- 5. Inoculer le mélange "Souche" avec la souche;
- 6. Après homogénéisation du mélange "Témoin" et "Souche", les répartir dans les microplaques antibiotiques selon un plan de plaque établi, à raison de 180 μL / puits.

Les plaques sont mises immédiatement à incuber. Elles sont traitées par dénombrement à 30min, 60min, 90min, 150min, 180min et 210min.

Pour le dénombrement des bactéries adhérées au fond des puits :

- 1. Sortir la plaque de l'étuve au temps d'uncubation étudié;
- 2. Retirer le surnageant de chaque puits très délicatement à l'aide d'une multicanaux;

- 3. Laver délicatement les puits à l'eau physiologique en ajoutant 200µL dans chaque puis et en les retirant ; répéter l'opération 2 fois supplémentaires ;
- 4. Ajouter 200µL de PBS 1x dans les puits et mettre la plaque à soniquer 5 min en veillant à immerger les puits jusqu'à mi-hauteur;
- Homogénéiser le contenu de chaque puits et regrouper dans un tube le surnageant de sonication des 4 puits par conditions : Témoin souche (T+), Souche + AVN, Souche +FA (800 μL par conditions);
- Effectuer les dilutions des suspensions à dénombrer dans du TS stérile et en étaler 100 μL sur BP BHI-A en duplicata;
- 7. Les puits témoins négatifs sont traités de la même manière que les autres puits mais 100µL du pool des 4 puits est étalé sur BP-BHI-A sans réaliser de dilution.

Annexe

Références des séries d'images utilisées

Les tableaux suivants récapitulent les paramètres des essais et des séries d'images correspondantes pour les manipulations de validation de la méthodologie présentée dans le chapitre 4.

C.1 Essai avec P. aeruginosa

Essai	Souche	Temps	Antibiotique	Taille image	Nombre d'image	Longueur Traj Min/ Max	Nombre billes suivies
P1	P.a eruginos a	0	n/a	512x512	3000	2704/2999	21
P2	P.a eruginos a	10	n/a	512x512	3000	1147/2999	12
P3	P.a eruginos a	15	n/a	512x512	3000	1009/2999	16
P4	P.a eruginos a	20	n/a	512x512	3000	431/2999	22
P5	P.a eruginos a	25	n/a	512x512	3000	2282/2999	11
P6	P.a eruginos a	30	n/a	512x512	3000	191/2999	11
P7	P.a eruginos a	35	n/a	512x512	3000	432/2999	16
P8	P.a eruginos a	40	n/a	512x512	3000	257/2999	18
P9	P.a eruginos a	45	n/a	512x512	3000	495/2999	15
P10	P.a eruginos a	50	n/a	512x512	3000	16/2999	15
P11	P.a eruginos a	55	n/a	512x512	3000	323/2999	26
P12	P.a eruginos a	60	n/a	512x512	3000	151/2999	16
P13	P.a eruginos a	65	n/a	512x512	3000	14/2999	12
P14	P.a eruginos a	70	n/a	512x512	3000	656/2999	12
P15	P.a eruginos a	75	n/a	512x512	3000	90/2999	19
P16	P.a eruginos a	80	n/a	512x512	3000	659/2999	12
P17	P.a eruginos a	85	n/a	512x512	3000	985/2999	19
P18	P.a eruginos a	90	n/a	512x512	3000	1325/2999	16
P19	P.a eruginos a	95	n/a	512x512	3000	2030/2999	10
P20	P.a eruginos a	100	n/a	512x512	3000	1946/2999	8
P21	P.a eruginos a	105	n/a	512x512	3000	405/2999	14
P22	P.a eruginos a	110	n/a	512x512	3000	98/2999	15
P23	P.a eruginos a	115	n/a	512x512	3000	2999/2999	12

TABLE C.1. Références des essais P.aeruginosa

C.2 Essais avec S. aureus

Essai	Souche	Temps	Antibiotique	Taille image	Nombre d'image	Longueur Traj Min/ Max	Nombre billes suivies
ST_0	Témoin - Blanc	0	n/a	1000x1000	3000	569/2999	95
ST_{10}	Témoin - Blanc	10	n/a	1000 x 1000	3000	729/2999	193
ST_{20}	Témoin - Blanc	20	n/a	1000 x 1000	3000	56/2999	247
ST_{30}	Témoin - Blanc	30	n/a	1000 x 1000	3000	239/2999	291
ST_{40}	Témoin - Blanc	40	n/a	1000 x 1000	3000	186/2999	243
ST_{50}	Témoin - Blanc	50	n/a	1000 x 1000	3000	361/2999	277
ST_{60}	Témoin - Blanc	60	n/a	1000 x 1000	3000	204/2999	290
ST_{70}	Témoin - Blanc	70	n/a	1000 x 1000	3000	105/2999	261
ST_{80}	Témoin - Blanc	80	n/a	1000 x 1000	3000	215/2999	238
ST_{90}	Témoin - Blanc	90	n/a	1000 x 1000	3000	452/2999	215
ST_{100}	Témoin - Blanc	100	n/a	1000 x 1000	3000	210/2999	201
ST_{110}	Témoin - Blanc	110	n/a	1000 x 1000	3000	210/2999	166
ST_{120}	Témoin - Blanc	120	n/a	1000 x 1000	3000	171/2999	149
ST_{130}	Témoin - Blanc	130	n/a	1000 x 1000	3000	536/2999	147
ST_{140}	Témoin - Blanc	140	n/a	1000 x 1000	3000	73/2999	161
ST_{150}	Témoin - Blanc	150	n/a	1000 x 1000	3000	15/2999	133
ST_{160}	Témoin - Blanc	160	n/a	1000 x 1000	3000	259/2999	195
ST_{170}	Témoin - Blanc	170	n/a	1000 x 1000	3000	397/2999	131
ST_{180}	Témoin - Blanc	180	n/a	1000x1000	3000	12/2999	109

TABLE C.2. Références des essais - Replicat 1 - Blanc

TABLE C.3. Références des essais - Replicat 1 - Souche

Essai	Souche	Temps	Antibiotique	Taille image	Nombre d'image	Longueur Traj Min/ Max	Nombre billes suivies
S_0	S. aureus	0	n/a	1000x1000	3000	887/2999	118
S_{10}	S. aureus	10	n/a	1000 x 1000	3000	306/2999	242
S_{20}	S. aureus	20	n/a	1000×1000	3000	674/2999	284
S_{30}	S. aureus	30	n/a	1000×1000	3000	112/2999	243
S_{40}	S. aureus	40	n/a	1000×1000	3000	391/2999	255
S_{50}	S. aureus	50	n/a	1000×1000	3000	133/2999	305
S_{60}	S. aureus	60	n/a	1000×1000	3000	69/2999	266
S_{70}	S. aureus	70	n/a	1000×1000	3000	174/2999	199
S_{80}	S. aureus	80	n/a	1000×1000	3000	173/2999	222
S_{90}	S. aureus	90	n/a	1000 x 1000	3000	288/2999	242
S_{100}	S. aureus	100	n/a	1000×1000	3000	181/2999	207
S_{110}	S. aureus	110	n/a	1000 x 1000	3000	160/2999	215
S_{120}	S. aureus	120	n/a	1000×1000	3000	149/2999	143
S_{130}	S. aureus	130	n/a	1000 x 1000	3000	666/2999	198
S_{140}	S. aureus	140	n/a	1000×1000	3000	754/2999	66
S_{50}	S. aureus	150	n/a	1000×1000	3000	174/2999	223
S_{60}	S. aureus	160	n/a	1000×1000	3000	2392/2999	105
S_{170}	S. aureus	170	n/a	1000 x 1000	3000	37/2999	94
S_{180}	S. aureus	180	n/a	1000 x 1000	3000	2953/2999	61

Essai	Souche	Temps	Antibiotique	Taille image	Nombre d'image	Longueur Traj Min/ Max	Nombre billes suivies
SV_0	S. aureus	0	Vancomycin	1000x1000	3000	392/2999	169
SV_{10}	S. aureus	10	Vancomycin	1000 x 1000	3000	419/2999	303
SV_{20}	S. aureus	20	Vancomycin	1000×1000	3000	179/2999	347
SV_{30}	S. aureus	30	Vancomycin	1000 x 1000	3000	314/2999	305
SV_{40}	S. aureus	40	Vancomycin	1000 x 1000	3000	336/2999	243
SV_{50}	S. aureus	50	Vancomycin	1000 x 1000	3000	197/2999	273
SV_{60}	S. aureus	60	Vancomycin	1000 x 1000	3000	315/2999	273
SV_{70}	S. aureus	70	Vancomycin	1000 x 1000	3000	429/2999	219
SV_{80}	S. aureus	80	Vancomycin	1000 x 1000	3000	377/2999	236
SV_{90}	S. aureus	90	Vancomycin	1000 x 1000	3000	481/2999	121
SV_{100}	S. aureus	100	Vancomycin	1000×1000	3000	79/2999	226
SV_{110}	S. aureus	110	Vancomycin	1000 x 1000	3000	356/2999	202
SV_{120}	S. aureus	120	Vancomycin	1000 x 1000	3000	241/2999	221
SV_{130}	S. aureus	130	Vancomycin	1000 x 1000	3000	539/2999	203
SV_{140}	S. aureus	140	Vancomycin	1000 x 1000	3000	195/2999	160
SV_{150}	S. aureus	150	Vancomycin	1000 x 1000	3000	30/2999	99
SV_{160}	S. aureus	160	Vancomycin	1000 x 1000	3000	279/2999	173
SV_{170}	S. aureus	170	Vancomycin	1000 x 1000	3000	466/2999	170
SV_{180}	S. aureus	180	Vancomycin	1000 x 1000	3000	79/2999	123

TABLE C.4. Références des essais - Replicat1 - Vancomycin

TABLE C.5. Références des essais - Replicat 1 - Acide Fusidique

Essai	Souche	Temps	Antibiotique	Taille image	Nombre d'image	Longueur Traj Min/ Max	Nombre billes suivies
SAF_0	S. aureus	0	Fusidic Acid	1000x1000	3000	364/2999	135
SAF_{10}	S. aureus	10	Fusidic Acid	1000×1000	3000	172/2999	251
SAF_{20}	S. aureus	20	Fusidic Acid	1000×1000	3000	262/2999	312
SAF_{30}	S. aureus	30	Fusidic Acid	1000×1000	3000	334/2999	242
SAF_{40}	S. aureus	40	Fusidic Acid	1000×1000	3000	138/2999	290
SAF_{60}	S. aureus	60	Fusidic Acid	1000×1000	3000	152/2999	298
SAF_{70}	S. aureus	70	Fusidic Acid	1000×1000	3000	92/2999	314
SAF_{80}	S. aureus	80	Fusidic Acid	1000×1000	3000	147/2999	155
SAF_{90}	S. aureus	90	Fusidic Acid	1000×1000	3000	150/2999	239
SAF_{100}	S. aureus	100	Fusidic Acid	1000×1000	3000	58/2999	236
SAF_{110}	S. aureus	110	Fusidic Acid	1000×1000	3000	292/2999	191
SAF_{120}	S. aureus	120	Fusidic Acid	1000×1000	3000	406/2999	171
SAF_{130}	S. aureus	130	Fusidic Acid	1000×1000	3000	288/2999	228
SAF_{140}	S. aureus	140	Fusidic Acid	1000×1000	3000	21/2999	181
SAF_{150}	S. aureus	150	Fusidic Acid	1000×1000	3000	262/2999	178
SAF_{160}	S. aureus	160	Fusidic Acid	1000×1000	3000	401/2999	135
SAF_{170}	S. aureus	170	Fusidic Acid	1000×1000	3000	151/2999	186
SAF_{180}	S. aureus	180	Fusidic Acid	1000×1000	3000	136/2999	191

TABLE C.6. Références des essais - Replicat 2 - Blanc

Essai	Souche	Temps	Antibiotique	Taille image	Nombre d'image	Longueur Traj Min/ Max	Nombre billes suivies
$ST2_0$	Témoin - Blanc	0	n/a	1000x1000	3000	1968/2999	62
$ST2_{10}$	Témoin - Blanc	10	n/a	1000 x 1000	3000	338/2999	266
$ST2_{20}$	Témoin - Blanc	20	n/a	1000 x 1000	3000	384/2999	221
$ST2_{30}$	Témoin - Blanc	30	n/a	1000 x 1000	3000	288/2999	258
$ST2_{40}$	Témoin - Blanc	40	n/a	1000 x 1000	3000	227/2999	263
$ST2_{50}$	Témoin - Blanc	50	n/a	1000 x 1000	3000	297/2999	246
$ST2_{60}$	Témoin - Blanc	60	n/a	1000 x 1000	3000	26/2999	278
$ST2_{70}$	Témoin - Blanc	70	n/a	1000 x 1000	3000	45/2999	242
$ST2_{80}$	Témoin - Blanc	80	n/a	1000 x 1000	3000	191/2999	144
$ST2_{90}$	Témoin - Blanc	90	n/a	1000 x 1000	3000	249/2999	218
$ST2_{100}$	Témoin - Blanc	100	n/a	1000x1000	3000	272/2999	217
$ST2_{110}$	Témoin - Blanc	110	n/a	1000 x 1000	3000	303/2999	204
$ST2_{120}$	Témoin - Blanc	120	n/a	1000 x 1000	3000	142/2999	175
$ST2_{130}$	Témoin - Blanc	130	n/a	1000 x 1000	3000	351/2999	140
$ST2_{140}$	Témoin - Blanc	140	n/a	1000 x 1000	3000	326/2999	186
$ST2_{150}$	Témoin - Blanc	150	n/a	1000 x 1000	3000	344/2999	169
$ST2_{160}$	Témoin - Blanc	160	n/a	1000 x 1000	3000	300/2999	182
$ST2_{170}$	Témoin - Blanc	170	n/a	1000 x 1000	3000	281/2999	160
$ST2_{180}$	Témoin - Blanc	180	n/a	1000 x 1000	3000	501/2999	171

Essai	Souche	Temps	Antibiotique	Taille image	Nombre d'image	Longueur Traj Min/ Max	Nombre billes suivies
$S2_0$	S. aureus	0	n/a	1000x1000	3000	328/2999	129
$S2_{10}$	S. aureus	10	n/a	1000 x 1000	3000	75/2999	331
$S2_{20}$	S. aureus	20	n/a	1000 x 1000	3000	476/2999	297
$S2_{30}$	S. aureus	30	n/a	1000 x 1000	3000	265/2999	333
$S2_{40}$	S. aureus	40	n/a	1000 x 1000	3000	470/2999	272
$S2_{50}$	S. aureus	50	n/a	1000 x 1000	3000	88/2999	229
$S2_{60}$	S. aureus	60	n/a	1000x1000	3000	486/2999	221
$S2_{70}$	S. aureus	70	n/a	1000 x 1000	3000	59/2999	215
$S2_{80}$	S. aureus	80	n/a	1000 x 1000	3000	403/2999	228
$S2_{90}$	S. aureus	90	n/a	1000 x 1000	3000	488/2999	188
$S2_{100}$	S. aureus	100	n/a	1000 x 1000	3000	214/2999	169
$S2_{110}$	S. aureus	110	n/a	1000 x 1000	3000	316/2999	220
$S2_{120}$	S. aureus	120	n/a	1000 x 1000	3000	576/2999	98
$S2_{130}$	S. aureus	130	n/a	1000 x 1000	3000	188/2999	136
$S2_{140}$	S. aureus	140	n/a	1000 x 1000	3000	417/2999	178
$S2_{150}$	S. aureus	150	n/a	1000 x 1000	3000	2139/2999	119
$S2_{160}$	S. aureus	160	n/a	1000 x 1000	3000	1651/2999	125
$S2_{170}$	S. aureus	170	n/a	1000 x 1000	3000	2999/2999	133
$S2_{180}$	S. aureus	180	n/a	1000 x 1000	3000	2999/2999	36

TABLE C.7. Références des essais - Replicat 2 - Souche

TABLE C.8. Références des essais - Replicat2 - Vancomycin

Essai	Souche	Temps	Antibiotique	Taille image	Nombre d'image	Longueur Traj Min/ Max	Nombre billes suivies
$SV2_0$	S. aureus	0	Vancomycin	1000x1000	3000	385/2999	155
$SV2_{10}$	S. aureus	10	Vancomycin	1000 x 1000	3000	178/2999	268
$SV2_{20}$	S. aureus	20	Vancomycin	1000 x 1000	3000	100/2999	263
$SV2_{30}$	S. aureus	30	Vancomycin	1000 x 1000	3000	302/2999	343
$SV2_{40}$	S. aureus	40	Vancomycin	1000 x 1000	3000	226/2999	275
$SV2_{50}$	S. aureus	50	Vancomycin	1000 x 1000	3000	410/2999	275
$SV2_{60}$	S. aureus	60	Vancomycin	1000 x 1000	3000	25/2999	204
$SV2_{70}$	S. aureus	70	Vancomycin	1000 x 1000	3000	90/2999	234
$SV2_{80}$	S. aureus	80	Vancomycin	1000 x 1000	3000	125/2999	278
$SV2_{90}$	S. aureus	90	Vancomycin	1000 x 1000	3000	44/2999	204
$SV2_{100}$	S. aureus	100	Vancomycin	1000 x 1000	3000	206/2999	199
$SV2_{110}$	S. aureus	110	Vancomycin	1000 x 1000	3000	249/2999	179
$SV2_{120}$	S. aureus	120	Vancomycin	1000 x 1000	3000	47/2999	172
$SV2_{130}$	S. aureus	130	Vancomycin	1000 x 1000	3000	254/2999	192
$SV2_{140}$	S. aureus	140	Vancomycin	1000 x 1000	3000	141/2999	189
$SV2_{150}$	S. aureus	150	Vancomycin	1000 x 1000	3000	120/2999	180
$SV2_{160}$	S. aureus	160	Vancomycin	1000 x 1000	3000	1598/2999	58
$SV2_{170}$	S. aureus	170	Vancomycin	1000 x 1000	3000	151/2999	159
$SV2_{180}$	S. aureus	180	Vancomycin	1000 x 1000	3000	74/2999	164

TABLE C.9. Références des essais - Replicat 2 - Acide Fusidique

Essai	Souche	Temps	Antibiotique	Taille image	Nombre d'image	Longueur Traj Min/ Max	Nombre billes suivies
$SFA2_0$	S. aureus	0	Fusidic Acid	1000×1000	3000	552/2999	193
$SFA2_{10}$	S. aureus	10	Fusidic Acid	1000×1000	3000	450/2999	288
$SFA2_{20}$	S. aureus	20	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	218/2999	269
$SFA2_{30}$	S. aureus	30	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	161/2999	298
$SFA2_{40}$	S. aureus	40	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	133/2999	212
$SFA2_{50}$	S. aureus	50	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	752/2999	143
$SFA2_{60}$	S. aureus	60	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	167/2999	248
$SFA2_{70}$	S. aureus	70	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	67/2999	220
$SFA2_{80}$	S. aureus	80	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	91/2999	240
$SFA2_{90}$	S. aureus	90	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	54/2999	115
$SFA2_{100}$	S. aureus	100	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	204/2999	166
$SFA2_{110}$	S. aureus	110	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	127/2999	195
$SFA2_{120}$	S. aureus	120	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	1012/2999	201
$SFA2_{130}$	S. aureus	130	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	665/2999	180
$SFA2_{140}$	S. aureus	140	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	272/2999	161
$SFA2_{150}$	S. aureus	150	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	439/2999	184
$SFA2_{160}$	S. aureus	160	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	112/2999	167
$SFA2_{170}$	S. aureus	170	Fusidic Acid	1000 x 1000	3000	337/2999	137
$SFA2_{180}$	S. aureus	180	Fusidic Acid	1000×1000	3000	735/2999	186