

Diffusion de bactéries en surface: de la particule au biofilm

Thomas Vourc'H

▶ To cite this version:

Thomas Vourc'H. Diffusion de bactéries en surface: de la particule au biofilm. Physique [physics]. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT: 2018USPCC123. tel-02357225

HAL Id: tel-02357225 https://theses.hal.science/tel-02357225

Submitted on 9 Nov 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.





Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale « Physique en Île de France » - ED 564

Laboratoire AstroParticules & Cosmologie / Equipe Physique des Energies

Diffusion de bactéries en surface : de la particule au biofilm

Par Thomas Vourc'h

Thèse de doctorat de Physique

Dirigée par Hassan Peerhossaini et Julien Léopoldès

Présentée et soutenue publiquement à Paris le 14 septembre 2018

Salima Rafaï Rapporteur CR, Laboratoire LiPhy, Université Grenoble Alpes

Harold Auradou Rapporteur DR, Laboratoire FAST, Université Paris Sud

Olivier Bénichou Président du jury DR, Laboratoire LPTMC, Université Pierre et Marie Curie

Atef Asnacios Examinateur PR, Laboratoire MSC, Université Paris Diderot

Fernando Peruani Examinateur MCF, Laboratoire J.A Dieudonné, Université Nice Sophia Antipolis

Hassan Peerhossaini Directeur de thèse PR, Laboratoire APC, Université Paris Diderot

Julien Léopoldès Co-encadrant de thèse MCF, Institut Langevin, ESPCI Paris - UPEMLV

Résumé

Dans cette thèse, nous nous intéressons aux mécanismes précurseurs de la formation d'un biofilm dans le cas de la cyanobactérie Synechocystis sp. PCC 6803, en tant que micro-organisme modèle. Nous avons en premier lieu observé la motilité de cellules qui sédimentent puis diffusent librement sur une surface en verre. De plus, nous avons relevé les détails de la motilité des bactéries, qui est intermittente : des périodes de mouvements directionnels (les "runs") alternent avec des périodes de mouvements localisés (les "tumbles"). Le coefficient de diffusion résultant décroît avec le temps, avant de se stabiliser; en revanche des souches mutantes relarguant moins de substance extracellulaire gardent un coefficient de diffusion constant au cours de l'expérience. Nous proposons un modèle de ralentissement basé sur une marche aléatoire à "temps continu" influencée par le recouvrement progressif de la surface par les exopolysaccharides secrétés par les bactéries. Les bactéries pourraient ainsi "reconnaître" le type de surface sur lequel elles évoluent et adapter leur motilité en conséquence, ce qui constitue une étape préliminaire dans la formation d'un biofilm.

Nous avons vérifié ce point avec une étude de la diffusion sur des surfaces de différentes rigidités. L'expérience est cette fois prolongée pour étudier l'effet de la dureté du substrat sur la morphologie du biofilm. La proportion de bactéries non motiles est plus importante sur les surfaces molles. Cet effet à l'échelle de la particule conditionne en grande partie la morphologie des micro-colonies émergentes après plusieurs jours de culture, avec davantage de micro-colonies et une densité cellulaire plus hétérogène sur les surfaces molles. Nous construisons un modèle qui prend en compte la division cellulaire et le ralentissement de la dynamique individuelle, et permettant de conclure sur le lien entre rigidité de surface, dynamique cellulaire, et formation de micro-colonies.

Le troisième chapitre expérimental aborde la réponse du système à des changements de conditions lumineuses, d'abord de manière isotrope puis en introduisant une lumière directionnelle. En conditions isotropes, les échelons d'intensité lumineuse perturbent les temps caractéristiques de "run" et de "tumble". Nous analysons ces variations dans le cadre de la théorie de la réponse linéaire. Nos données suggèrent qu'il est possible de décrire la réponse à une perturbation d'intensité lumineuse de manière similaire à des "stimuli" chimiques, avec la même fonction réponse. Sous un flux lumineux directionnel, nous observons une phototaxie complexe pour laquelle une fraction des cellules a

un mouvement aléatoire pendant qu'une autre est sensible à l'anisotropie de l'éclairage. L'orientation des déplacements s'effectue dès l'introduction du flux lumineux, mais les temps de "run" et de "tumble" continuent d'évoluer pendant la période du flux lumineux suivant une tendance proche de celle observée en conditions isotropes. Ces résultats mettent en évidence le couplage entre l'intensité lumineuse et l'anisotropie de l'éclairage dans les mécanismes responsables de la phototaxie.

Mots-clés: diffusion, bactérie, phototaxie, biofilm, colonisation

Abstract

In this work, we focus on the early stages of biofilm formation, using the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a model micro-organism. First, we observe the motility of cells that have just reached the surface after sedimentation, and are then let free to diffuse on a glass surface. The resulting diffusion coefficient decreases with time, until it reaches a plateau value; whereas mutant strains secreting less extracellular substance do not exhibit such a slowdown. To explore the mechanism at work, we investigate the details of bacterial motility, which is intermittent: periods of directional movements ("runs") alternate with periods of localized movements ("tumbles"). We propose a slowdown model based on a continuous-time random walk, influenced by the progressive surface coverage with the exopolysaccharides secreted by the bacteria. They could then "recognize" the surface onto which they are diffusing and adapt consequently their motility, which establishes a preliminary step for the biofilm formation.

We have addressed this issue by studying diffusion onto surfaces with different stiffnesses. The experimentation is extended in order to analyze the effect of surface toughness on the biofilm morphology. The proportion of non-motile bacteria is higher on softer surfaces. This effect on the individual particle affects the shape of emergent microcolonies after several days of growth, with more microcolonies and a more heterogeneous surface density on soft surfaces. We build a model that takes into account cellular division and individual dynamics slowdown that enables us to point out the relation between surface rigidity, cellular dynamics, and microcolonies formation.

The third experimental chapter tackles the response of the system to changes in light conditions, first in an isotropic way, then by introducing a directional light. For isotropic conditions, steps of light intensity disrupt the characteristic "run" and "tumble" times. We analyze these variations in the framework of the linear response theory. Our data suggest that it is possible to describe the response to light disruptions in the same way as what has been done for chemical "stimuli", with a similar response function. With a directional luminous flux, we observe complex phototaxis, in which some fraction of the cellular population displays random movements, whereas another one is sensitive to the lighting anisotropy. The displacements are oriented as soon as the luminous flux is switched on, and the "run" and "tumble" times also respond this change. Our results show that light intensity triggers bacterial motility, whether it is oriented or not.

Keywords: diffusion, bacteria, phototaxis, biofilm, colonization

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire AstroParticules et Cosmologie (APC) de l'Université Paris Diderot (CNRS - UMR 7164), sous la direction d'Hassan Peerhossaini (APC) et l'encadrement de Julien Léopoldès (Institut Langevin, Université Paris-Est Marne-La-Vallée).

Mes premiers remerciements vont au Professeur Hassan Peerhossaini, mon directeur de thèse, qui m'a donné l'opportunité de découvrir le monde de la recherche en m'accueillant dans son équipe. Tout autant ses remarques pertinentes que ses conseils avisés m'ont été précieux tout au long de mon travail.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement Julien Léopoldès, qui a été plus qu'un co-encadrant durant ces trois ans de thèse. Pour son attention constante, ses explications scientifiques et toutes nos discussions, je lui adresse ici ma plus profonde reconnaissance.

Il est difficile, en tant que physicien, de mener une thèse impliquant des organismes vivants sans une expertise biologique sûre. Je voudrais donc ici remercier Annick Méjean, du Laboratoire Interdisciplinaire des Energies de Demain, qui m'a fourni les souches de cyanobactéries étudiées dans cette thèse, et m'a aidé à les cultiver au mieux. J'ajoute Franck Chauvat et Corinne Cassier-Chauvat (Institut de biologie intégrative de la cellule, Université Paris Saclay), qui m'ont permis de faire un grand pas dans mes recherches.

Je remercie aussi Julien Tailleur, du laboratoire Matière et Systèmes Complexes de l'Université Paris Diderot pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir, et qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux.

Je tiens également à témoigner ma gratitude à les membres de l'équipe : Jean-Pierre Thermeau pour son aide sur les installations expérimentales et Mojtaba Jarrahi pour ses conseils et toutes les discussions que nous avons pu avoir. Mais aussi Elnaz Pashmi, Chau Nguyen Minh, Kira Claire, pour tous les moments de convivialité passés ensemble. Je remercie aussi ici Hadi Fadlallah qui m'a permis de trouver mes marques au laboratoire à mon arrivée.

Aussi, si la thèse est un diplôme de reconnaissance scientifique, cette période a été importante dans ma vie personnelle. Je remercie ici ceux qui m'ont accompagné pendant ces trois ans : mes amis de tous horizons, et ma famille.

Enfin, merci à celle avec qui j'ai partagé tous les moments liés à cette thèse, et bien d'autres encore. Merci Elsa.

Table des matières

| \mathbf{R} | Résumé | | | | |
|-----------------------|--------|----------|--|----|--|
| \mathbf{A} | bstra | ıct | | 5 | |
| \mathbf{R} | emer | ciemer | nts | 7 | |
| In | trod | uction | | 13 | |
| 1 | Éta | t de l'a | art | 17 | |
| | 1.1 | Les cy | ranobactéries | 17 | |
| | | 1.1.1 | Des micro-organismes primitifs | 17 | |
| | | 1.1.2 | Des applications potentielles multiples | 19 | |
| | | 1.1.3 | La souche Synechocystis sp. PCC 6803 | 20 | |
| 1.2 Motilité des orga | | Motili | té des organismes vivants | 22 | |
| | | 1.2.1 | Différents types de motilité | 22 | |
| | | 1.2.2 | Mécanismes de la "twitching motility" | 24 | |
| | 1.3 | Dynar | mique diffusive | 27 | |
| | | 1.3.1 | Diffusion normale de traceurs inertes | 27 | |
| | | 1.3.2 | Diffusion anormale de particules inertes | 31 | |
| | | 1.3.3 | Diffusion de systèmes actifs | 35 | |
| | | 1.3.4 | Diffusion anisotrope | 36 | |
| | | 1.3.5 | Effets collectifs sur la dynamique diffusive | 38 | |
| | 1.4 | Colon | isation de surface | 41 | |
| | | 1.4.1 | Les biofilms : un ancien mode de survie | 41 | |
| | | 1.4.2 | Mécanismes de formation d'un biofilm | 41 | |
| | | 1.4.3 | Rôle de la dureté du substrat | 44 | |
| 2 | Ma | tériel e | et méthodes | 47 | |
| | 2.1 | Cultur | re des bactéries | 47 | |

| | 2.2 | Cellul | e fermée | 49 |
|---|-----|-----------------------|---|-----|
| | 2.3 | Canal | micro-fluidique | 49 |
| | 2.4 | Cellul | e ouverte | 51 |
| | 2.5 | Etude | de la phototaxie | 53 |
| | 2.6 | Acqui | sition et traitement d'images | 54 |
| 3 | Ral | ${ m entiss}\epsilon$ | ement de la dynamique diffusive | 57 |
| | 3.1 | Sédim | entation | 57 |
| | 3.2 | Ralen | tissement de la dynamique diffusive | 58 |
| | 3.3 | Diffus | ion intermittente | 61 |
| | | 3.3.1 | Une diffusion non-Gaussienne | 61 |
| | | 3.3.2 | Séparation entre périodes de "runs" et périodes de "tumble" | 62 |
| | | 3.3.3 | Simulations numériques | 64 |
| | 3.4 | Différe | ents mécanismes envisagés pour le ralentissement | 66 |
| | | 3.4.1 | "Quorum sensing" dans le volume de la suspension \dots | 67 |
| | | 3.4.2 | Influence de la production d'EPS sur la dynamique diffusive | 68 |
| | | 3.4.3 | Discussion | 71 |
| | 3.5 | Modél | lisation | 72 |
| | | 3.5.1 | Adaptation du modèle Continuous-Time Random Walk pour le coefficient de diffusion | 72 |
| | | 3.5.2 | Régime transitoire | 75 |
| | | 3.5.3 | Une description du nombre de sites distincts visités | 79 |
| | 3.6 | Concl | usion du chapitre | 81 |
| 4 | Ém | ergenc | e de micro-colonies | 83 |
| | 4.1 | Des d | ynamiques différentes en cellule fermée | 84 |
| | | 4.1.1 | La motilité reste intermittente | 84 |
| | | 4.1.2 | Proportion de bactéries "actives" | 85 |
| | 4.2 | Colon | isation de surface | 89 |
| | | 4.2.1 | Évolution de la dynamique | 90 |
| | | 4.2.2 | Croissance et division des bactéries | 94 |
| | | 4.2.3 | Des morphologies de biofilm différentes | 94 |
| | 4.3 | Descri | iption analytique | 97 |
| | | 4.3.1 | Croissance des bactéries | 98 |
| | | 4.3.2 | Proportion de bactéries actives | 100 |
| | 4.4 | Simula | ations numériques de la formation du biofilm | 102 |
| | 4.5 | Discus | ssion | 104 |

| 4.6 | Concl | usion | 106 |
|---------|----------|---|-----|
| 5 Rép | onse à | à un échelon d'intensité lumineuse | 107 |
| 5.1 | Condi | tions isotropes | 108 |
| | 5.1.1 | Modification de la dynamique | 108 |
| | 5.1.2 | Fonction réponse | 114 |
| | 5.1.3 | Interaction entre les bactéries | 118 |
| | 5.1.4 | Discussion | 121 |
| 5.2 | Photo | taxie | 122 |
| | 5.2.1 | Première analyse | 122 |
| | 5.2.2 | Différentes populations | 127 |
| | 5.2.3 | Régime transitoire | 129 |
| | 5.2.4 | Discussion | 133 |
| 5.3 | Concl | usion | 134 |
| Conclu | ısion g | générale | 137 |
| Annex | es | | 141 |
| A | Annex | kes du chapitre 4 | 141 |
| | A.1 | Calcul du nombre de bactéries pour les expériences de colonisation de surface | |
| | A.2 | Calcul du nombre de micro-colonies | 141 |
| | A.3 | Détails de la simulation numérique | 142 |
| В | Article | e publié | 144 |
| Liste d | les tab | leaux | 153 |
| Liste d | les figu | ıres | 155 |
| Bibliog | graphic | е | 161 |

Introduction

La diffusion est l'un des modes de transports principaux de particules dans un fluide. Le mouvement Brownien est un mécanisme de diffusion bien connu qui décrit le mouvement d'une grosse particule inerte soumises à des collisions répétées avec les particules du fluide environnant à l'équilibre thermodynamique. Le mouvement de la particule est alors bien défini, et il suit une statistique Gaussienne. En fait, cette théorie repose sur la séparation des échelles de temps entre les chocs répétés et le déplacement lent de la grosse particule, et ne représente donc qu'une partie des comportements physiques qui nous entourent. Dans un milieu complexe comme les verres à basse température ou encore le cytosquelette, les déplacements des particules peuvent être limités par leur environnement, ce qui résulte en une dynamique qui n'est plus Gaussienne [Wong et al., 2004, Chaudhuri et al., 2007, Di et al., 2014].

La complexité de la dynamique ne provient parfois pas de l'environnement, mais de la particule elle-même, lorsqu'elle a la capacité de se déplacer sans force extérieure. Cette propriété définit des systèmes actifs, qui disposent d'éléments moteurs à leur mouvement. L'étude des déplacements de particules actives est particulièrement intéressante lorsqu'il s'agit d'organismes vivants, car on peut alors supposer que le déplacement répond à un besoin, ou à une fonction biologique particulière : un animal cherchant sa nourriture ou fuyant les prédateurs. Un système actif dispose de ses propres capacités d'analyse et d'action, même rudimentaires.

Les propriétés des systèmes actifs permettent l'apparition de formes d'organisation des éléments le constituant, par exemple la formation de bancs de poissons aux mouvements complexes. A une échelle microscopique, des bactéries coordonnent leur mouvement dans un phénomène de bio-turbulence, et on retrouve aussi une forme d'organisation dans la propension des cellules à former des tissus. De plus, de nombreux microorganismes forment une couche amorphe qui recouvre la surface sur laquelle elles évoluent sous la forme d'un biofilm. Les biofilms jouent un rôle prépondérant dans de nombreuses problématiques avec de forts enjeux sociétaux, comme les maladies infectieuses ou l'endommagement de canalisations. Au vu des nombreuses applications liées aux biofilms, la compréhension fine de leurs mécanismes de formation est nécessaire.

La thèse présentée ici s'inscrit dans cette démarche, en étudiant la dynamique de surface d'une bactérie modèle dans l'étude de la photosynthèse : la souche la *Synechocystis* sp.

PCC 6803. Il s'agit d'une cyanobactérie unicellulaire, dont le mécanisme de déplacement est connu. Cette souche phototactique dispose également de la capacité à se déplacer vers une source lumineuse. Cependant la manière dont la dynamique de bactéries isolées évolue jusqu'au moment où les interactions cellulaires deviennent importantes reste inconnue.

Ce travail s'attache à décrire les détails de la dynamique observée, et de construire des modèles permettant d'en faire émerger les mécanismes principaux. Le chapitre 2 recense les dispositifs expérimentaux utilisés pour cette thèse. Nous présentons d'abord la souche *Synechocystis* sp. PCC 6803 et son milieu de culture, puis la cellule de mesure et les installations expérimentales dédiées à l'étude de leur motilité. Nous abordons aussi les méthodes numériques de suivi des bactéries et de reconstruction des trajectoires.

Le chapitre 3 commence par caractériser la dynamique des bactéries après leur introduction dans la cellule de mesure. Nous observons un ralentissement global, et une motilité intermittente composée de périodes de mouvements directionnels et de périodes de mouvements localisés. Nous mettons en évidence le rôle de la substance extracellulaire produite par les *Synechocystis* sur la décroissance de la dynamique, et construisons un modèle de ralentissement basé sur le recouvrement de la surface par cette substance. Les expériences réalisées permettent de proposer un mécanisme sur l'adaptation de la motilité des bactéries à leur arrivée sur une surface vierge, première étape vers la formation de micro-colonies.

Nous poursuivons l'étude des liens entre motilité et micro-colonies dans le chapitre 4. Des motilités différentes émergent selon la rigidité de la surface de diffusion. Des observations sur plusieurs jours montrent que les surfaces les plus molles, sur lesquelles les bactéries sont moins motiles, favorisent l'apparition de micro-colonies. Ces observations sont reproduites par des simulations numériques qui prennent en compte la division cellulaire et la motilité des bactéries. L'étude menée dans ce chapitre permet de montrer comment des morphologies de biofilm variées peuvent émerger en fonction de l'hétérogénéité de la motilité individuelle des bactéries.

Nous analysons enfin dans le chapitre 5 la réponse dynamique du système à des changements de conditions lumineuses, isotropes et anisotropes. Les résultats obtenus montrent une évolution de la dynamique des *Synechocystis* soumises à des échelons d'intensité lumineuse isotrope. Nous les interprétons dans le cadre de la théorie de la réponse linéaire, qui traduit la manière dont les bactéries s'adaptent à des conditions changeantes. Lorsque le flux lumineux est anisotrope, les cellules se déplacent en moyenne vers la source lumineuse dès le début de l'échelon, bien qu'une partie d'entre elles conserve un mouvement aléatoire. Pour toutes les bactéries, nous mesurons une réponse dynamique variable qui se rapproche de ce que nous avons constaté en conditions isotropes, sur un temps plus long que celui pris pour privilégier une direction du mouvement. Les cellules semblent ainsi adapter en même temps leur orientation et leur dynamique.

Avant la présentation des résultats expérimentaux, le chapitre qui suit expose briève-

ment quelques notions utiles pour établir le contexte scientifique de l'étude. Tout d'abord d'un point de vue biologique, avec des éléments historiques et généraux sur les bactéries, pour aboutir à la description biologique du système étudié ici, dont nous rappelons ensuite les mécanismes de la motilité. Nous discutons ensuite des outils de modélisation de la diffusion, en partant des particules inertes pour aller vers les mouvements collectifs complexes observés dans les systèmes actifs. Nous introduisons enfin les mécanismes de formation d'un biofilm et les facteurs qui peuvent l'influencer.

Chapitre 1

État de l'art

1.1 Les cyanobactéries

1.1.1 Des micro-organismes primitifs

L'un des signes de vie les plus anciens sur Terre, un fossile datant d'environ 2,7 milliards d'années, porte la signature de micro-organismes primitifs : des cyanobactéries [Brocks et al., 1999]. Il semble que les propriétés photosynthétiques de ces micro-organismes aient pu permettre l'oxygénation de l'atmosphère terrestre [Lyons et al., 2014], comme indiqué figure 1.1, ouvrant la voie vers la vie multicellulaire aérobie (qui se développe avec du dioxygène).

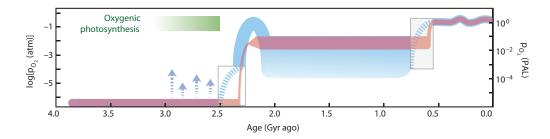


FIGURE 1.1 – Évolution de la pression partielle de dioxygène dans l'atmosphère depuis la naissance de la Terre. La courbe rouge représente le modèle classique en deux étapes de l'oxygénation de l'atmosphère, et la courbe bleue représente le modèle émergent. Schéma extrait de [Lyons et al., 2014].

Selon la théorie endosymbiotique ¹, les cyanobactéries ont également pu être intégrées dans des eucaryotes pour former des organismes plus complexes [Weber and Osteryoung, 2010]. Un schéma de ce processus est donné en figure 1.2, qui montre comment des orga-

^{1.} Hypothèse selon laquelle certains organites de cellules eucaryotes proviennent de l'incorporation d'autres micro-organismes plus simples, comme des bactéries.

nismes eucaryotes se sont constitués à partir de procaryotes. L'intégration de protéobactéries a permis l'émergence des fonctions énergétiques nécessaires au métabolisme des organismes vivants. Et les chloroplastes, les organites assurant la photosynthèse, résultent de l'endosymbiose de cyanobactéries [Bhattacharya et al., 2007]. Autrement dit, les organismes photosynthétiques actuels descendent des micro-organismes primitifs que sont les cyanobactéries, comme l'indique la flèche verte tracée sur la figure 1.2.

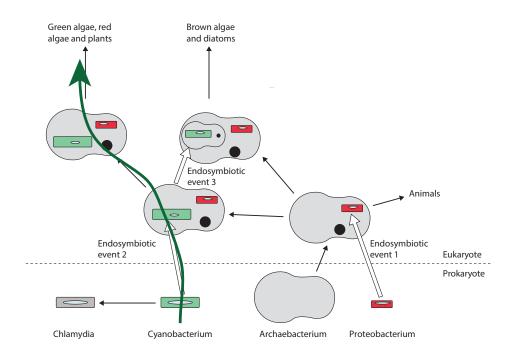
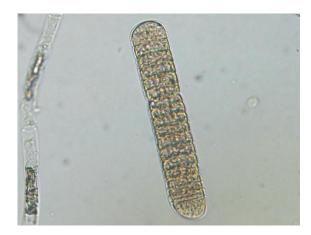


FIGURE 1.2 — Représentation schématique de l'évolution du génome au cours de l'évolution des organismes procaryotes vers les organismes eucaryotes. Les flèches noires indiquent les chemins suivis au cours de l'évolution, les flèches blanches indiquent des endosymbioses dans la cellule hôte. La flèche verte suit le chemin montrant comment les cyanobactéries ont pu former des formes de vie plus évoluées comme les plantes. Schéma extrait et adapté de [Raven and Allen, 2003].

Il existe plus de 1500 espèces de cyanobactéries, très diverses dans leurs formes et leur métabolisme. On peut par exemple trouver des cyanobactéries unicellulaires comme la Synechococcus, pluricellulaires comme la Microcystis aerigunosa, sphériques comme la Synechococystis sp. PCC 6803, ou encore filamenteuses comme les Oscillatoria. La figure 1.3 illustre la diversité morphologique des cyanobactéries. Toutes sont des organismes procaryotes (sans noyau), et à Gram négatif, dans la mesure où elles disposent d'une double membrane cellulaire et contiennent de nombreuses protéines. Leurs propriétés photosynthétiques sont similaires à celles des micro-algues, et elles ont longtemps été appelées (à tort) "algues bleues", mais il s'agit bien de bactéries et non de végétaux.



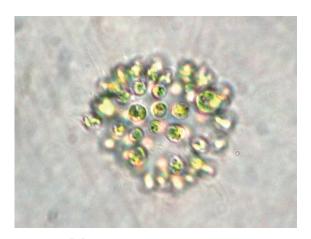
Aphanothece



Oscillatoria



Anabaena sp.



Microcystis aerigunosa

FIGURE 1.3 – Exemple des différentes morphologies de cyanobactéries. L'image de *Aphanothece* est extraite de [Sarma, 2013], les autres de : https://www.korseby.net/outer/flora/algae/cyanobacteria/index.html.

1.1.2 Des applications potentielles multiples

Aujourd'hui, les cyanobactéries se retrouvent dans de nombreux écosystèmes terrestres. Leurs formes diverses et leurs capacités d'adaptation leur permettent de survivre dans des environnements très variés [Lau et al., 2015] : milieux désertiques, eaux salines, forêts... Elles assurent des fonctions écologiques importantes, notamment en fixant l'azote atmosphérique, ce qui permet d'enrichir naturellement des milieux pauvres en nutriment [Kasting, 2011]. Elles représentent également d'importants stocks de carbone [Partensky et al., 1999], et relâchent du dioxygène dans l'atmosphère par photosynthèse.

À l'heure de la transition vers des formes énergétiques nouvelles, le rendement photosynthétique élevé des cyanobactéries (de 3 à 9% contre 0.25 à 3% pour les plantes en général) [Ducat et al., 2011] en fait des candidats pour la production de biocarburants [Dis-

mukes et al., 2008]. Celles-ci sont introduites dans un photobioréacteur, qui contient les cellules et assure la transmission de l'énergie solaire nécessaire à leur photosynthèse. La biomasse est ensuite récoltée, puis la phase solide est séparée de la phase liquide, qui contient les substances produites par les micro-organismes, notamment des acides gras. Par divers procédés chimiques, ces acides gras sont transformés en des produits d'intérêt comme de l'éthanol ou des alcanes, et même de l'hydrogène. Un schéma de principe des productions possibles est reproduit en figure 1.4. On peut, éventuellement en sélectionnant des souches mutantes, choisir une voie spécifique afin d'obtenir le produit désiré.

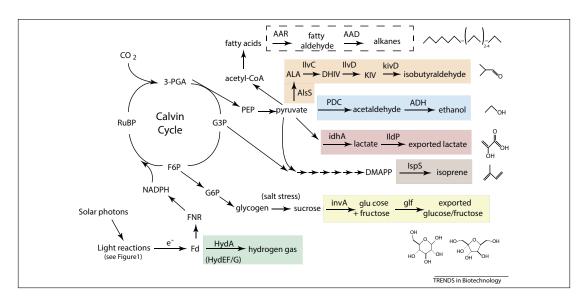


FIGURE 1.4 – Schéma de principe de l'obtention de produits d'intérêt à partir de la culture de cyanobactéries. Schéma extrait de [Ducat et al., 2011].

Citons également comme application connue des cyanobactéries la Spiruline, un complément alimentaire à base de *Arthrospira*. Certaines cyanobactéries seraient également capables de traiter les eaux usées en fixant les métaux lourds et en dégradant les molécules de polluant [Lau et al., 2015]. Leur rôle peut aussi être néfaste à l'environnement, comme lors du phénomène de "blooming" [Dervaux et al., 2015].

1.1.3 La souche Synechocystis sp. PCC 6803

Parmi toutes les diverses formes de cyanobactéries, nous étudions ici la souche *Syne-chocystis* sp. PCC 6803, appelée *Synechocystis* dans la suite du manuscrit. Cette souche a été isolée d'un lac en Amérique du Nord en 1968 [Stanier et al., 1971], puis déposée à la collection de l'Institut Pasteur la même année. Elle est ensuite devenue un organisme modèle pour l'étude de la photosynthèse. Cet organisme unicellulaire, dont le génome a été complètement caractérisé [Kaneko et al., 1996], est également facilement manipulable génétiquement. Son chromosome est consultable librement sur le site cyanobase : http://genome.microbedb.jp/cyanobase.

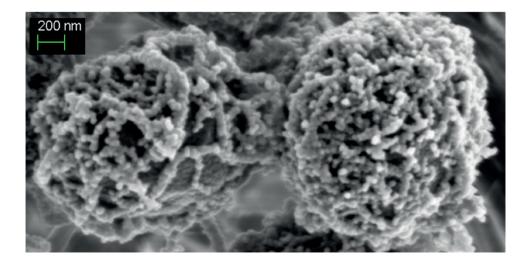


FIGURE 1.5 — Exemple d'images obtenues par microscopie électronique à balayage de la souche sauvage (WT) de *Synechocystis*. Les membranes cellulaires sont entourées d'un manteau d'exopolysaccharides. Image extraite de [Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015].

De forme quasi-sphérique, avec un diamètre d'environ 2 μ m, la Synechocystis est une bactérie motile, qui a la particularité de secréter des composés sucrés appelés exopolysaccharides (EPS). La figure 1.5 montre des images de la souche sauvage de Synechocystis obtenue par microscopie électronique à balayage [Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015]. Les bactéries apparaissent sous forme sphérique et sont entourées d'EPS. Ces exopolysaccharides peuvent être soit attachés à la membrane (on parle alors d'EPS capsulaires, ou CPS), soit relâchés par les Synechocystis dans le milieu dans lequel elles évoluent (on parle alors d'EPS relâchés, ou RPS).

La cyanobactérie Synechocystis est un micro-organisme très étudié en biologie pour ses propriétés photosynthétiques et en biochimie pour les applications mentionnées dans la partie précédente. Néanmoins, ces études approfondies concernent principalement les aspects biochimiques des procédés industriels potentiels. Il est nécessaire d'analyser sa motilité et son organisation sous forme de micro-colonies à la fois d'un point de vue fondamental, car sa dynamique reste peu détaillée, et aussi en relation avec les diverses applications pour lesquelles son interaction avec les surfaces est primordiale. En ce qui concerne sa motilité, les articles récents détaillent notamment la réponse de cette souche à un gradient de lumière [Ursell et al., 2013, Schuergers et al., 2016, Nakane and Nishizaka, 2017]. Cependant, le comportement diffusif des Synechocystis reste à préciser, et la manière dont les cellules se regroupent pour former un biofilm est encore mal comprise.

1.2 Motilité des organismes vivants

1.2.1 Différents types de motilité

De nombreuses cyanobactéries, ainsi que d'autres micro-organismes comme certaines micro-algues, ont la capacité de se déplacer par elles-mêmes, ce qui en fait des particules "actives". Leurs mouvements peuvent se réaliser en deux ou trois dimensions, selon les appendices dont disposent les cellules. Les modes de déplacement peuvent être très diversifiés. Les principaux sont repris en figure 1.6. Citons notamment :

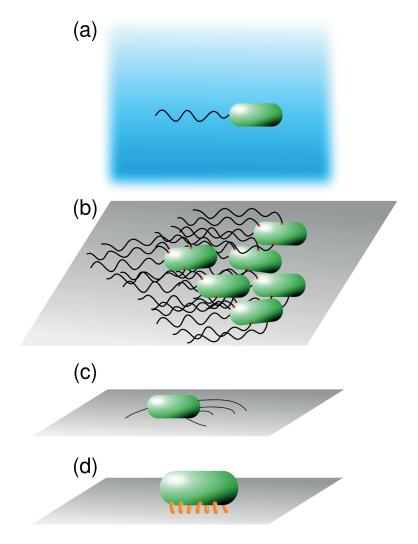


FIGURE 1.6 – Différents types de motilité : (a) Nage, (b) "swarming motility", (c) "twitching motility", (d) "gliding motility". Schéma extrait de [Mazza, 2016].

La nage

Il s'agit du mode de déplacement utilisé par les micro-organismes disposant d'un ou plusieurs flagelles. Ces flagelles peuvent tourner dans les deux sens de rotation autour de leur axe. Lorsque tous les flagelles sont mis en rotation dans le sens trigonométrique, elles forment un faisceau qui fait avancer la cellule dans la direction de l'axe de rotation. Ce mouvement en ligne droite est appelé un "run". Lorsqu'au moins un flagelle se met à tourner dans le sens horaire, les cellules s'arrêtent, et se réorientent dans une autre direction. Cette phase de rotation à sens horaire est appelée phase de "tumble". On peut distinguer deux types de nage : les "puller" qui tirent sur le fluide environnant pour avancer, et les "pusher" qui poussent le fluide derrière eux [Kurtuldu et al., 2011]. Suivant ces deux types de nage, la viscosité du fluide environnant peut être respectivement soit augmentée [Rafaï et al., 2010], soit diminuée [López et al., 2015]. Parmi les modes de déplacement recensés ici, c'est le seul qui n'est pas associé à une surface. Les micro-algues à flagelles comme la *Chlamydomonas reinhardtii* peuvent atteindre des vitesses de $40 \mu m.s^{-1}$ [Rafaï et al., 2010].

La "swarming motility"

Elle décrit le déplacement collectif d'organismes disposant de flagelles à proximité d'une surface. Le nombre de flagelles est ici prépondérant dans l'émergence de ce mode de motilité, qui dépend également de la quantité de nutriments disponibles et de la densité locale de bactéries. Les vitesses associées à ces mouvements collectifs sont de l'ordre de 2 à $10 \ \mu \mathrm{m.s^{-1}}$ [Copeland and Weibel, 2009].

La "gliding motility"

Ce mode de motilité est également associé à un déplacement de surface, qui n'implique pas nécessairement de flagelle ni de pili, mais des composés chimiques secrétés par la cellule, sur lesquels celle-ci glisse afin de se mouvoir. Ce mode de déplacement est lui-même décomposé en motilité sociale et en motilité aventureuse [Hu et al., 2016, Merz et al., 2000]. La motilité sociale repose sur des pili (appendices dont sont dotées certaines bactéries) qui permettent aux cellules d'interagir entre elles, tandis que la motilité aventureuse semble générée par des secrétions de la bactérie [Wolgemuth et al., 2002], qui lui permettent de se déplacer rapidement en ligne droite.

La "twitching motility"

Elle caractérise les mouvements de surface de micro-organismes utilisant des pili de type IV. La dénomination de ce type de motilité provient de la contraction des pili. Ces appendices sont utilisés par presque toutes les bactéries Gram-négatives. Ils sont composés de polymères qui peuvent s'assembler et se dissocier, générant ainsi le mouvement par une élongation puis une rétractation. Il résulte de cette alternance une vitesse non constante et un mouvement global intermittent. Les vitesses obtenues par ce mode de déplacement sont de l'ordre de 1 μ m.s⁻¹ [Zaburdaev et al., 2014].

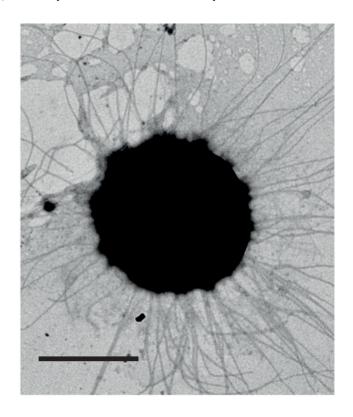


FIGURE 1.7 – Microscopie électronique en transmission montrant une *Synechocystis* entourée de ses pili de type IV. La barre d'échelle représente 1 μ m. Image extraite de [Nakane and Nishizaka, 2017].

La figure 1.7 montre une vue en microscopie électronique en transmission d'une *Syne-chocystis*. Elle fait apparaître nettement les pili de type IV, qui ressemblent à de longs fils orientés suivant la direction radiale. Ces cyanobactéries se déplacent grâce à leur pili selon le mode de "twitching" défini ci-dessus [Schuergers et al., 2015]. Nous donnons ci-après quelques précisions sur le mécanisme d'élongation et de rétractation des pili, qui assurent la motilité du micro-organisme étudié dans cette thèse.

1.2.2 Mécanismes de la "twitching motility"

La biosynthèse d'un pilus de type IV met en jeu de nombreux gènes et protéines. La figure 1.8 résume de manière simplifiée cet assemblage, et fait apparaître les différentes étapes. 1 : La piline pilA est synthétisée comme un précurseur de pilus, puis elle est clivée

par la prépiline peptidase PilD afin d'être libérée dans le périplasme (espace entre les deux membranes). 2 : Les pilines pilA sont alors assemblées par l'ATPase ² PilB, pour former une chaîne plus longue. 3 : La protéine PilC, attachée à la membrane interne, fixe et stabilise le début de pilus ainsi formé. 4 : Le pilus stabilisé peut ensuite traverser la membrane extérieure pour se déployer grâce à un pore créé par la protéine PilQ. 5 : Le processus de rétractation s'effectue grâce à une deuxième ATPase : PilT. Le mécanisme complet de formation et rétractation des pili est détaillé dans [Maier and Wong, 2015, Mattick, 2002, Carbonnelle et al., 2006].

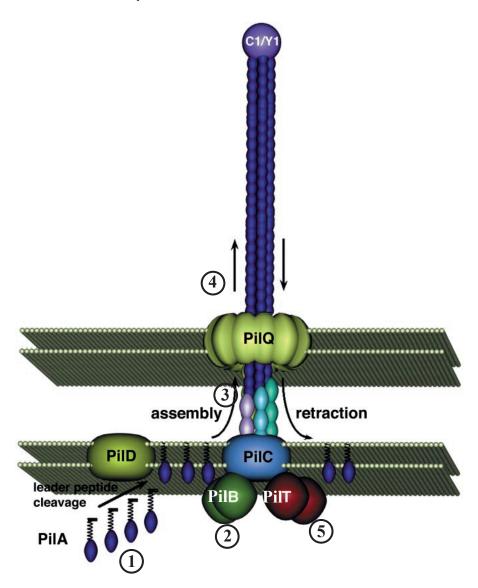


FIGURE 1.8 – Schéma d'un assemblage d'un pilus de type IV et de sa rétractation. La nomenclature utilisée est celle de la *Pseudomonas aerigunosa*. Les différentes étapes de formation et rétractation du pilus sont numérotées de 1 à 5. Image adaptée de [Mattick, 2002].

^{2.} Enzyme liée au métabolisme énergétique

Ce sont les ATPases PilB et PilT qui assurent la polymérisation ou la dépolymérisation du pilus. Ils jouent ainsi le rôle de moteurs du mouvement. Un article récent a pu corréler la localisation des PilB avec la direction du mouvement [Schuergers et al., 2015], comme le montre la figure 1.9, où la présence de l'ATPase PilB est repérée en vert.

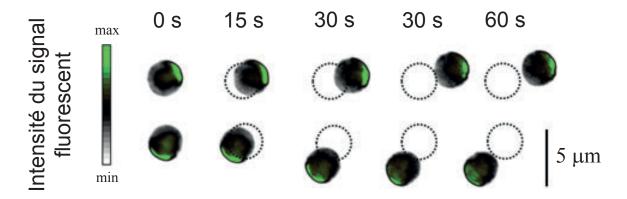


FIGURE 1.9 – Images successives en fluorescence de deux *Synechocystis*. La position initiale est repérée par le cercle pointillé, et le temps écoulé est indiqué au-dessus. L'intensité de la fluorescence est corrélée à la présence de la protéine PilB. Image adaptée de [Schuergers et al., 2015].

Les pili assemblés ont un diamètre de 6 à 9 nm, et peuvent atteindre des longueurs de quelques micromètres (ils sont parfois plus grands que la cellule elle-même) [Bhaya et al., 2000, Proft and Baker, 2009]. Des techniques de microscopie avancées comme les pinces optiques ou la microscopie à force atomique ont permis de mesurer la force développée par un pilus, qui peut atteindre 100 pN à la rupture [Burchmore et al., 2003, Touhami et al., 2006], avec une vitesse de rétractation de l'ordre de 1 μ m.s⁻¹. Ces valeurs font de ces appendices l'un des moteurs moléculaires les plus puissants du monde microscopique. Des mesures plus précises [Björnham and Axner, 2010] ont montré la non-linéarité de la réponse des pili à une élongation, comme l'indique la figure 1.10. Ce comportement est similaire à celui d'une ceinture de sécurité [Dansuk and Keten, 2018] : après une phase linéaire (Région I) et un plateau (Région II), la force de la liaison peut augmenter très fortement si la déformation imposée est importante (Région III). D'autres mesures ont aussi suggéré que les pili pouvaient s'associer pour augmenter leur rigidité [Lu et al., 2015].

Avant de détailler à quel mode de transport répondent ces organismes vivants, nous rappelons dans la suite quelques notions basiques au sujet de systèmes standards à l'équilibre thermodynamique, dont le comportement diffusif est bien compris.

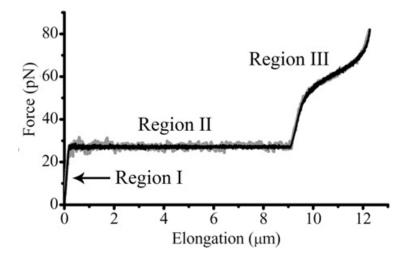


FIGURE 1.10 – Réponse en force d'un pilus à une élongation imposée, mesurée avec une pince optique (en gris). La courbe noire est un résultat de simulation numérique du même auteur. Courbe extraite de [Björnham and Axner, 2010].

1.3 Dynamique diffusive

1.3.1 Diffusion normale de traceurs inertes

Les premières observations du mouvement erratique de particules inertes ont été effectuées en 1827 par Robert Brown, un botaniste anglais regardant des grains de pollens en suspension dans l'eau. Ces mouvements observés sur des particules inertes ont intrigué la communauté scientifique, qui pensait que le mouvement était réservé aux organismes vivants. L'idée a ensuite émergé que ce mouvement d'une "grosse" particule provenait des collisions avec des "petites" particules du fluide environnant. Le mouvement de la grosse particule a été appelé "mouvement Brownien".

Albert Einstein a pu donner une explication théorique de ce mouvement [Einstein, 1905]. Des travaux parallèles menés par von Smoluchowski ont abouti à des résultats similaires [von Smoluchowski, 1906]. Parmi les premières observations expérimentales de la théorie, citons les études de Jean Perrin, qui a tracé les trajectoires de grains de mastic dans une solution liquide [Perrin, 1913]. Ses résultats sont reproduits en figure 1.11 : aucune direction ne semble privilégiée, les mouvements des grains sont aléatoires.

Au cours de son mouvement, la particule de masse m est soumise à deux forces : une force de frottements visqueux, caractérisée par un coefficient de frottement γ , et une force fluctuante F(t) qui modélise les collisions successives avec les "petites" particules fluides, qui composent le bain environnant. En raisonnant en une dimension, la vitesse v de la particule doit respecter l'équation 1.1, appelée équation de Langevin.

$$m\frac{dv}{dt} = -m\gamma v + F(t) \tag{1.1}$$

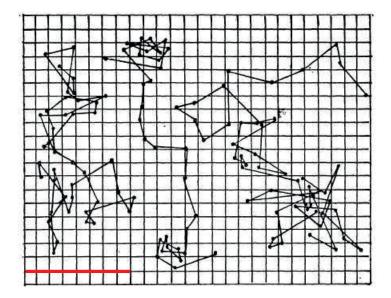


FIGURE 1.11 – Trajectoires de trois grains de mastic de rayon 0.53 μ m, dont les positions sont enregistrées toutes les 30 secondes. La barre rouge représente 25 μ m. Image extraite de [Perrin, 1913].

Cette équation s'intègre et permet d'obtenir une expression pour la vitesse v(t), en supposant la condition initiale $v(t=0)=v_0$:

$$v(t) = v_0 e^{-\gamma t} + \frac{1}{m} \int_0^t F(t') e^{-\gamma (t - t')} dt'$$
(1.2)

En supposant le fluide dans un état stationnaire, la moyenne de la force $\langle F(t) \rangle$ ne dépend pas du temps. Comme aucune direction n'est privilégiée, on prend $\langle F(t) \rangle = 0$. On suppose aussi que la fonction d'autocorrélation $c(t') = \langle F(t)F(t+t') \rangle$ ne dépend que de la différence t' entre les deux instants considérés. Ces forces sont corrélées pendant un certain temps τ_C . En général, ce temps de corrélation est très inférieur aux autres temps caractéristiques du problème, comme le temps de relaxation de la grosse particule depuis une vitesse initiale. Cela suggère que c(t') peut être modélisé par une fonction Dirac, et on pose en utilisant une constante D_c :

$$c(t') = \langle F(t)F(t+t')\rangle = 2D_c m^2 \delta(t')$$
(1.3)

Le comportement diffusif recherché par Einstein et von Smoluchowski est obtenu pour des temps longs, ce qui permet de négliger le terme d'inertie de l'équation 1.1. Les équations considérées pour la vitesse v et la position x sont alors :

$$m\gamma v = F(t) \tag{1.4}$$

 et

$$x(t) = \int_0^t v(t') dt' \tag{1.5}$$

Une mesure classique pour quantifier la diffusion de particules est l'écart quadratique moyen (ou MSD). Cette grandeur est calculée comme la moyenne sur l'ensemble des particules des écarts par rapport à la position d'origine au carré, soit $\langle x^2(t) \rangle$, en considérant que les particules partent de la position initiale $x_0 = 0$. Ce calcul donne :

$$\langle x^2(t)\rangle = \int_0^t \int_0^t \langle v(t_1)v(t_2)\rangle \,\mathrm{d}t_1 \,\mathrm{d}t_2 \tag{1.6}$$

En utilisant l'équation 1.4 pour exprimer la vitesse v en fonction de la force F, et l'équation 1.3, qui donne la fonction de corrélation des forces, on aboutit alors à :

$$\langle x^2(t)\rangle = 2Dt \tag{1.7}$$

où le coefficient de diffusion D est tel que $D = D_c/\gamma^2$. Cette équation permet d'établir le lien entre le déplacement et le coefficient de diffusion, à partir des forces s'exerçant sur la grosse particule.

Ainsi, dans le cas du mouvement Brownien, le MSD évolue linéairement avec le temps, et le coefficient de diffusion est lié à la pente de la droite obtenue. Ce résultat est généralisable à plusieurs dimensions, et si on note X(t) la position d'une particule partant de l'origine dans un repère à d dimensions, on obtient :

$$\langle X^2(t)\rangle = 2dDt \tag{1.8}$$

Le moteur du mouvement Brownien décrit ici est l'agitation thermique des particules de fluide, qui génèrent des chocs successifs sur la "grosse" particule. Le lien entre la température et la diffusion des particules Browniennes peut être établi à partir de considérations énergétiques. L'énergie cinétique moyenne de la grosse particule vaut $\langle E(t) \rangle = m \langle v^2(t) \rangle / 2$. En utilisant les équations 1.2 et 1.3, on obtient alors qu'aux temps longs, $\langle v^2(t) \rangle \sim \gamma D$. En supposant que la grosse particule est également en équilibre avec le bain, lui-même à l'équilibre thermodynamique à la température T, l'énergie moyenne de la grosse particule est $\langle E \rangle = k_B T$, où k_B est la constante de Boltzmann. Il en résulte la relation suivante :

$$k_B T = m\gamma D \tag{1.9}$$

Cette relation est une forme particulière du second théorème de fluctuation-dissipation, et permet de lier la dissipation visqueuse (coefficient de frottement γ) à la fluctuation de la vitesse des particules, associée au coefficient de diffusion D. On peut aussi développer cette équation en utilisant pour le coefficient de friction la formule de Stokes. La formule

résultante, connue sous le nom d'équation de Stokes-Einstein, donne le coefficient de diffusion associé au mouvement Brownien de particules de rayon R dans un fluide de viscosité dynamique μ à la température T:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\mu R} \tag{1.10}$$

Cette formule est valable pour des particules diffusant librement dans l'espace. A proximité d'une surface, lorsque la distance particule-surface est inférieure à la couche limite visqueuse, de nouvelles interactions entrent en jeu. Cela implique une correction éventuelle de la formule 1.10 par un coefficient correcteur [Pierres et al., 2001]. Une autre propriété que fait apparaître la fonction de corrélation de la force aléatoire (équation 1.3) est l'absence de "mémoire". En effet la force aléatoire F(t) à l'instant t ne dépend pas des évènements antérieurs à t car on montre que $\langle F(t)v(t')\rangle = 0$ pour t > t'. Cette absence de mémoire indique que la vitesse de la particule peut être considérée comme un processus de Markov, où la connaissance des instants précédents n'apporte aucune information supplémentaire pour la prédiction des évènements à venir.

Dans le cas d'un système stationnaire, cette propriété est résumée par la formule :

$$P(x, t + \Delta t) = \int P(x', t) p_{1|1}(x, \Delta t | x') dx'$$
(1.11)

où $p_{1|1}(x, \Delta t|x')$ est la probabilité de transition de l'état P(x', t) à l'état P(x, t) en un temps Δt . L'état du système à $t + \Delta t$ se calcule comme la somme des états du système à l'instant t multipliée par leur probabilité de transition.

Dans un réseau unidimensionnel de pas Δx , on peut utiliser l'équation 1.11 sous sa forme discrète pour obtenir simplement l'équation de diffusion [Metzler and Klafter, 2000]. La probabilité $P_j(t+\Delta t)$ de se trouver sur le site j à l'instant $t+\Delta t$ est égale à la somme des probabilités d'être sur les sites voisins à l'instant t:

$$P_j(t + \Delta t) = \frac{1}{2}P_{j-1}(t) + \frac{1}{2}P_{j+1}(t)$$
(1.12)

Par un développement de Taylor, on a également :

$$P_j(t + \Delta t) = P_j(t) + \Delta t \frac{\partial P_j}{\partial t} + O([\Delta t]^2)$$
(1.13)

et

$$P_{j\pm 1}(t) = P(x,t) \pm \Delta x \frac{\partial P}{\partial x} + \frac{(\Delta x)^2}{2} \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} + O([\Delta x]^3)$$
 (1.14)

que l'on peut injecter dans l'équation 1.12 pour obtenir finalement l'équation de diffusion :

$$\frac{\partial P}{\partial t} = D \frac{\partial^2 P}{\partial x^2} \tag{1.15}$$

dans laquelle le coefficient de diffusion D est la limite infinitésimale de $\frac{(\Delta x)^2}{2\Delta t}$.

Cette équation est vérifiée par les fonctions Gaussiennes du type :

$$P(x,t) = \frac{1}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}}$$
 (1.16)

Ainsi, les densités de probabilités de particules suivant un mouvement Brownien sont des fonctions Gaussiennes dont la largeur est proportionnelle à la racine carrée du coefficient de diffusion et du temps écoulé. Le mouvement Brownien est donc compris, du bilan de forces s'exerçant sur une particule jusqu'aux probabilités de déplacement. Cependant, sa description repose sur un certain nombre d'hypothèses qui peuvent se révéler incompatibles avec le mouvement étudié.

Par exemple, l'énergie nécessaire au mouvement de la particule peut provenir d'une autre source que le bain environnant à l'équilibre thermique. Son énergie moyenne est alors différente de k_BT , ce qui constitue un système hors équilibre thermique.

1.3.2 Diffusion anormale de particules inertes

Un tel système hors équilibre thermique a été étudié notamment par [Wu and Libchaber, 2000] et [Leptos et al., 2009], qui ont remplacé le bain thermique par une suspension de particules actives, des bactéries *Escherichia coli* et *Chlamydomonas reinhardtii* respectivement. La figure 1.12 présente les probabilités de déplacement des particules inertes obtenues par [Leptos et al., 2009]. Les distributions s'élargissent et leur forme s'éloigne de plus en plus de fonctions Gaussiennes à mesure que la concentration en bactérie s'accroît. Le coefficient de diffusion calculé à temps longs augmente aussi avec cette concentration. Par analogie avec le second théorème de fluctuation-dissipation (équation 1.9), l'ajout de particules actives correspondrait à une augmentation de la température effective du bain.

Le fait que les distributions de déplacement ne soient plus Gaussiennes peut provenir d'une violation de l'équation 1.3, où la fonction de corrélation des déplacements n'est plus une fonction Dirac, mais reste corrélée pendant un certain temps caractéristique [Wu and Libchaber, 2000]. Aux temps inférieurs à ce temps caractéristique, l'écart quadratique moyen n'évolue pas linéairement avec le temps t mais plutôt avec t^2 .

Dans ce cas, l'équation 1.8 n'est plus vérifiée car les déplacements ne sont plus décorrélés. De manière générale, on peut écrire la dépendance temporelle du MSD comme une fonction puissance du temps, avec un exposant $\alpha > 0$. Lorsque $\alpha = 1$, on parle de diffusion normale, dont le mouvement Brownien est un cas particulier, tandis que pour $\alpha < 1$ le régime est sous-diffusif, et super-diffusif lorsque $\alpha > 1$.

$$MSD(t) \sim t^{\alpha}$$
 (1.17)

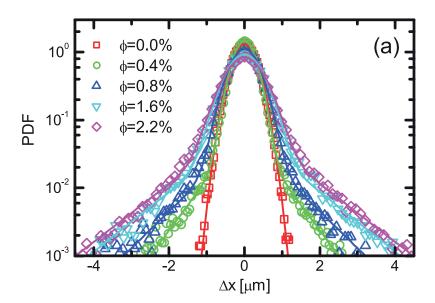


FIGURE 1.12 – Densité de probabilité de déplacement de traceurs inertes dans une suspension de bactéries *Chlamydomonas reinhardtii*. L'intervalle de temps considéré ici est Δt =0.12 s. Chaque couleur indique une densité de bactéries en suspension différente, de 0% (rouge) à 2.2% (violet). Image extraite de [Leptos et al., 2009].

Une diffusion "anormale" émerge également lorsque les particules considérées ne peuvent plus se déplacer librement. C'est par exemple le cas de particules diffusant dans des matériaux proches de la transition vitreuse [Weeks et al., 2000, Chaudhuri et al., 2007]. Dans ce cas, les particules environnantes créent des "cages" qui contraignent le libre mouvement de la particule étudiée. Celle-ci peut néanmoins s'en échapper de temps en temps, ce qui résulte en de soudains grands déplacements. Les probabilités de déplacement associées ne sont plus Gaussiennes, comme l'indique la figure 1.13.

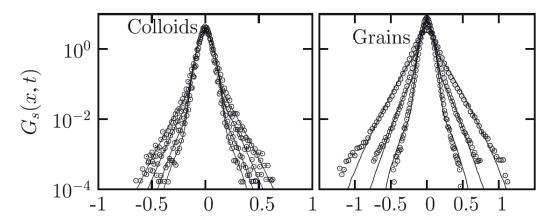


FIGURE 1.13 – Densité de probabilité de déplacement de colloïdes (à gauche) ou de grains (à droite), pour différents instants. La largeur des distributions augmente avec le temps. Image extraite de [Chaudhuri et al., 2007].

Des expériences réalisées sur des sphères dures se déplaçant sur des réseaux complexes ont mis en évidence une diffusion normale ($\alpha = 1$), mais avec des probabilités

de déplacement non Gaussiennes [Wang et al., 2009, Wang et al., 2012] à cause des contraintes géométriques du milieu. De nombreux modèles théoriques ont été développés pour caractériser la diversité des résultats expérimentaux. Les plus connus sont la marche aléatoire à temps continu (CTRW), le mouvement Brownien fractionné, les vols de Lévy ou les marches de Lévy [Bénichou et al., 2011, Bouchaud and Georges, 1990, Klafter et al., 1996].

Le modèle CTRW décrit le mouvement d'une particule qui reste pendant un temps d'attente τ sur sa position, puis réalise un saut instantané de longueur l dans une direction aléatoire. Elle restera de nouveau immobile pendant un certain temps sur son site d'arrivée, avant de procéder à un nouveau saut instantané. Les temps d'attente sont tirés dans une distribution $\psi(\tau)$, et les longueurs de saut dans une distribution p(l). Ces distributions pilotent les propriétés diffusives du modèle.

Si on note $P_n(x)$ la probabilité pour une particule de se trouver à la position x après n sauts et $\chi_n(t)$ la probabilité d'avoir fait exactement n sauts à l'instant t, la probabilité totale de se trouver en x à l'instant t peut s'écrire en sommant sur tous les nombres n possibles [Klafter and Sokolov, 2011] :

$$P(x,t) = \sum_{n=0}^{\infty} P_n(x)\chi_n(t)$$
(1.18)

Le terme $\chi_n(t)$ peut s'écrire comme la somme sur tous les instants possibles de la probabilité $\psi_n(\tau)$ que le $n^{i \`eme}$ saut arrive à l'instant τ multipliée par la probabilité $\Psi(t-\tau)=1-\int_0^{t-\tau}\psi(t')\,\mathrm{d}t'$ que la particule ne fasse aucun nouveau saut pendant l'intervalle de temps $t-\tau$:

$$\chi_n(t) = \int_0^t \psi_n(\tau) \Psi(t - \tau) d\tau$$
 (1.19)

L'équation 1.19 peut s'écrire dans le domaine de Laplace, en remarquant que la transformée de Laplace de ψ correspond à la fonction génératrice des moments de ψ :

$$\chi_n(s) = \psi^n(s) \frac{1 - \psi(s)}{s} \tag{1.20}$$

Avec la même démarche, la probabilité $P_n(x)$ peut s'écrire comme la somme sur toutes les positions de la probabilité $P_{n-1}(y)$ de se trouver à la position y après n-1 sauts multipliée par la probabilité p(x-y) que le saut suivant soit de longueur algébrique (x-y):

$$P_n(x) = \int_{-\infty}^{\infty} P_{n-1}(y)p(x-y) \, dy$$
 (1.21)

En notant $\lambda(k)$ la transformée de Fourier de p(l), qui est aussi sa fonction caractéristique, on obtient dans le domaine de Fourier :

$$P_n(k) = P_{n-1}(k)\lambda(k) \tag{1.22}$$

Cette formule étant valable pour tout n, si on remplace successivement pour chaque i = n - 1, n - 2...1, sa valeur obtenue par l'équation 1.22 on obtient finalement :

$$P_n(k) = \lambda^n(k) \tag{1.23}$$

En passant l'équation 1.18 dans les domaines de Fourier et Laplace, et en utilisant les équations 1.20 et 1.23, on obtient alors :

$$P(k,s) = \sum_{n=0}^{\infty} P_n(k)\chi_n(s) = \frac{1 - \psi(s)}{s} \sum_{n=0}^{\infty} \lambda^n(k)\psi^n(s)$$
 (1.24)

En remarquant que le terme de droite correspond à la somme de termes d'une suite géométrique :

$$P(k,s) = \frac{1 - \psi(s)}{s} \frac{1}{1 - \lambda(k)\psi(s)}$$
 (1.25)

Ce résultat est connu sous le nom de formule de Montroll-Weiss [Montroll and Weiss, 1965], et constitue le résultat majeur de l'approche CTRW qui transforme les nombres de "pas" discret en un temps. Le modèle CTRW est donc bien défini, sous condition d'existence des fonctions génératrices des moments de ψ et de fonction génératrice de l. Cependant, ce n'est pas toujours le cas.

Si $\psi(\tau)$ admet un premier moment et p(l) un second moment, alors une diffusion normale est obtenue, mais suivant la forme de ces distributions les probabilités de déplacement ne sont pas forcément Gaussiennes [Klafter and Sokolov, 2011]. En revanche, si la distribution du temps d'attente a une queue longue, comme la loi puissance suivante :

$$\psi(\tau) \sim \frac{1}{\tau^{1+\beta}} \tag{1.26}$$

alors dans le cas $\beta < 1$, on obtient une sous-diffusion avec un exposant $\alpha = \beta$. Dans tous les cas, l'écart quadratique moyen évolue proportionnellement au nombre moyen de sauts réalisés jusqu'à l'instant considéré $\langle n(t) \rangle$:

$$\langle X^2(t)\rangle = \langle l^2\rangle\langle n(t)\rangle$$
 (1.27)

Les études expérimentales mentionnées dans cette partie montrent que la diffusion de particules inertes peut être complexe, par exemple lorsqu'elle est contrainte par le milieu environnant ou que l'énergie nécessaire au déplacement n'est plus d'origine thermique. On a vu notamment comment une suspension active pouvait modifier le comportement de traceurs inertes. Le déplacement des particules actives elles-même n'est donc pas trivial, et continue de faire l'objet de nombreuses études et discussions.

1.3.3 Diffusion de systèmes actifs

Les premières études sur la motilité d'organismes actifs (en l'occurrence des bactéries Escherichia coli) ont fait état de l'existence d'une motilité intermittente [Berg and Brown, 1972]: le mouvement est divisé en périodes de mouvements rapides appelés "runs" et en périodes de mouvements localisés appelés "tumbles". Les premiers servent au déplacement des micro-organismes, les deuxièmes à leur réorientation dans le domaine d'étude. De plus, le mouvement pendant les "runs" n'est pas aléatoire car les bactéries semblent se déplacer selon une direction précise.

L'étude du mouvement de la micro-algue Chlamydomonas reinhardtii a mis en évidence l'existence d'une échelle τ_p de temps en-dessous de laquelle le mouvement était balistique $(\alpha=2)$, avant qu'une diffusion normale soit retrouvée à temps long [Rafaï et al., 2010, Garcia et al., 2010]. Ce résultat rappelle la diffusion de microbilles dans un bain de bactéries Escherichia coli [Wu and Libchaber, 2000] mentionné dans la partie précédente. La phase de mouvement balistique corrobore l'existence d'une corrélation dans les déplacements aux temps courts, corrélation qui disparaît au bout du temps τ_p , les trajectoires à temps longs se ramenant à une diffusion normale.

Dans le cas de la "twitching motility", on l'a vu, le mouvement est généré par la rétractation de pili de type IV. La figure 1.14 montre une trajectoire typique d'une bactérie *Neisseria gonorrhoeae*. Pendant certaines périodes, la bactérie se déplace en ligne droite, tandis que pendant d'autres périodes, elle reste confinée autour d'une position fixe.

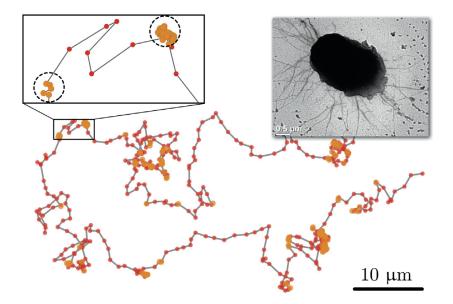


FIGURE 1.14 – Trajectoire typique d'une bactérie Neisseria gonorrhoeae dont les positions sont enregistrées toutes les secondes. Les périodes de faible motilité sont en orange, les périodes de haute motilité en rouge. Encart : Microscopie électronique en transmission d'une Neisseria gonorrhoeae avec ses pili de type IV. Image extraite de [Zaburdaev et al., 2014].

Une telle motilité intermittente se retrouve chez de nombreux animaux [Dieterich et al., 2008, Ginelli et al., 2015, Viswanathan et al., 1996] ³. La modélisation de ces mouvements complexes ne se fait plus avec des marches aléatoires classiques, mais avec des modèles plus complexes comme les marches de Lévy ou vols de Lévy, qui permettent de décrire des périodes de déplacements localisés suivis de grands déplacements. Ces mouvements intermittents pourraient traduire une stratégie de recherche de nourriture optimale [Bénichou et al., 2011] où les animaux changent de zone de recherche par des grands déplacements.

1.3.4 Diffusion anisotrope

Si l'optimisation de la stratégie de recherche permet de mieux interpréter l'abondance de l'intermittence, il reste que le mouvement des organismes vivants est aussi fortement influencé par les conditions dans lesquelles ils évoluent. Ils ont par exemple un intérêt à se déplacer vers les zones les plus favorables à leur survie s'ils détectent qu'une zone est meilleure qu'une autre. Plusieurs sources à ces mouvements anisotropes appelées "taxies" ont été mises en évidence, cette partie liste celles qui nous intéressent dans le cadre de cette thèse.

Chimiotaxie

L'un des exemples les plus connus est celui de la chimiotaxie : les bactéries sont attirées dans les zones de forte concentration en nutriments, et ont tendance à s'éloigner des zones contenant des substances toxiques. L'une des premières études sur la bactérie Escherichia coli indique que les bactéries font des "runs" plus longs dans le sens du gradient de concentration en nutriment [Berg and Brown, 1972]. Une autre étude expérimentale [Segall et al., 1986] s'est attachée à caractériser la réponse de ces bactéries à des échelons ou des impulsions de concentration de nutriments. Pour cela, les bactéries sont attachées à un substrat, et on analyse les mouvements de rotation de leurs flagelles laissés libres. La figure 1.15 reproduit les résultats expérimentaux de cette expérience : la probabilité que les flagelles tournent dans le sens trigonométrique (et génèrent un "run") augmente peu après l'injection de nutriments, avant de revenir au niveau initial. La courbe expérimentale est retrouvée après intégration de la réponse à une impulsion de nutriments.

Ces résultats s'inscrivent dans la théorie de la réponse linéaire, qui prédit que la sortie S(t) d'un système contraint par une entrée F(t) peut s'écrire comme le produit de convolution de cette entrée par une certaine fonction réponse R(t), selon l'équation suivante :

$$S(t) = \int_{-\infty}^{t} R(t - t') F(t') dt$$
(1.28)

^{3.} Cette dernière étude a d'ailleurs suscité une controverse scientifique sur la modélisation des données expérimentales [Edwards et al., 2007].

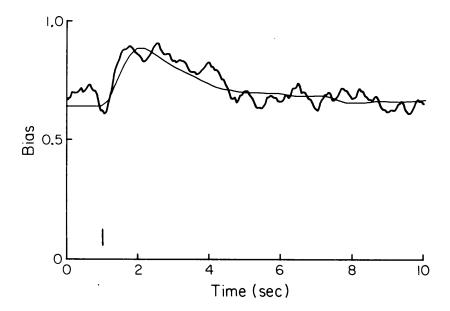


FIGURE 1.15 – Probabilité que les flagelles d'*Escherichia coli* tournent dans le sens trigonométrique après un échelon de concentration en nutriment, en fonction du temps (trait épais). La barre verticale indique l'injection de nutriments. Le trait fin indique l'intégration de la réponse à une impulsion de concentration en nutriments. Image extraite de [Segall et al., 1986].

L'écriture de l'équation 1.28 implique de nombreuses propriétés pour le système, comme la linéarité, la stationnarité et la causalité. [De Gennes, 2004] a proposé ce cadre pour l'étude de la réponse chimiotactique d'un système bactérien. Cela a abouti à l'obtention de diverses propositions pour la fonction réponse [Clark and Grant, 2005, Celani and Vergassola, 2010] qui se superposent aux données expérimentales de [Segall et al., 1986], comme par exemple :

$$R(t) = A\lambda e^{-\lambda t} (\lambda t - (\lambda t)^2 / 2)$$
(1.29)

Dans cette équation, A est un paramètre d'amplitude arbitraire, et λ est inversement proportionnel au temps de run moyen en l'absence de flux de nutriments.

Durotaxie

Outre les flux de composés chimiques, le déplacement de micro-organismes peut être affecté par la dureté de la surface sur laquelle ils évoluent et ainsi migrer vers les zones les plus dures du substrat [Lo et al., 2000, Raab et al., 2012, Missirlis and Spatz, 2014]. Ce phénomène, encore peu étudié, s'appelle la durotaxie.

La relation entre dureté du substrat et vitesse de déplacement est parfois ambiguë, mais il est admis qu'il existe une persistance du déplacement plus longue sur les surfaces dures [Novikova et al., 2017]. La durée de persistance est définie comme le temps τ_p

séparant un régime balistique ($\alpha = 2$) d'un régime de diffusion normale ($\alpha = 1$), comme renseigné dans la partie 1.3.3. Il semble que la durotaxie n'émerge pas directement d'un mouvement dans la direction du gradient de dureté, mais qu'elle est plutôt la conséquence d'une durée de persistance plus longue sur les substrats durs, ce qui crée un biais dans la marche aléatoire.

Phototaxie

En revanche, un autre biais bien connu chez les organismes photosynthétiques est leur propension à se déplacer suivant la direction d'une source de lumière. La phototaxie est dite positive si le déplacement s'effectue vers la direction de la source, et négative sinon. Ce phénomène a été observé chez la *Synechocystis* il y a une vingtaine d'années [Choi et al., 1999]. La réponse des cyanobactéries à la lumière dépend de l'intensité et de la longueur d'onde de la stimulation [Mullineaux, 2001, Chau et al., 2017]; néanmoins la caractérisation complète du génome de *Synechocystis* a permis l'identification de gènes photorécepteurs [Yoshihara and Ikeuchi, 2004, Chau et al., 2015].

La membrane des cellules pourrait faire office de lentille et inhiber ainsi la formation de pili à l'aval de la source lumineuse. Il en résulte un mouvement vers la source, comme les pili restant tirent la cellule dans cette direction [Schuergers et al., 2016]. En tout cas, des observations directes des pili montrent qu'un flux lumineux directionnel induit une distribution spatiale asymétrique des pili [Nakane and Nishizaka, 2017].

Les déplacements de *Synechocystis* sous un flux lumineux peuvent donner lieux à des instabilités de digitation [Ursell et al., 2013], qui sont présentées en figure 1.16. Les bactéries créent des projections qui ressemblent à des doigts dans la direction de la lumière. Ces résultats indiquent également que l'émergence de cette instabilité dépend de la densité initiale de bactéries, et suggèrent que les bactéries peuvent influencer de manière endogène la motilité de leurs voisines.

1.3.5 Effets collectifs sur la dynamique diffusive

Lorsque la densité de particules actives est suffisamment élevée pour permettre l'interaction entre voisins, des études expérimentales ont montré l'émergence de structures cohérentes, au sein desquelles les mouvements des particules sont corrélés [Dombrowski et al., 2004, Gachelin et al., 2014]. Des zones de grands déplacements sont séparées par des "tourbillons" où les vitesses sont faibles. Par analogie avec la mécanique des fluides, ce phénomène est appelé "bio-turbulence". Il souligne la capacité des micro-organismes à s'associer dès qu'ils sont suffisamment proches.

Mais même en régime dilué des interactions peuvent exister. Par exemple, les traces composées d'exopolysaccharides (EPS) laissées par les cellules motiles influencent le com-

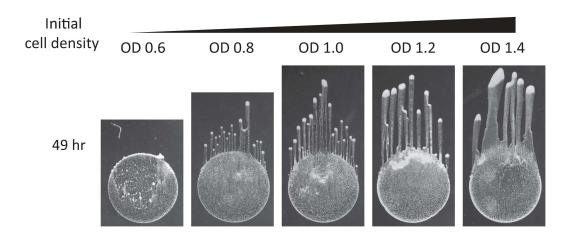


FIGURE 1.16 – Instabilité de digitation observée après 49h d'éclairage unidimensionnel d'une goutte de 2mm de suspension de *Synechocystis* sur de l'agar. Les résultats sont donnés pour plusieurs densités optiques (OD) initiales, de la solution la moins concentrée à la plus concentrée. Image extrait de [Ursell et al., 2013].

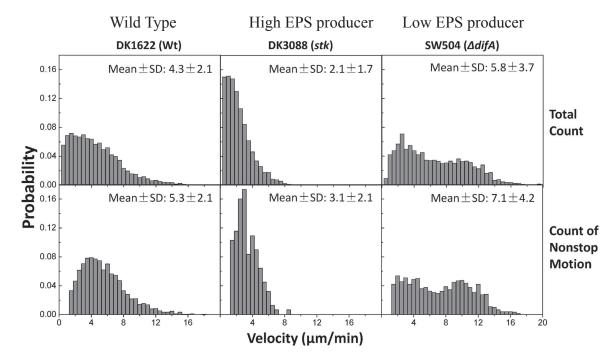


FIGURE 1.17 – Densité de probabilité des vitesses de différentes souches de Myxococcus xanthus, qui possèdent différentes propriétés de production d'EPS. Les vitesses ont été prises en Bande supérieure : histogrammes totaux. Bande inférieure : histogrammes en ayant exclu les vitesses inférieures à 1 μ m.min⁻¹. Image extraite de [Hu et al., 2016].

portement moyen du système, comme l'indique la figure 1.17 extraite de l'étude [Hu et al., 2016]. Ces résultats portant sur la souche *Myxococcus xanthus* indiquent que la distribution des probabilités de vitesse est modifiée suivant la capacité des bactéries à produire

des EPS : ceux-ci limitent la vitesse de déplacement des bactéries.

Une autre article a étudié la dynamique de *Pseudomonas aerigunosa* en quantifiant la manière dont les bactéries explorent leur environnement par le nombre de visites par unité de surface. Les distributions correspondantes, pour différents taux de production d'EPS, sont données en figure 1.18. Elles sont modélisées par des lois puissances dont les exposants reflètent les tendances : un exposant très négatif indique un comportement plus "égalitaire", tandis qu'un exposant tendant vers 0 indique un comportement "hiérarchique" . Les résultats de cette étude montrent que plus la production d'EPS est importante, plus les cellules ont tendance à s'accumuler dans les zones riches en EPS. Cette accumulation est aussi l'une des étapes vers l'organisation des bactéries en microcolonies, et la formation de structures plus complexes comme les biofilms.

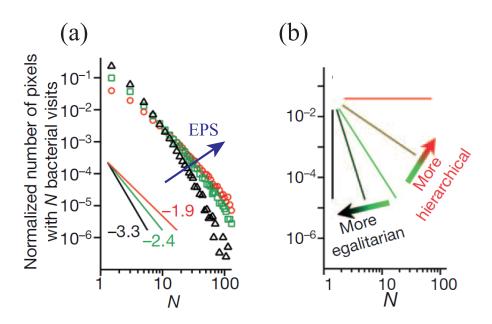


FIGURE 1.18 – (a) Distribution de probabilité du nombre de visites par unité de surface, pour des bactéries *Pseudomonas aerigunosa*. Les symboles noirs, verts et rouges indiquent des quantités croissantes d'EPS relâchés, comme indiqué par la flèche bleue. (b) Schéma représentatif de l'interprétation des résultats expérimentaux : une pente forte correspond à un comportement plus égalitaire, tandis qu'une pente tendant vers l'horizontale indique un comportement plus hiérarchique. Image extraite de [Zhao et al., 2013].

1.4 Colonisation de surface

1.4.1 Les biofilms : un ancien mode de survie

La capacité de bactéries à se rassembler en biofilms remonte aux origines de la vie sur terre, comme l'indique la découverte d'un stromatolithe ⁴ de 3,7 milliards d'années [Nutman et al., 2016]. Cette forme d'organisation se retrouve aussi chez les archées, mais aussi avec des formes cellulaires plus sophistiquées comme les champignons [Fanning and Mitchell, 2012] et les micro-algues [Leadbeater and Callow, 1992].

Au sein du biofilm, les bactéries sont entourées d'une matrice qu'elles produisent ellesmêmes, constituée notamment d'EPS, de protéines, et d'ADN. Cette matrice joue le rôle d'agent protecteur face aux conditions extérieures, et semble également faciliter la communication inter-cellulaire ("quorum sensing") [Solano et al., 2014]. La structure complète du biofilm dépend de la topologie de la surface, de sa composition chimique, et du transport de matière en son sein [Mazza, 2016].

Si la résistance aux agressions extérieures est bénéfique du point de vue des cellules, elle est problématique dans de nombreux domaines. L'un des exemples les plus connus est le "biofouling", ou l'accumulation de divers organismes sur les surfaces immergées (figure 1.19(a)), étudié depuis près d'un demi-siècle [Marshall et al., 1971]. En milieu médical, de nombreuses pathologies sont dues à des proliférations bactériennes sous forme de biofilm, comme les infections nosocomiales causées par la *Staphylococcus aureus* (figure 1.19(b)). Ici, le biofilm empêche les traitements d'agir sur les cellules pathogènes. D'autre part, la contamination des produits est toujours problématique dans l'industrie agro-alimentaire, comme l'illustre la figure 1.19(c). Enfin, dans le contexte de la production d'énergies renouvelables, les biofilms interviennent encore à la surface des photobioréacteurs, comme l'indique la figure 1.19(d). Ils pénalisent alors le rendement de l'ensemble du système, en empêchant l'homogénéisation de l'énergie solaire dans le volume fluide. Ce phénomène est notamment problématique pour les applications potentielles reposant sur l'exploitation des substances extracellulaires produites par les *Symechocystis*.

1.4.2 Mécanismes de formation d'un biofilm

Afin de lutter contre la formation de biofilms, il est nécessaire d'en connaître les étapes. Celles-ci sont résumées en figure 1.20. On retrouve notamment :

- Le transport des cellules vers les surfaces. Cela peut se réaliser par un processus de sédimentation dans le cas de surfaces horizontales, ou bien par des courants fluides.
- L'adhésion des cellules sur la surface, puis leur motilité qui leur permet d'analyser leur environnement.

^{4.} Fossiles composés de minéraux captés par des couches d'organismes vivants recouvrant la surface d'une roche

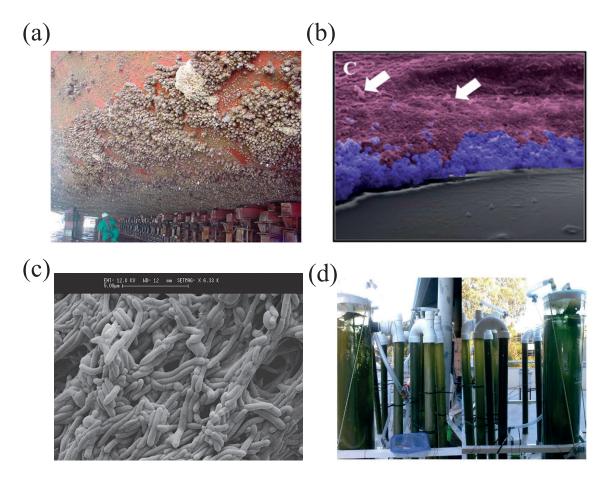


FIGURE 1.19 — Exemples de développement problématique de biofilm. (a) Biofouling sur des coques de bateaux [Callow and Callow, 2011]. (b) Biofilm de *Staphylococcus aureus* (en bleu) entre un cathéter (en gris) et le tissu hôte (en violet). Les flèches indiquent des cellules hôtes éloignées du cathéter [Thurlow et al., 2011]. (c) Biofilm de *Bacillus cereus* sur un tuyau en acier inoxydable, dans l'industrie alimentaire [Simões et al., 2010]. (d) Résidu de micro-algues (*Chlorella vulgaris*) sur les parois de photobioréacteurs après avoir extrait leur contenu [Burns, 2012].

- L'agrégation des cellules entre elles, qui peut se faire par "quorum sensing" ou par liaison via des appendices, notamment les pili de type IV. Les résultats présentés en partie 1.3.5 suggèrent aussi que la transition de la phase de motilité à la phase d'agrégation peut être influencée par la sécrétion d'EPS.
- La croissance du biofilm, où intervient notamment la reproduction des cellules, le plus souvent par division cellulaire. Une structure en trois dimensions émerge.
- La dispersion du biofilm, une fois que l'agrégat a atteint une taille critique, les cellules de la couche supérieure sont relarguées dans le volume, et atteignent une nouvelle zone de la surface.

La manière dont les cellules adhèrent à la surface et s'attachent les unes aux autres constitue ainsi une étape importante dans la compréhension de la formation du biofilm.

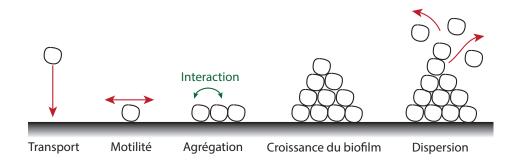


FIGURE 1.20 – Schéma de principe des différentes étapes de la formation d'un biofilm sur une surface.

Les cellules se comporteraient comme des particules passives, qui interagiraient avec les surfaces via des forces de Van der Waals. Une revue liste les différents modèles d'adhésion possibles [Schwarz and Safran, 2013]. La force d'adhésion dépend alors de la surface de contact entre la bactérie et le substrat. Cette aire de contact peut être calculée avec le modèle JKR [Johnson et al., 1971], dont il semble qu'il peut s'appliquer à l'adhésion intercellulaire [Chu et al., 2005].

Une autre manière d'envisager l'adhésion cellulaire est un mécanisme de liaison chimique. Celui-ci a donné naissance à un modèle [Bell, 1978] liant la probabilité de rupture d'une liaison chimique à la force appliquée sur cette liaison. Ce modèle a été appliqué avec succès à la modélisation des liaisons entre des pili et une surface [Björnham and Axner, 2010]. Cette étude a reproduit la non-linéarité de la relation entre la déformation du pili et la force générée, décrit en figure 1.10, page 27.

Dans le cas de la *Synechocystis*, il semble que les pili sont impliqués dans l'adhésion cellulaire [Bhaya et al., 2000], traduisant un mécanisme d'adhésion actif. Ce mécanisme peut être renforcé par la présence d'EPS, qui eux aussi semblent favoriser l'adhésion des cellules au substrat [Ma et al., 2006]. La figure 1.21 présente des résultats récents de [Hu et al., 2016] qui reportent une forte corrélation entre l'adhésion et la production d'EPS. Cette augmentation de l'adhésion cellulaire peut provenir du fait que les EPS favorisent la communication inter-cellulaire [Limoli et al., 2015], et empêchent les cellules d'effectuer de grands déplacements, comme déjà souligné en partie 1.3.5.

Aussi, l'adhésion à la surface est complétée par l'adhésion des cellules entre elles, pour former des amas agrégés. Ces interactions sont rappelées par la flèche verte en figure 1.20. Des études récentes de formation de micro-colonies [Weber et al., 2015, Taktikos et al., 2015, Bonazzi et al., 2018] proposent une modélisation basée sur l'interaction entre cellules via les pili. Cette interaction peut se produire lorsque la distance séparant deux bactéries est inférieure à une certaine distance d'interaction. Comme ces appendices sont souvent plus grands que la taille d'une cellule, les distances d'interaction sont supérieures au

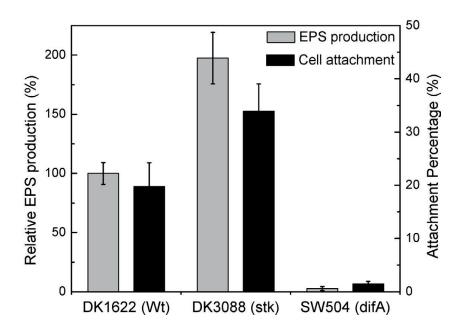


FIGURE 1.21 – Lien entre production d'EPS et adhésion pour différentes souches de la bactérie *Myxococcus xanthus*. Image extraite de [Hu et al., 2016].

diamètre cellulaire.

1.4.3 Rôle de la dureté du substrat

Parmi les propriétés physiques influençant la formation d'un biofilm, on peut citer la charge de surface, l'énergie de surface, la rugosité [Song et al., 2015]. Pour des bactéries Bacillus circulans croissant sur de l'agar, la morphologie de la colonie a été caractérisée suivant deux paramètres principaux : la quantité de nutriments disponibles, et la dureté du substrat d'agar [Eiha et al., 2002].

En ce qui concerne la dureté du substrat, l'un des premiers articles sur le sujet [Bakker et al., 2003] suggère que la bactérie marine *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* adhère plus sur un substrat plus rigide. Des conclusions similaires ont été obtenues ensuite avec d'autres micro-organismes [Lichter et al., 2008, Pozos Vazquez et al., 2009, Kolewe et al., 2015]. L'une des explications possibles pourrait être l'augmentation de la résistance mécanique du substrat à la force développée pour le déplacement, ce qui augmenterait la durée de la liaison cellule/substrat [Lichter et al., 2008].

Mais d'autres travaux récents viennent néanmoins nuancer cette conclusion : si la souche *Pseudoalteromonas* sp. D41 adhère plus aux surfaces dures, la souche *Bacillus* sp. 4J6 forme au contraire des micro-colonies plus importantes sur les substrats les plus mous [Guégan et al., 2014]. Le même résultat a été observé avec des colonies d'*Escherichia coli* [Saha et al., 2013]. Des expériences récentes réalisées avec cette même souche et

des *Pseudomonas aeruginosa* sur du polydiméthylsiloxane (PDMS) indiquent également une présence plus forte d'agrégats sur les surfaces molles [Song and Ren, 2014]. Ces observations pourraient s'expliquer par la déformation plus grande du substrat sur les surfaces molles, qui engendrerait une augmentation de la surface de contact bactérie/substrat, et ainsi augmenter la force d'adhésion.

En conclusion, aucune tendance nette n'émerge entre la rigidité du substrat et la formation d'un biofilm. Et si l'influence de la dureté du substrat sur la motilité a également été notée [Zhang et al., 2014, Novikova et al., 2017], il n'existe pas à notre connaissance de modèle complet reliant cette dureté, la motilité, et la dynamique de formation du biofilm. La recherche de corrélations entre ces grandeurs est l'un des objets de cette thèse.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Les mesures expérimentales utilisées dans les différents chapitres de cette thèse présentent certains éléments communs décrits ici. Les méthodes plus spécifiques sont détaillées avec les résultats, au moment où elles sont nécessaires.

2.1 Culture des bactéries

La souche sauvage (WT) de la cyanobactérie Synechocystis sp. PCC6803 a été obtenue à l'Institut Pasteur. Les cellules ont été cultivées dans le milieu BG11 standard, dont la composition est donnée dans le tableau 2.1, en mélangeant 3 mL de solution mère avec 47 mL de milieu de culture. Les suspensions sont agitées par un agitateur magnétique tournant à 360 tours par minute, dans une chambre à 20°C. Elles sont placées sous une lumière blanche de 1.3 W.m⁻² pendant sept jours, puis privées de lumière pendant 24 heures, et enfin de nouveau remises sous les mêmes conditions d'éclairage pendant deux heures avant chaque expérience. Les cyanobactéries sont alors en phase de croissance exponentielle. Le protocole d'alternance des conditions d'éclairage permet d'homogénéiser le comportement des bactéries, en réinitialisant leur horloge interne [Straub et al., 2011], et ainsi d'obtenir davantage de bactéries motiles. Les suspensions sont ensuite diluées entre 2 et 20 fois dans du milieu de culture avant introduction dans la cellule de mesure.

La lumière utilisée pour la culture provient de tubes de lumière blanche fluorescente (2700 K), d'une puissance de 6 W. Les intensités lumineuses sont mesurées avec un luxmètre LX1010B. À moins que cela ne soit précisé, les expériences ont été réalisées avec la souche sauvage. Des souches mutantes, décrites en partie 3.4.2, sont également utilisées.

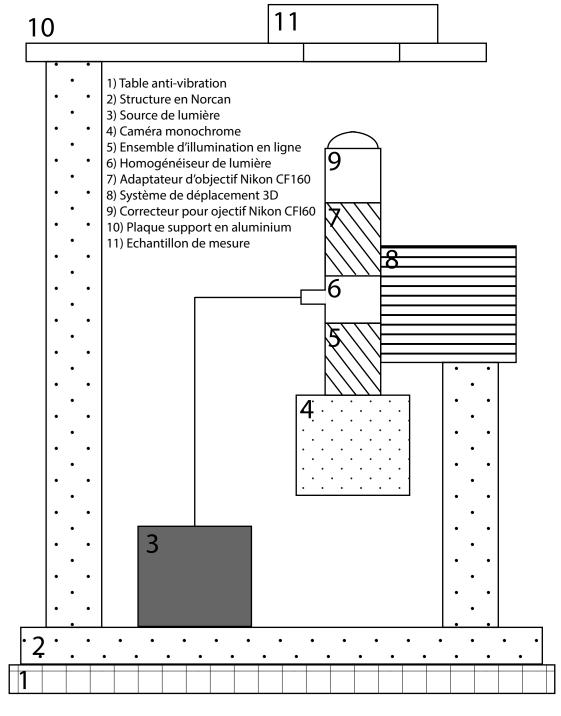


FIGURE 2.1 — Dispositif expérimental permettant l'enregistrement de la dynamique diffusive des cyanobactéries.

| Solution de BG11 | | Préparation des solutés | | Solution Finale | |
|---------------------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------|------------------|
| Solution | Masse molaire (g/mole) | $C_i \text{ (mM)}$ | Masse $(g/50 \text{ mL})$ | $C_f \text{ (mM)}$ | ml Stock soution |
| $NaN0_3$ | 85 | 3530 | 15 | 18 | 5 |
| K_2HPO_4 | 174 | 35 | 0.3 | 0.18 | 5 |
| $MgSO_4$, $7 H_2O$ | 246 | 61 | 0.75 | 0.3 | 5 |
| CaCl ₂ , 2H ₂ O | 147 | 49 | 0.36 | 0.25 | 5 |
| Citric acid, 1 H ₂ O | 210 | 6 | 0.063 | 0.03 | 5 |
| EDTA, 2Na, 2H ₂ O | 372 | 0.47 | 0.009 | 0.0023 | 5 |
| Na_2CO_3 | 106 | 75 | 0.4 | 0.38 | 5 |
| $(NH_4)_2 Fe(SO_4)_2$, $6H_2O$ | 392 | 6 | 0.12 | 0.03 | 5 |
| Metal traces | | | | | 1 |

TABLEAU 2.1 – Concentration des différents minéraux nécessaires à la préparation du milieu de culture BG11

2.2 Cellule fermée

La figure 2.1 présente le dispositif expérimental complet utilisé pour enregistrer la dynamique diffusive des cyanobactéries. Celles-ci sont introduites dans une cellule de mesure, et observées en microscopie inverse par une caméra dont les détails sont donnés en partie 2.6. Un dispositif d'éclairage assure une illumination suffisante pour la prise de vidéos. Il est possible d'analyser différentes zones de l'échantillon grâce à système de déplacement en trois dimensions assuré par autant de vis de réglages. L'ensemble est relié par une structure en Norcan et posé sur une table anti-vibrations (Newport VIBe Mechanical Vibration Isolation Platform, 24 x 30 inches, 75-140 lbs) afin de limiter le bruit expérimental.

La cellule de mesure est constituée par une lame de microscope à cavité BRAND[®] (26×76 mm), dont une image est donnée en figure 2.2(a). Une goutte de suspension de bactéries est déposée dans cette cavité, qui est ensuite fermée par une lamelle (Menzel-Gläser, 22×22 mm) et scellée avec de la graisse à vide. La surface sur laquelle diffusent les bactéries est alors celle de la lamelle plane utilisée pour fermée la cellule. Un schéma de la fabrication de cette cellule est donné en figure 2.2(b).

La cohésion entre la lamelle de verre et la lame à cavité est assurée naturellement par capillarité. Néanmoins, l'utilisation de graisse à vide sur le périmètre de la lamelle permet de garantir l'absence d'évaporation et de convection qui perturberaient la motilité des bactéries. Ce protocole permet d'obtenir des déplacements isotropes dans l'étude de la diffusion libre des *Synechocystis*.

2.3 Canal micro-fluidique

Pour les expériences nécessitant la mise en place d'un flux convectif, les *Synechocystis* sont introduites dans un canal microfluidique Dolomite (figure 2.3). Ce système permet d'observer les mouvements de cellules vivantes dans un canal, tout en pouvant imposer

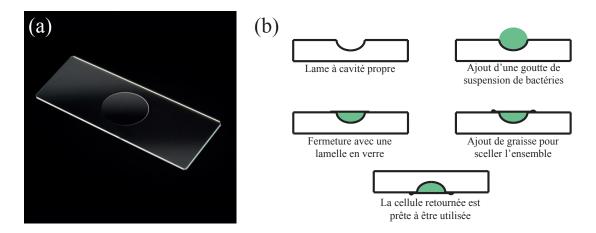


FIGURE 2.2 – (a) Image de la lame à cavité BRAND[®] utilisée pour former la cellule de mesure. (b) Schéma des différentes étapes de la construction d'un échantillon.

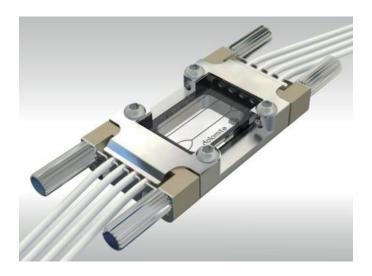


FIGURE 2.3 – Image du canal microfluidique en jonction Y Dolomite avec les interfaces et les connecteurs utilisés expérimentalement.

un gradient de pression dans le système. Ce gradient de pression génère alors un flux qui entraîne la suspension bactérienne. Les *Synechocystis*, dépourvues de flagelles, sont portées par le courant à la manière de particules inertes. Le système microfluidique n'est pas utilisé ici classiquement pour étudier l'influence d'un écoulement sur la motilité des cellules, mais pour renouveler la population bactérienne : on laisse diffuser les *Synechocystis* sur la surface du microcanal, puis on les enlève en imposant un flux qui les emporte, et enfin on stoppe le flux pour permettre à une nouvelle population de se déplacer librement sur la surface de diffusion des précédentes.

Le dispositif expérimental est décrit en figure 2.4. Un contrôleur de pression, commandé par ordinateur, permet d'injecter de l'air dans les sorties 1 ou 2. L'injection d'air dans la sortie 1 permet d'amener les bactéries au canal microfluidique. Une fois le canal atteint, la pression en sortie 1 est abaissée et une contre-pression est amenée par la sortie 2 pour

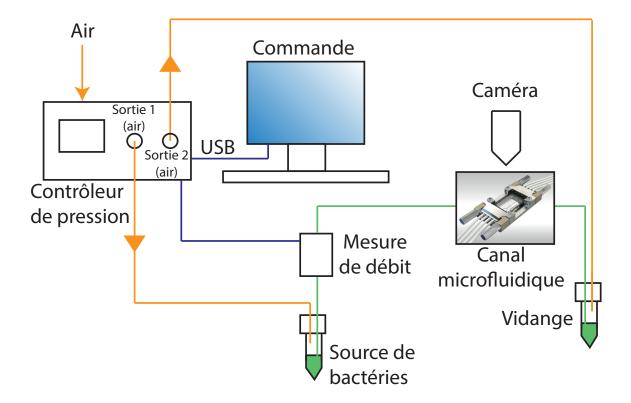


FIGURE 2.4 – Schéma du dispositif expérimental pour l'expérience en microfluidique. Les flux d'air sont en jaune, les flux de solution bactérienne en vert, et les flux d'information en bleu.

annuler le flux. Les trajectoires des bactéries sont enregistrées par une caméra CCD. Après une heure d'enregistrement, la pression en sortie 1 est de nouveau augmentée. Cela crée un flux emportant les bactéries présentes dans le canal micro-fluidique. Une fois que les bactéries initialement présentes sur la surface ont été enlevées, la pression en sortie 1 est de nouveau abaissée et le flux annulé en imposant une contre-pression en sortie 2. De nouvelles bactéries sédimentent sur la surface, et leurs déplacements sont enregistrés pour une nouvelle heure d'enregistrement.

2.4 Cellule ouverte

Les dispositifs décrits précédemment sont adaptés à l'observation de la dynamique des bactéries en régime dilué et pendant un temps inférieur au temps de division cellulaire. Afin d'étudier plus précisément la formation de micro-colonies et la croissance de biofilm, il est nécessaire de maintenir les *Synechocystis* dans les conditions de culture pendant l'observation. Cela implique de maintenir un éclairage adapté ainsi que la pérennité des échanges gazeux, et le dispositif d'acquisition d'images est donc inséré dans l'incubateur. Un schéma de l'installation est donné en figure 2.5. Le dispositif optique, la table anti-

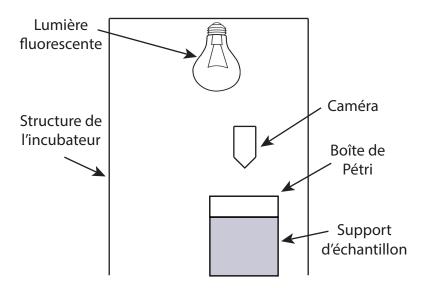


FIGURE 2.5 – Schéma du dispositif expérimental pour l'étude de croissance de biofilm.

vibration et le système de déplacement de la caméra sont les mêmes que ceux utilisés précédemment.

Le but de cette expérience est d'observer la formation d'un biofilm sur des surfaces de différentes natures : une surface de verre, et trois surface de polydiméthylsiloxane (PDMS) de différentes duretés. Le PDMS est un polymère organique siliconé, non toxique et biocompatible. Il est créé en faisant réagir une base et un agent réticulant (Sylgard 184). En changeant le ratio base/agent réticulant, on peut modifier les propriétés viscoélastiques du PDMS. Un ratio faible donnera un matériau principalement élastique, tandis qu'un ratio élevé conduira à un comportement plutôt visqueux [Murrell et al., 2011]. L'utilisation de PDMS différents permet de faire varier la rigidité du substrat sans changer la tension de surface. Les ratios utilisés ici sont 5 : 1, 10 : 1 et 25 : 1. Ils sont recensés dans le tableau 2.2, avec les différents volumes utilisés pour l'obtention d'une solution finale de 12 mL et les module d'Young obtenus dans la littérature [Wang et al., 2014].

| Ratio agent réticulant/base | Volume agent réticulant (mL) | Volume base (mL) | Module d'Young E (MPa) |
|-----------------------------|------------------------------|------------------|------------------------|
| PDMS 1:5 | 2 | 10 | 3.59 |
| PDMS 1:10 | 1.1 | 10.9 | 2.61 |
| PDMS 1:25 | 0.46 | 11.54 | 0.98 |

TABLEAU 2.2 – Récapitulatif des diverses surfaces de PDMS utilisées, avec les volumes d'agent réticulant et de base nécessaire pour l'obtention de 12 mL de solution finale. Les modules d'Young indiqués sont repris de [Wang et al., 2014].

Les solutions finales de 12 mL sont versées dans des boîte de Pétri puis laissées 48 heures à température ambiante pour laisser la réaction chimique s'opérer. Les préparations de PDMS obtenues font environ 3 mm d'épaisseur, et sont découpées en carrés de 22×22 mm avec un scalpel stérile. La surface en verre est une lamelle classique (Menzel-Gläser, 22×22 mm). Les quatre surfaces sont collées au fond de la boîte de Pétri avec une colle

siliconée. En raison de cette colle et de l'épaisseur des substrats, les cyanobactéries ne sont plus observées en microscopie inverse, mais en microscopie directe. Les échantillons sont mis en place 48 heures avant l'introduction de la solution bactérienne dans la boîte de Pétri afin de permettre l'évacuation des vapeurs de colle éventuelles. La boîte de Pétri est ensuite scellée avec du Parafilm[®] M pour éviter l'évaporation. Le couvercle de la boîte est percé d'un trou de 2 mm de diamètre pour permettre la respiration cellulaire. Ce trou peut entraîner la création d'un léger flux convectif lié à l'évaporation de la solution. Une photographie de la boîte de Pétri avec les différentes surfaces est donnée en figure 2.6.



FIGURE 2.6 – Photographie de la boîte de Pétri utilisée pour les expériences de colonisation.

2.5 Etude de la phototaxie

Afin d'étudier les propriétés phototactiques des *Synechocystis*, nous observons leur déplacement sous des conditions d'éclairement anisotropes. Le gradient de lumière est obtenu avec une LED Farnell (5 mm, 4000K, 4.7 cd), introduite dans un dispositif permettant de régler sa position et son orientation. L'acquisition d'images se fait avec la caméra décrite dans la partie 2.6. La figure 2.7 montre une image du dispositif expérimental utilisé pour ces expériences. Afin d'éviter les perturbations lumineuses, un cache est ajouté, de telle sorte que la lumière ne provienne que de la diode. Ce cache maximise l'éclairage dû à la diode par rapport à l'éclairage ambiant.



FIGURE 2.7 – Photographie du dispositif permettant l'étude du mouvement phototactique des *Synechocystis*, où le cache a été enlevé.

2.6 Acquisition et traitement d'images

La caméra utilisée dans toutes les expériences est une caméra monochrome (Edmund Optics) couplée à un objectif Nikon TU Plan 10X. Les vidéos sont enregistrées avec une résolution spatiale de $0.62~\mu m$, et une fréquence d'échantillonnage de 1 image par seconde. La taille typique d'une image est de $640~\times~512~\mu m$ ($800~\times~640$ pixels). Le contraste de chaque image est augmenté sous ImageJ, afin d'obtenir finalement des images binarisées où les bactéries apparaissent en blanc sur fond noir. Le processus de traitement d'images est résumé dans la figure 2.8.

L'analyse de la motilité des bactéries se fait avec les codes Matlab développés dans [Berg et al., 2004], qui permettent dans un premier temps de repérer sur chaque image du film les bactéries présentes, puis d'associer les images successives entre elles pour reconstruire les trajectoires. Chaque trajectoire est ainsi définie par ses positions successives en deux dimensions. Nous considérons comme non motiles les trajectoires qui ont parcouru moins de 3 μ m. À moins que l'inverse ne soit précisé, ces trajectoires sont retirées des analyses faites des résultats expérimentaux. Les méthodes de calcul des caractéristiques du déplacement (vitesse, MSD...) sont détaillées par la suite.

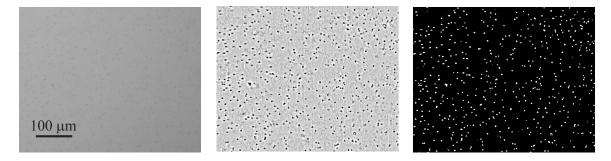


FIGURE 2.8 — Procédure de traitement d'images, avec une image typique de 800×640 pixels. L'image brute (à gauche) est importée dans ImageJ pour augmenter son contraste (image du centre). Cela permet de rendre visible les bactéries (en noir). La dernière étape correspond à une binarisation (à droite), qui permet un traitement des données plus rapide ensuite : les bactéries apparaissent en blanc sur fond noir.

Chapitre 3

Ralentissement de la dynamique diffusive

Bien que la présence de pili de type IV soit connue chez la *Synechocystis* (voir figure 1.7), et que la "twitching motility" correspondante (décrite en partie 1.2.2) ait déjà été observée [Nakane and Nishizaka, 2017], on ne connaît pas le type de diffusion associé au transport de ces bactéries. De plus, dans le cadre des applications potentielles de cette souche, son interaction avec les surfaces doit être mieux comprise.

L'intermittence de la motilité générée par la rétractation des pili de type IV a été mise en évidence expérimentalement [Zaburdaev et al., 2014], avec des périodes de mouvements directionnels et des périodes de mouvements localisés (figure 1.14). Dans le cas de la *Synechocystis*, le type de motilité est connu mais une analyse de l'intermittence éventuelle du mouvement reste à préciser, notamment sur les durées caractéristiques de chaque période. En menant cette analyse, nous avons constaté un ralentissement progressif de la dynamique des cellules. Ce chapitre a pour but de décrire la diffusion de surface de la *Synechocystis* ainsi que le mécanisme à l'origine de son ralentissement.

3.1 Sédimentation

Nous utilisons le dispositif expérimental décrit en figure 2.1. L'enregistrement des vidéos commence juste après l'introduction des Synecohcystis dans la cellule de mesure. Avec la sédimentation, le nombre N(t) de cyanobactéries détectées augmente avec le temps, jusqu'à ce qu'une valeur finale N_{∞} soit atteinte. En renormalisant N(t) par N_{∞} , les courbes expérimentales se superposent (figure 3.1). Le modèle empirique proposé en équation 3.1 permet de retrouver les courbes expérimentales.

$$N(t) = N_0 + (N_{\infty} - N_0)(1 - e^{-t/\tau_N})$$
(3.1)

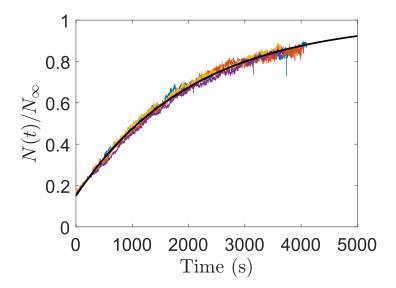


FIGURE 3.1 — Pour cinq expériences différentes, évolution temporelle du nombre de cyanobactéries détectées sur la surface divisé par le nombre final de cellules. Le trait noir correspond au fit empirique décrit par l'équation 3.1.

Dans l'équation précédentes $\tau_N=2081\pm4$ s est un temps caractéristique de la sédimentation et N_0 désigne le nombre initial de bactéries présentes à la surface. N_0 a été pris comme égal à $0.16\times N_\infty$, ce qui correspond aux valeurs moyennes des données expérimentales.

Cette valeur du temps caractéristique est cohérente avec la vitesse de Stokes typique d'un processus de sédimentation $v_S = \Delta \rho g V_p/6\pi \eta R$, où $\Delta \rho$ est le constraste de masse volumique entre le fluide et les bactéries, g est l'accélération de la gravité, V_p est le volume des cyanobactéries, R leur rayon et $\eta \approx 10^{-3}$ Pa.s la viscosité initiale de la suspension, précédemment mesurée par un capillaire horizontal. Avec $\Delta \rho = 100~kg.m^{-3}$ [Glaser and Higgins, 1989], $g = 9.81~\text{m.s}^{-2}$, $R = 1.5~\mu\text{m}$ et la hauteur de la cellule de mesure h = 1mm, on obtient $\tau_N \sim 2000~\text{s}$, proche du temps obtenu expérimentalement.

3.2 Ralentissement de la dynamique diffusive

L'écart quadratique moyen (voir partie 1.3.1) est ici calculé comme une moyenne d'ensemble et temporelle de tous les écarts quadratiques enregistrés. Si Δ est un intervalle de temps donné, N est le nombre de particules enregistrées, T_i la longueur de la trajectoire $i, X_i(t)$ la position de la particule i à l'instant t, alors le MSD est calculé de la manière suivante :

$$MSD(\Delta) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{T_i - \Delta} \sum_{t=1}^{T_i - \Delta} (X_i(t + \Delta) - X_i(t))^2$$
 (3.2)

Afin d'étudier l'évolution de la dynamique, nous définissons un MSD dépendant du temps, calculé sur des fenêtres temporelles centrées sur l'instant t pour différents intervalles de temps Δ :

$$MSD(t,\Delta) = \frac{1}{N_{\delta}} \sum_{i=1}^{N_{\delta}} \frac{1}{\delta - \Delta} \sum_{t'=t-\delta/2 + \Delta/2}^{t+\delta/2 - \Delta/2} \left(X_i(t' + \frac{\Delta}{2}) - X_i(t' - \frac{\Delta}{2}) \right)^2$$
(3.3)

Dans l'équation 3.3, δ est le temps séparant deux valeurs successives de t, et N_{δ} le nombre de particules détectées entre les instants $t - \delta/2 + \Delta/2$ et $t + \delta/2 - \Delta/2$.

La dynamique diffusive des Synechocystis est quantifiée en calculant l'équation 3.3 pour un intervalle de temps $10 \le \Delta \le 80$ s et un temps d'observation t couvrant toute la vidéo d'une heure par intervalle de δ =200 secondes. La figure 3.2(a) montre que pour chaque intervalle de temps t considéré, le MSD est linéaire en fonction de Δ , signe d'une diffusion normale. En utilisant l'équation 1.8, appliquée en deux dimensions, ce résultat permet de définir un coefficient de diffusion dépendant du temps D(t), calculé tel que :

$$MSD(t, \Delta) = 4D(t)\Delta \tag{3.4}$$

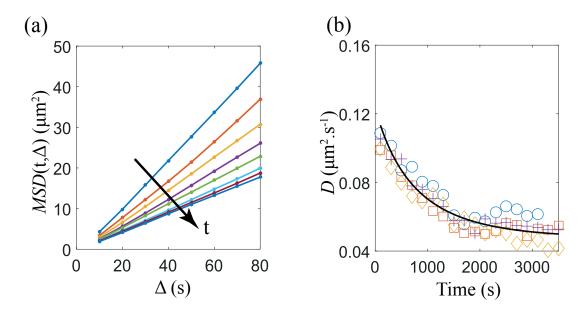


FIGURE 3.2 – (a) Écart quadratique moyen (MSD) tracé pour différents temps d'observation t allant de 100 à 2900 s par pas de 400 secondes. Le sens d'évolution de t est donné par la flèche. (b) Les symboles correspondent aux évolutions temporelles du coefficient de diffusion pour les expériences présentées en figure 3.1. Le trait noir correspond au fit décrit en partie 3.4.

Le coefficient de diffusion D(t) diminue pour toutes les expériences réalisées (Figure 3.2(b)), avant d'atteindre après environ 2500 secondes un plateau à $D_{\infty} \approx 0.053 \pm 0.006 \ \mu \text{m}^2.s^{-1}$. Cette valeur de plateau a été obtenue en moyennant une vingtaine d'expé-

riences réalisées dans les mêmes conditions d'éclairage, de température, et de préparation des cultures.

Ce ralentissement pourrait s'interpréter par l'émergence d'interactions stériques entre les bactéries, où la distance inter-particulaire serait inférieure au libre parcours moyen. Les expériences décrites précédemment ont été réalisées avec différentes concentrations finales de bactéries, ce qui nous permet d'avoir accès à chaque instant à la distance interparticulaire moyenne d. Pour chaque image de la vidéo, à chaque particule détectée est associée la distance à son plus proche voisin d_{ppv} , où "ppv" signifie "plus proche voisin". La distance inter-particulaire d(t) est calculée comme la moyenne sur toutes les images de la fenêtre temporelle considérée des distances au plus proche voisin :

$$d(t) = \frac{1}{\delta} \sum_{t'=t-\delta/2}^{t+\delta/2} \langle d_{ppv}(t') \rangle$$
(3.5)

Dans l'équation 3.5, $\langle d_{ppv}(t') \rangle$ est la moyenne des distance inter-particulaires d_{ppv} sur l'image correspondant à l'instant t' de la vidéo. La figure 3.3 présente les évolutions du coefficient de diffusion D en fonction de la distance inter-particulaire d calculée sur la même plage temporelle. La distance d diminue au cours du temps au fur et à mesure que de nouvelles bactéries arrivent sur la surface par sédimentation. Le coefficient de diffusion décroît avec la distance inter-particulaire, sans qu'une relation simple n'émerge entre ces deux grandeurs : on trouve notamment des coefficients de diffusion variant du simple au double pour une même distance inter-particulaire d.

Le diamètre moyen d'une Synechocystis, d'environ 3 μ m, est inférieur à la distance inter-particulaire minimale de 8 μ m, de telle sorte que les expériences sont enregistrées en régime dilué. La décroissance du coefficient de diffusion commence même pour des valeurs supérieures de d, autour de 15 μ m. Ces résultats suggèrent que les interactions stériques ne sont pas la cause du ralentissement de la dynamique.

Si la chute du coefficient de diffusion ne s'explique pas par des considérations géométriques, elle pourrait traduire un processus d'adaptation des cyanobactéries à leur surface de diffusion. Afin d'examiner les mécanismes qui pourraient décrire une telle évolution, nous nous intéressons aux détails de la dynamique, donc à la motilité individuelle des cyanobactéries.

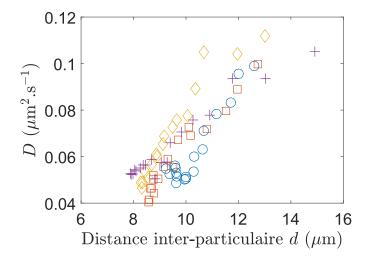


FIGURE 3.3 – Coefficient de diffusion D en fonction de la distance inter-particulaire moyenne d, pour les quatre expériences présentées en figure 3.2(b).

3.3 Diffusion intermittente

3.3.1 Une diffusion non-Gaussienne

Nous décrivons ici une expérience réalisée une heure après l'introduction des *Syne-chocystis* dans la cellule d'observation, c'est-à-dire une fois que le coefficient de diffusion décrit en figure 3.2(b) a atteint une valeur constante. Cela permet de caractériser en premier lieu la dynamique stationnaire des bactéries.

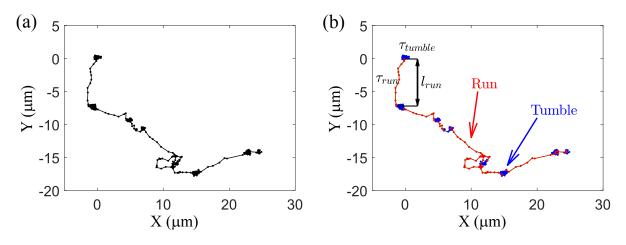


FIGURE 3.4 — Exemple d'une trajectoire expérimentale de 668 seconde, dont l'origine a été déplacée au point (0,0). (a) Trajectoire brute. (b) Trajectoire divisée en périodes de "runs" et de "tumbles", conformément à la procédure décrite en partie 3.3.2.

La figure 3.4(a) présente une trajectoire expérimentale typique de 668 secondes. Celleci fait apparaître des taches noires reliées entre elles par des lignes droites. Ces taches noires traduisent l'existence de périodes pendant lesquelles la bactérie se déplace peu. La trajectoire est donc divisée en périodes pendant lesquelles la bactérie oscille autour d'une position fixe, et en périodes pendant lesquelles elle se déplace en ligne droite. Autrement dit, le mouvement est intermittent, avec des phases de mouvement localisé (les "tumbles") et des phases de mouvement directionnel (les "runs").

Les probabilités de déplacement présentées en figure 3.5(a) semblent refléter cette intermittence, avec un changement de forme entre la partie centrale des distributions et leurs queues. Ces dernières deviennent plus larges lorsque l'intervalle de temps considéré pour calculer les distributions augmente, signe d'un mouvement diffusif. En revanche, la partie centrale reste la même quel que soit l'intervalle de temps considéré, ce qui traduit une composante non diffusive du mouvement. Il est également notable que les queues des distributions s'arrondissent et tendent vers des Gaussiennes à temps long.

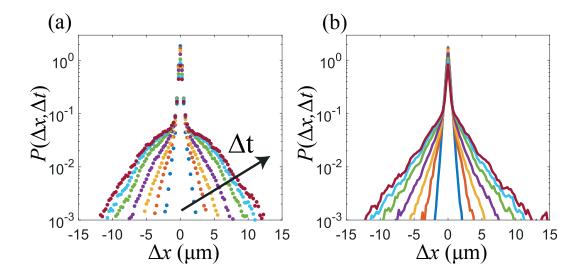


FIGURE 3.5 — Distributions des probabilités de déplacement suivant une direction, pour les instants $\Delta t = 2, 5, 10, 20, 40, 60$ et 80s. La flèche indique les temps croissants. (a) Résultats expérimentaux. (b) Résultats pour les simulations numériques (voir 3.3.3).

Ceci montre que nous observons une diffusion normale où l'évolution du déplacement quadratique moyen dépend linéairement de l'intervalle de temps, mais qui est associée à des densités de probabilité de déplacement sont non-Gaussiennes (figure 3.5). Elles traduisent une hétérogénéité dynamique observée dans de nombreux organismes vivants (voir en partie 1.3.3 pour une liste non exhaustive).

3.3.2 Séparation entre périodes de "runs" et périodes de "tumble"

L'étude de cette dynamique complexe nécessite de pouvoir distinguer les deux phases composant le mouvement. Cette distinction pourrait s'opérer sur la base d'un critère de vitesse. Cependant, les vitesses instantanées v, tracées sur la figure 3.6, sont bruitées, et il semble difficile de les établir comme base du critère. En remarquant que la différence entre "runs" et "tumbles" semble plutôt être la corrélation entre déplacements successifs, on calcule une vitesse V_{δ} moyennée sur un temps δ supérieur à la période d'échantillonnage :

$$V_{\delta}(t) = \frac{|X(t+\delta/2) - X(t-\delta/2)|}{\delta} \tag{3.6}$$

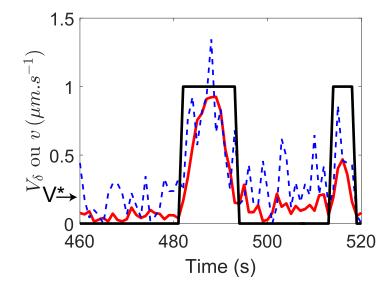


FIGURE 3.6 – Vitesse instantanée v (pointillés bleus), vitesse moyennée V_{δ} définie en équation 3.6 (trait rouge), pendant les instants 460 à 520 de la trajectorie tracée en figure 3.4. La ligne noire indique la sélection des périodes de "runs" expliquée dans le texte (mise à 1 quand un "run" est détecté, 0 ailleurs). La vitesse seuil V^* est indiquée par une flèche.

Cette fonction de "lissage", tracée sur la figure 3.6 avec $\delta=4$ s, présente des pics clairement distinguables correspondant à des "runs", séparés par des périodes de faible signal bruité. Les périodes de "runs" sont alors sélectionnées suivant deux critères concomitants : la vitesse V_{δ} doit être supérieure à une vitesse seuil V^* , et la distance parcourue pendant un "run" Δx doit être supérieure à une distance seuil Δx^* . Ce second critère est suggéré par les queues des PDF de la figure 3.5, qui présentent un épaulement à partir d'une certaine distance de l'ordre du micromètre. Enfin, les périodes de "runs" doivent être au moins égales à 2 secondes afin d'éviter de prendre en compte des "runs" qui pourraient être dus à des artefacts de repérage des bactéries. Une fois que les périodes de "run" sont détectées, le reste de la trajectoire est complété avec des périodes de "tumble".

Cette procédure permet de séparer chaque trajectoire en différentes périodes, et d'obtenir pour chacune d'elle leur durée τ_{run} ou τ_{tumble} , ainsi que pour les "runs" la distance parcourue l_{run} , et la vitesse moyenne pendant un "run", définie comme $V_m = \frac{l_{run}}{\tau_{run}}$. Les critères $V^* = 0.2 \ \mu\text{m.s}^{-1}$ et $\Delta_x^* = 0.9 \ \mu\text{m}$ permettent de détecter les pics de V_δ , comme le montre la figure 3.6. La distinction entre les deux types de mouvements, présentée en

figure 3.4(b), est satisfaisante.

Les distributions des durées caractéristiques de "run" et de "tumble" obtenues grâce à cette procédure sont données en figure 3.7 pour l'expérience réalisée en régime stationnaire et dont les résultats sont notés avec l'indice ", 1". La distribution associée aux temps de "tumble" est plus large que celle des temps de "run". Leur modélisation analytique sera proposée dans la partie suivante, mais on peut d'ores et déjà mentionner qu'elles ne présentent pas de queues longues qui induiraient une diffusion anormale.

3.3.3 Simulations numériques

Afin de vérifier la pertinence de la procédure de distinction "run"/"tumble", nous avons réalisé des simulations numériques basées sur la méthode de Monte-Carlo, qui décrivent le mouvement moyen d'un grand nombre de particules dont le comportement est probabiliste. Afin de reproduire le comportement expérimental, les particules simulées alternent les deux types de mouvements ("run"/"tumble"), définis comme suit :

- 1. Pendant les périodes de "tumble", la particule oscille autour d'une position d'équilibre définie comme l'origine d'un repère polaire. Les coordonnées (r,θ) sont choisies à chaque instant telles que θ est aléatoire et r est tiré aléatoirement dans une distribution exponentielle de moyenne $\lambda_{tumble} = 0.19 \ \mu m$. Ce comportement est illustré en figure 3.8(a).
- 2. Pendant les périodes de "run", le mouvement consiste en une excursion balistique (en ligne droite), de durée τ_{run} et de direction aléatoirement choisie. La distance parcourue est ainsi $l_{run} = V_m \tau_{run}$, où V_m est la vitesse moyenne pendant le "run", schématisée en figure 3.8(b).
- 3. La durée d'une période est choisie aléatoirement parmi les distributions expérimentales (figure 3.7(a) et (b)), modélisées par la loi puissance suivante :

$$P(\tau_i) = \frac{\alpha_i}{A_i} \frac{1}{(1 + \frac{\tau_i}{A_i})^{1 + \alpha_i}}$$
(3.7)

avec $A_{tumble} = 38$ s, $\alpha_{tumble} = 1.7$, $A_{run} = 42$ s, $\alpha_{run} = 11$. Expérimentalement, les temps moyens de "runs" sont $\langle \tau_{run,1} \rangle = 7.1$ s et $\langle \tau_{tumble,1} \rangle = 68$ s.

4. La vitesse moyenne pendant les "runs" V_m est elle aussi générée aléatoirement parmi les distributions expérimentales, modélisées par une "Loi d'extremum généralisée" (figure 3.7(c)) de paramètre de localisation $\mu=0.37~\mu\mathrm{m.s^{-1}}$, de paramètre d'échelle $\sigma=0.13~\mu\mathrm{m.s^{-1}}$ et de paramètre de forme k=0.17. Le premier moment d'une telle distribution est donné par :

$$\langle V_m \rangle = \mu + \frac{\sigma}{k} (\Gamma(1-k) - 1)$$
 (3.8)

5. L'angle entre deux directions de "run" est aléatoire.

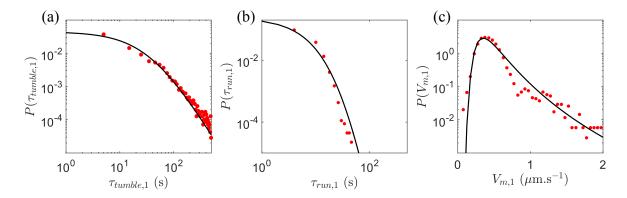


FIGURE 3.7 – Distributions (a) des temps de "tumble", (b) des temps de "run" et (c) de la vitesse moyenne pendant les "runs" $V_m = l_{run}/\tau_{run}$ Les données expérimentales (points rouges) sont fittées par les expressions données en section 3.3.3 (lignes noires) qui sont utilisées pour les simulations numériques.

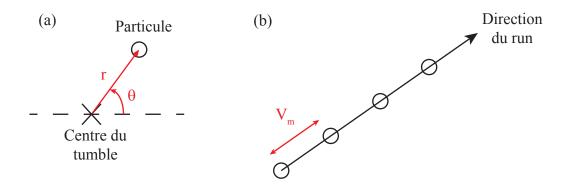


FIGURE 3.8 – Comportement des particules simulées. (a) Pendant les périodes de "tumble", les positions (r, θ) de la particule sont tirées autour de la position centrale du "tumble". (b) Pendant les périodes de "run", la particule se déplace en ligne droite dans une direction aléatoire à une vitesse constante V_m .

Les trajectoires de 453 particules sont simulées pendant 969 secondes, ce qui correspond au nombre et à la durée moyenne des trajectoires expérimentales. Les résultats numériques sont comparés à une expérience représentative, réalisée une heure après l'introduction des cyanobactéries dans la cellule de mesure, c'est-à-dire une fois que le coefficient de diffusion est stabilisé (voir figure 3.2 (b), les résultats relatifs à cette expérience sont toujours notés avec l'indice", 1").

Les distributions de probabilités de déplacement issues des simulations sont données en figure 3.5(b). La méthode de simulation ne prend pas en compte toute l'hétérogénéité de la dynamique puisque l'on considère une vitesse et une direction constantes pendant chaque "run". Cela peut expliquer les différences de courbure des queues des distributions; néanmoins la forme des distributions correspond aux données expérimentales, avec un pic central commun à tous les temps d'observations, et une largeur qui augmente avec le temps d'observation. L'écart quadratique moyen des particules simulées, calculé avec la formule 3.2, suit la même évolution que celui des bactéries expérimentales (voir figure 3.9).

Les simulations numériques réalisées ici avec trois paramètres d'entrée (les distributions des temps de "run", de "tumble", et des vitesses moyennes de "run") permettent de retrouver les caractéristiques principales de la diffusion des *Synechocystis*. Les formes analytiques des différentes distributions seront utiles pour la suite de la modélisation.

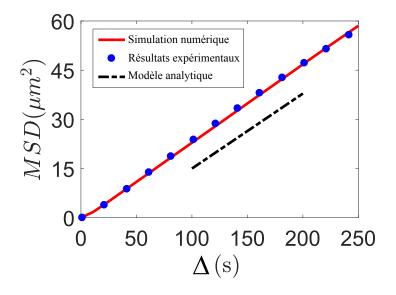


FIGURE 3.9 – MSD expérimentale (points bleus), et calculée à partir des résultats des simulations numériques (3.3.3). La ligne pointillée noire indique la pente donnée par l'équation 3.12.

3.4 Différents mécanismes envisagés pour le ralentissement

Nous avons vu en partie 3.2 qu'aux densités surfaciques typiques des expériences de ce chapitre, le ralentissement des *Synechocystis* ne provenait pas d'interactions stériques qui limiteraient le libre déplacement des bactéries. Ce ralentissement pourrait alors venir d'interactions biologiques entre les cellules, et résulterait d'une adaptation des bactéries à la surface sur laquelle elles évoluent. La communication inter-bactérienne peut se faire par la production de molécules extracellulaires qui diffusent dans le volume de la suspension et donnent des informations chimiques aux autres cellules présentes : le "quorum sensing".

Les bactéries diffusant en surface sont aussi capables de déposer au cours de leur mouvement des "traces" qui servent de repère aux cellules suivantes. La littérature récente [Hu et al., 2016], a ainsi montré que les substances extracellulaires, dont les exopolysaccharides (EPS), produits par les bactéries pouvaient modifier leur dynamique.

Dans cette partie, nous étudions les deux scénarios : la communication en volume et la communication en surface. Nous utiliserons les outils développés dans la partie 3.3 pour détailler le ralentissement en termes de temps de "run" et "tumble".

3.4.1 "Quorum sensing" dans le volume de la suspension

Afin de détecter le "quorum sensing" par lequel pourraient communiquer les Synechocystis en suspension, nous avons réalisé l'expérience en cellule microfluidique décrite dans la partie 2.3. Ce dispositif expérimental permet d'étudier la diffusion sur la même surface de deux populations cellulaires différentes. La figure 3.10 résume le déroulement de l'expérience.

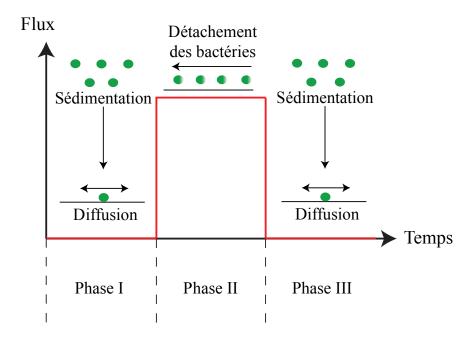


FIGURE 3.10 – Description schématique du protocole utilisé pour l'expérience réalisée dans le canal microfluidique.

Le principe de la mesure est le suivant : les bactéries sont amenées dans le canal d'observation, puis pendant la phase I aucun flux n'est imposé : les bactéries sédimentent et diffusent sur la surface du microcanal, comme dans la partie 3.2. Après une heure de diffusion libre, elles sont détachées de la surface par l'établissement d'un flux (phase II). Ensuite le flux est de nouveau stoppé, pour permettre à de nouvelles bactéries de sédimenter et diffuser sur la surface préalablement visitée par leurs congénères, durant la phase III de cette expérience.

La figure 3.11 présente l'évolution du coefficient de diffusion D(t), calculé à partir de l'équation 3.3, au cours de l'expérience. Celui-ci diminue lors de la phase I, comme observé en figure 3.2(b). Mais après le renouvellement de la population de bactéries, les nouvelles arrivantes en début de phase III commencent à diffuser avec un coefficient de diffusion différent de celui caractéristique du début de la phase I. Ce coefficient de diffusion est même dans la continuité du D final atteint par la première population. Une communication dans le volume de la suspension impliquerait de trouver des résultats similaires entre la phase I et la phase III puisque la population a changé, la deuxième n'ayant pas pu recevoir les informations de la première. Ces résultats différents, avec une continuité dans le coefficient de diffusion, suggèrent que la surface d'observation, commune aux deux périodes d'observation, est le vecteur de l'information.

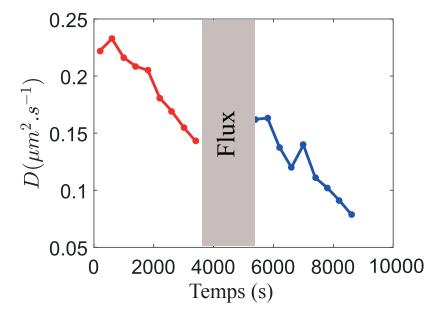


FIGURE 3.11 – Évolution du coefficient de diffusion au cours du temps : lors de la phase I (rouge) et de la deuxième sédimentation (phase III - bleu). La phase II d'enlèvement des bactéries présentes sur la surface est indiquée en gris.

3.4.2 Influence de la production d'EPS sur la dynamique diffusive

L'expérience décrite ci-dessus semble indiquer que les cellules peuvent communiquer par l'intermédiaire de la surface support de leur déplacement. Les *Synechocystis* produisant en permanence des EPS restant en surface, nous étudions ici leur influence sur la motilité des bactéries. A cette fin, nous observons le comportement diffusif de différentes souches mutantes qui se distinguent par le niveau et le type (capsulaires ou relâchés) d'EPS secrétés.

Les mutants ont été construits dans une étude précédente [Jittawuttipoka et al., 2013] à l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule. Les caractéristiques des différentes souches sont résumées dans le tableau 3.1 et dans la figure 3.12. Tous les mutants étudiés produisent moins d'EPS que la souche sauvage ("Wild Type"). Le mutant $\Delta sll1581$ relâche des quantités d'EPS (RPS) similaires à la souche sauvage, tandis que les deux double mutants ($\Delta slr1875$ -sll1581 et $\Delta sll0923$ -sll5052) relarguent moins d'EPS. Le double-mutant $\Delta sll0923$ -sll5052 produit davantage d'EPS capsulaires (CPS) que les autres mutants. Afin de faciliter la distinction entre les mutants, leurs niveaux relatifs de production de CPS et de RPS sont indiqués avec des signes + ou – dans le tableau 3.1.

L'évolution du coefficient de diffusion pour les différentes souches, obtenu avec le même

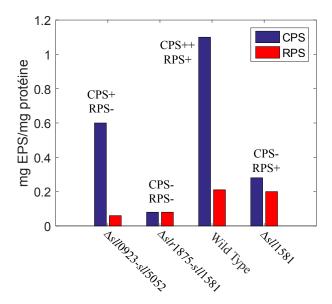


FIGURE 3.12 – Histogramme des productions de RPS et de CPS des différentes souches utilisées dans cette étude. Les valeurs sont extraites de [Jittawuttipoka et al., 2013].

| Souche | EPS Capsulaire (CPS) | EPS Relargué (RPS) | EPS Total | |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--|
| | (mg EPS/mg protéine) | (mg EPS/mg protéine) | (mg EPS/mg protéine) | |
| $\Delta sll0923$ - $sll5052$ | 0.6 (+) | 0.06 (-) | 0.7 | |
| $\Delta slr 1875$ - $sll 1581$ | 0.08 (-) | 0.08 (-) | 0.16 | |
| "Wild Type" | 1.1 (++) | 0.21 (+) | 1.3 | |
| $\Delta sll1581$ | 0.28 (-) | 0.2 (+) | 0.5 | |

TABLEAU 3.1 – Comparaison des concentrations en exopolysaccharides des souches étudiées.

protocole qu'en partie 3.2 et renormalisé par sa valeur initiale, est donnée en figure 3.13(a). On constate que pour les souches relâchant des quantités importantes d'EPS (souche sauvage et $\Delta sll1581$), le coefficient de diffusion évolue au cours du temps, pour atteindre un plateau à environ 50% de sa valeur initiale. Cette diminution n'est pas observée pour les double mutants relarguant peu d'EPS. En revanche, les vitesses de "run" tracées sur la figure 3.13(b) sont constantes et indépendantes de la souche choisie.

D'autre part, la valeur absolue du coefficient de diffusion (figure 3.14(a)) semble liée à la quantité totale d'EPS produits par les bactéries, la souche qui en produit le moins $(\Delta slr1875-sll1581)$ ayant le coefficient de diffusion le plus élevé, et celle qui en produit le plus (souche sauvage), ayant le plus bas. Pour résumer, la quantité de CPS influe sur la valeur absolue du coefficient de diffusion, tandis que la quantité de RPS modifie l'évolution temporelle de D.

Une analyse détaillée des temps caractéristiques du mouvement intermittent (figure 3.14(b) et (c)) montre que ceux-ci varient dans les mêmes proportions pour les souches relâchant des EPS. Les courbes des souches mutantes produisant peu de RPS ne présentent

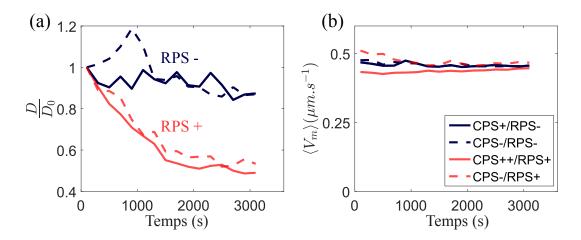


FIGURE 3.13 – (a) Évolution du coefficient de diffusion renormalisé par sa valeur initiale en fonction du temps pour différentes souches. Trait plein foncé : $\Delta sll0923$ -sll5052, trait pointillé foncé : $\Delta slr1875$ -sll1581, trait plein clair : souche sauvage, trait pointillé clair : $\Delta sll1581$. (b) Évolution temporelle de la vitesse moyenne de "run", avec la même légende que pour (a). Les quantités relatives de CPS et RPS produits sont rappelées pour faciliter la lecture.

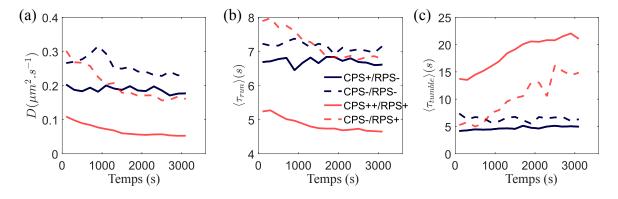


FIGURE 3.14 – Évolution (a) du coefficient de diffusion, (b) du temps de "run", et (c) du temps de "tumble" en fonction du temps pour différentes souches. Les lignes ont la même signification que dans la figure 3.13. Les quantités relatives de CPS et RPS produits sont rappelées pour faciliter la lecture.

aucune variation. Les évolutions observées sont cohérentes avec celles obtenues pour le coefficient de diffusion : la quantité de CPS agit sur la répartition entre temps de "run" et temps de "tumble", tandis que la quantité de RPS gouverne l'évolution temporelle de ces temps.

Pour revenir à des grandeurs non dépendantes du critère de séparation établi en partie 3.3.2, nous avons tracé en figure 3.15 les densités de probabilité de déplacement à 10 secondes pour les différentes souches étudiées. La distribution pour la souche sauvage présente un maximum aux petits déplacements, puis une queue qui signale l'existence de grands déplacements. Les souches mutantes présentent quant à elles une distribution bimodale, avec un premier maximum aux petits déplacements ($d_{10} = 2 \mu m$), puis un

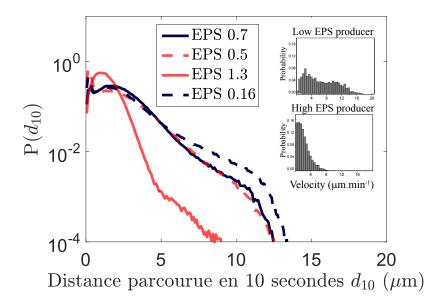


FIGURE 3.15 – Distribution des probabilités de déplacement à 10 secondes pour les différentes souches de Synechocystis étudiées. La légende donne les quantités totales d'EPS produites, en milligramme d'EPS par milligramme de protéine totale. Insert : données extraites de [Hu et al., 2016], qui représente la densité de probabilité des vitesses pour différentes souches de Myxococcus xanthus produisant peu ou beaucoup d'EPS.

deuxième maximum aux environs de $d_{10} = 10 \mu \text{m}$. Plus les souches produisent d'EPS, moins les distributions sont larges. Cette figure montre que les EPS inhibent l'existence de grands déplacements, tandis que l'absence d'EPS permet l'émergence d'une dynamique hétérogène.

3.4.3 Discussion

Les résultats décrits ci-dessus signifient que la quantité d'EPS relarguée influence l'évolution de la dynamique diffusive des Synechocystis. L'une des explications à ce phénomène pourrait être l'augmentation de viscosité générée par les EPS relâchées. Lors de son déplacement, la bactérie de rayon R cisaille une couche de fluide de hauteur h et de viscosité dynamique η située entre la membrane cellulaire et la surface. La relation entre la force F nécessaire au déplacement et la vitesse des bactéries V, où $a=\pi R^2$ est l'aire cisaillée, s'écrit ainsi:

$$F = \frac{\eta V a}{h} \tag{3.9}$$

La force F provient ici de la rétractation d'un pilus de type IV. En prenant $R=1.5 \mu m$, $V=1~\mu\mathrm{m.s^{-1}}$, h=1 nm et $\eta=1.10^{-3}$ Pa.s, la force nécessaire au mouvement est $F=7~\mathrm{pN}$. Cette valeur est bien cohérente avec celles obtenues dans la littérature [Burchmore et al., 2003, Lu et al., 2015]. Comme les pili sont les mêmes a priori pour toutes les souches étudiées ici, la force F est la même pour toute les souches. La vitesse moyenne pendant les runs est aussi constante (figure 3.13(b)), donc l'équation 3.9 implique que la viscosité est similaire pour toutes les souches considérées, et très différente de ce à quoi on pourrait s'attendre si la couche d'EPS, dont la viscosité est 10 fois supérieure à l'eau [Panoff and Joset, 1989], était cisaillée. Les effets visqueux ne peuvent pas expliquer la diminution de D observée.

En revanche, une diminution des vitesses de déplacement des bactéries due à la secrétion de substances extracellulaires a déjà été observée par [Hu et al., 2016], sur des bactéries Myxococcus xanthus dont la motilité repose également sur l'élongation et la rétractation de pili de type IV. L'insert de la figure 3.15 présente les distributions de probabilité des vitesses calculées sur 10 secondes (la vitesse est alors égale à $d_{10}/10$) pour l'étude mentionnée ci-dessus, et montre que ces distributions sont plus larges pour les souches produisant moins d'EPS. Nos observations expérimentales reproduisent ces tendances pour la Synechocystis, et témoignent de la capacité des EPS à limiter les grands déplacements, pour homogénéiser le comportement global des micro-organismes. En calculant les temps caractéristiques de "runs" et de "tumble", tracés en figure 3.14, nous montrons comment cette homogénéisation s'effectue, non pas en diminuant la vitesse pendant les "runs", mais en augmentant les temps de "tumble". Cela favorise l'accumulation des bactéries dans les zones déjà recouvertes d'EPS, comme cela a été observé [Zhao et al., 2013]. Le ralentissement dynamique observé peut s'expliquer par des interactions bio-chimiques entre bactéries, où les "traces" laissées par les Synechocystis influencent les temps caractéristiques des autres bactéries présentes. Nous testons dans la partie suivante la validité de ce scénario.

3.5 Modélisation

3.5.1 Adaptation du modèle Continuous-Time Random Walk pour le coefficient de diffusion

Cette partie a pour but de proposer un modèle pour le ralentissement de la dynamique observé en figure 3.2(b), à partir des résultats sur la description de la motilité intermittente et des observations sur le rôle des EPS détaillées dans les parties précédentes. Nous basons notre analyse sur le modèle de marche aléatoire à temps continu (CTRW), présenté en partie 1.3.2. Celui-ci décrit la diffusion d'une particule qui attend pendant un temps τ sur un site, avant de réaliser un saut de longueur l jusqu'à un site suivant, où elle attendra de nouveau. Sous réserve d'existence d'un second moment pour la distribution des longueurs de saut l et d'un premier moment pour la distribution des temps d'attente τ , le coefficient

de diffusion s'écrit [Bouchaud and Georges, 1990] :

$$D = \frac{1}{4} \frac{\langle l^2 \rangle}{\langle \tau \rangle} \tag{3.10}$$

Cette description semble adaptée au système étudié, où les bactéries alternent entre des périodes immobiles (les "tumbles"), et des "runs" qui leur permettent d'atteindre une nouvelle position sur la surface. L'équivalence entre les paramètres du modèle CTRW et les temps expérimentaux est présentée figure 3.16. Comme les bactéries ne peuvent pas réaliser de sauts instantanés (qui supposeraient une vitesse infinie), le temps d'attente entre chaque saut est défini comme $\tau = \tau_{run} + \tau_{tumble}$, où τ_{run} et τ_{tumble} sont pris consécutivement. τ correspond alors au temps séparant le début de deux périodes de "runs". La longueur du saut l est prise comme la distance parcourue à vol d'oiseau pendant un "run" : $l = l_{run}$.

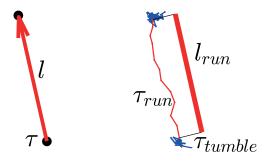


FIGURE 3.16 – Equivalence entre le modèle CTRW (à gauche) et les temps caractéristiques de l'intermittence de la motilité (à droite).

L'équation 3.10 est valable sous conditions d'existence du second moment de l et de premier moment de τ . Les distributions expérimentales de ces deux paramètres sont tracées en figure 3.17. On les modélise à l'aide de lois puissance (équation 3.7 page 64), avec les paramètres suivants : A_{τ} =50, α_{τ} =1.5, A_{l^2} =50, α_{l^2} =4. Ces valeurs des coefficients α garantissent l'existence d'un premier moment pour τ et d'un second pour l. On note cependant que la valeur de α_{τ} correspond à une distribution hétérogène, et que la densité de probabilité de τ n'admet pas de second moment.

Dans le modèle CTRW, le MSD augmente proportionnellement au nombre de sauts effectués, comme le rappelle l'équation 1.27 page 34. Comme nos résultats indiquent une diffusion normale, il faut s'assurer que le nombre de sauts N_{jumps} effectués dans un intervalle de temps Δ augmente bien proportionnellement à Δ .

Le nombre de sauts moyen est calculé avec l'équation 3.11, où N est le nombre de particules enregistrées, T_i la durée de la trajectoire i, $\mathcal{N}_{runs}(t,\Delta)$ le nombre de "runs" détectés entre l'instant t et l'instant $t + \Delta$, et $N_{ev} = \sum_{i=1}^{N} \sum_{t=1}^{T_i - \Delta} 1$ le nombre total de pas

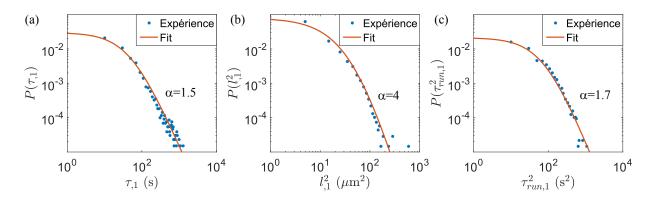


FIGURE 3.17 – Distributions de probabilités : (a) des temps entre deux sauts τ , (b) de la longueur des sauts au carré l^2 et (c) des temps de "runs" au carré τ_{run}^2 . Les points bleus correspondent aux données expérimentales, le trait rouge à un fit en loi puissance correspondant à l'équation 3.7 page 64. Les coefficients des lois puissances sont données dans le texte, et l'exposant α est donné sur les figures.

temporels enregistrés pour l'intervalle de temps Δ .

$$N_{jumps}(\Delta) = \frac{1}{N_{ev}(\Delta)} \sum_{i=1}^{N} \sum_{t=1}^{T_i - \Delta} \mathcal{N}_{runs}(t, \Delta)$$
(3.11)

La figure 3.18, qui présente l'évolution de N_{jumps} , pris en moyenne temporelle et d'ensemble, en fonction de Δt , indique que celle-ci est bien linéaire, ce qui valide le choix du modèle CTRW.

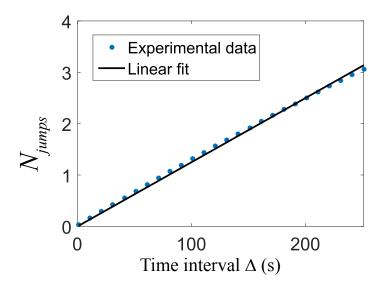


FIGURE 3.18 – Nombre de sauts moyen en fonction du temps. Points bleus : données expérimentales. Trait plein : fit linéaire.

De plus, en remarquant que pendant les phases de "run" le mouvement des bactéries semble directionnel (Fig. 3.4), on fait l'hypothèse que les "runs" sont balistiques, c'est-

à-dire que la distance parcourue pendant un "run" vaut $l_{run} = V_m \times \tau_{run}$, où V_m est la vitesse moyenne pendant un "run". Cette assertion est supportée par les simulations numériques réalisées (partie 3.3.3). En constatant que la vitesse moyenne pendant les "runs" est indépendante du temps, et en notant cette constante $\overline{V}_m = \langle V_m \rangle$, on obtient :

$$D \sim \frac{1}{4} \overline{V}_m^2 \frac{\langle \tau_{run}^2 \rangle}{\langle \tau \rangle} \tag{3.12}$$

L'équation 3.12 n'est valable que sous réserve d'existence d'un premier moment pour τ_{run}^2 et τ . Les distributions de probabilités expérimentales correspondantes sont données en figure 3.17(a) et (c). La densité de probabilité τ_{run}^2 est modélisée avec une loi puissance (équation 3.7 page 64) de paramètres $A_{\tau_{run}^2}$ =80, $\alpha_{\tau_{run}^2}$ =1.7. Cette valeur du coefficient α garantit l'existence d'un premier moment, mais pas d'un second moment pour τ_{run}^2 .

On peut alors appliquer l'équation 3.12 avec les paramètres expérimentaux issus de l'expérience représentative décrite en section 3.3.1(figures 3.17(a) et (c)) : $\langle \tau_{,1} \rangle \approx 64$ s, $\langle \tau_{run,1}^2 \rangle \approx 67$ s² et $\overline{V}_m \sim 0.47 \pm 0.3~\mu \text{m.s}^{-1}$ (voir figure 3.7(c)). Cela permet de retrouver le coefficient de diffusion expérimental avec une bonne précision, comme indiqué sur la figure 3.9. On dispose donc d'un modèle analytique pour la description de l'intermittence de la motilité, validé par des simulations, et consistant avec les données expérimentales.

3.5.2 Régime transitoire

Il reste alors à analyser l'évolution des temps de "run" et de "tumble" et à les intégrer dans l'équation 3.12 pour expliquer le ralentissement de la dynamique diffusive. Les résultats de la partie 3.4 indiquent que l'évolution de la dynamique est liée au relarguage d'EPS par les bactéries, et donc au recouvrement progressif de la surface par ces EPS. Les paramètres caractéristiques de la diffusion identifiés dans l'équation 3.12, $\langle \tau \rangle$ et $\langle \tau_{run}^2 \rangle$ devraient dépendre de la probabilité P(t) de se situer sur une zone recouverte d'EPS.

Cette probabilité P(t) peut être assimilée à S(t) la proportion de surface recouverte au cours du temps (en des termes plus physiques, la fraction du nombre de sites distincts visités au cours du temps). Étant donné le plateau observé pour coefficient de diffusion (figure 3.2(b)), il faut analyser comment toute la surface peut être recouverte.

Chaque image de la vidéo est binarisée, de telle sorte que les bactéries apparaissent en blanc sur fond noir. Un pixel blanc a une valeur de 1, un pixel noir a une valeur de 0. Tous les pixels de l'image sont initialisés à une valeur nulle. Puis on fait défiler la vidéo, en sommant l'image binarisée en cours de lecture. Un pixel sur lequel une bactérie est présente est ainsi incrémenté de 1. Cette méthode permet d'obtenir le nombre cumulé de visites à l'instant t par pixel, en sommant toutes les images entre l'instant initial et t. La proportion de surface visitée à l'instant t, S(t), est alors définie par l'équation 3.13, dans

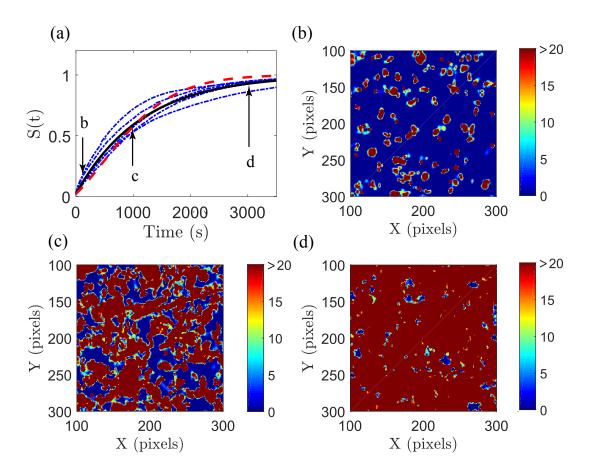


FIGURE 3.19 – (a) En pointillé bleu : proportion de surface recouverte en fonction du temps, pour cinq expériences différentes (pointillés colorés). Le trait plein noir correspond à l'équation 3.15. Le trait pointillé rouge correspond au modèle analytique décrit par l'équation 3.22. (b)-(d) Cartes de colonisation aux instants indiqués sur (a), zoomées sur une partie de l'image totale $(200\times200~\rm pixels)$. Les sites bleus correspondent aux sites pas encore visités, tandis que les sites rouges correspondent à des sites visités plus de $20~\rm fois$.

laquelle $N_{>1}(t)$ désigne le nombre de pixels dont la valeur est supérieure ou égale à 1 (au moins une visite), et N_{pixels} le nombre total de pixels de l'image (800×640) :

$$S(t) = \frac{N_{>1}(t)}{N_{pixels}} \tag{3.13}$$

Cette analyse suppose que les bactéries relarguent en permanence des EPS (ce qui a tendance à surestimer la proportion de surface recouverte), et que la largeur des traces d'EPS est celle des bactéries (ce qui la sous-estime, car les traces peuvent être légèrement plus larges du fait de leur étalement). Nous avons assimilé P(t) à S(t). En réalité, pour une particule diffusant, la probabilité d'arriver sur un site vierge n'est pas tout à fait égale à la fraction de site vierge comme elle a déjà visité les sites autour d'elle. Cette approximation semble en revanche valable pour les particules venant d'atterrir, juste après leur processus

de sédimentation.

La figure 3.19(a) présente l'évolution expérimentale de la proportion de surface visitée. Les figures 3.19(b)-(d) illustrent comment la surface est progressivement recouverte pendant l'expérience. Aux temps courts, comme le montre la figure 3.19(b), les zones visitées correspondent à la diffusion des bactéries déjà présentes. Avec le processus de sédimentation, les bactéries arrivent dans des zones vierges et visitent ainsi de nouvelles zones (figure 3.19(c)). La proportion de surface visitée tend vers 1 bien que les expériences aient été réalisées en régime dilué (figure 3.19(d)).

En analysant les figures 3.2(b) page 59 et la figure 3.19(a), on constate également que les échelles temporelles de variation de D(t) et S(t) sont similaires. Pour les deux mesures, les deux tiers de l'écart entre les valeurs initiales et finales sont comblés en environ 1000 secondes. Cette similaite des temps caractéristiques signifie que le recouvrement de la surface par des EPS, mesuré par S(t), pourrait expliquer la variation de D(t).

Reste à savoir si les temps caractéristiques de la motilité intermittente (τ et τ_{run}^2) sont corrélés avec l'évolution de la proportion de surface recouverte. La figure 3.20 indique que τ et τ_{run}^2 évoluent de manière monotone avec S. Une valeur de S=0 correspond à une surface de verre non recouverte d'EPS, et S=1 correspond à une surface totalement recouverte d'EPS. En première approximation, on interpole linéairement les valeurs expérimentales, pour écrire finalement :

$$\begin{cases} \langle \tau \rangle = \tau_{verre}[1 - S(t)] + \tau_{EPS}S(t) \\ \langle \tau_{run}^2 \rangle = \tau_{run,verre}^2[1 - S(t)] + \tau_{run,EPS}^2S(t) \end{cases}$$
(3.14)

avec τ_{verre} et τ_{EPS} les intersections des courbes moyennes avec les axes S=0 et S=1 respectivement. La figure 3.20 indique que les exopolysaccharides ont tendance à augmenter l'intervalle de temps τ séparant deux périodes de "run", et à diminuer les durées des périodes de "run".

Il est enfin nécessaire d'obtenir une formule analytique pour S(t). Modéliser la proportion de surface visitée revient à compter le nombre de sites distincts visités par les bactéries. Ce problème n'a pas de solution simple [Larralde et al., 1992], même lorsque le nombre de particules est constant. Nous optons dans un premier temps pour un ajustement des courbes expérimentales :

$$S(t) = 1 - e^{-t/\tau_S} (3.15)$$

On obtient pour le temps caractéristique $\tau_S = 1150 \pm 6$ s. Cette valeur est inférieure au temps de sédimentation τ_N , signe que la diffusion joue bien un rôle actif dans le recouvrement de la surface.

La combinaison des équations 3.12, 3.14 et 3.15 donne une formule analytique pour

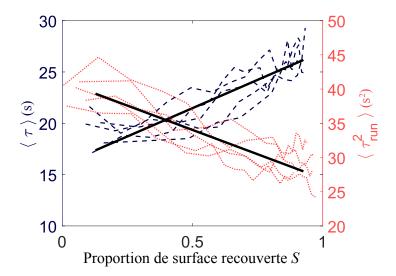


FIGURE 3.20 – Évolution de τ (tirets foncés) et τ_{run}^2 (pointillés clairs) en fonction de la proportion de surface recouverte S, pour cinq expériences différentes. Les traits pleins noirs indiquent une moyenne linéaire des courbes expérimentales.

l'évolution temporelle du coefficient de diffusion :

$$D(t) = \frac{1}{4} \overline{V}_m^2 \frac{\tau_{run,verre}^2 e^{-t/\tau_S} + \tau_{run,EPS}^2 (1 - e^{-t/\tau_S})}{\tau_{verre}^2 e^{-t/\tau_S} + \tau_{EPS}^2 (1 - e^{-t/\tau_S})}$$
(3.16)

Celle-ci permet bien de retrouver la décroissance temporelle de D(t), comme illustré par l'ajustement des données expérimentales présenté en figure 3.2(b) page 59. Notre modèle permet ainsi de prendre en compte la modification des temps caractéristiques de l'intermittence par la présence d'exopolysaccharides pour expliquer le ralentissement de la dynamique des Synechocystis après leur arrivée sur une surface.

La détection des exopolysaccharides par les bactéries pourrait avoir lieu en raison de la nature chimique de ces molécules adsorbées en surface. Cependant de plus en plus d'études ont remarqué l'existence de capteurs mécaniques à l'échelle microbienne. Des bactéries motiles peuvent en effet utiliser leurs appendices (flagelles ou pili) pour "sentir" la dureté de la surface sur laquelle elles se déplacent [Song et al., 2018, Ellison and Brun, 2015, Cairns et al., 2013]. Pour la bactérie Vibrio cholerae, la formation du biofilm est initiée par l'arrêt du moteur moléculaire après la détection mécanique de la surface par ses flagelles [Van Dellen et al., 2008]. Des interactions mécaniques entre pili et exopolysaccharides pourraient ainsi réguler ralentir la dynamique cellulaire et favoriser l'apparition d'un biofilm [Harapanahalli et al., 2015], selon des mécanismes complexes qui restent à préciser.

3.5.3 Une description du nombre de sites distincts visités

Nous avons utilisé une forme empirique pour évaluer la proportion de surface recouverte au cours du temps. Néanmoins, il est possible d'obtenir une formule analytique simplifiée pour S(t), à partir d'hypothèses simples. On a vu que le comportement diffusif des Synechocystis était globalement Fickien, donc on assimile leurs trajectoires à des marches aléatoires, dont la longueur de pas est égale au diamètre des bactéries $\omega = 2R = 3$ μ m. Dans le cas d'une marche aléatoire, le nombre de pas N_{ω} de longueur ω est relié au coefficient de diffusion effectif D_{eff} par l'équation 3.17, où t est la durée de la marche aléatoire :

$$\omega N_{\omega}^{1/2} = \sqrt{4D_{eff}t} \tag{3.17}$$

Pour simplifier, on prend un coefficient de diffusion effectiff D_{eff} constant au cours du temps. En considérant qu'un marcheur aléatoire ne peut pas revenir là où il est déjà passé, la surface S_i qu'il recouvre est égale à la longueur développée de la trajectoire L multipliée par sa largeur ω . Un schéma représentatif de la situation est donné en figure 3.21, où L correspond à la longueur du trait noir. Or, la longueur développée L est aussi égale au nombre de pas N_{ω} multiplié par la longueur d'un pas ω . On exprime alors la surface visitée par un marcheur individuel S_i en fonction du coefficient de diffusion moyen du mouvement D_{eff} selon l'équation 3.18 :

$$S_i = \omega^2 N_\omega = 4D_{eff}t \tag{3.18}$$

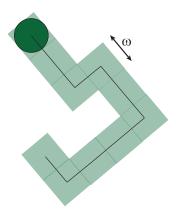


FIGURE 3.21 – Schématisation de la marche aléatoire de pas ω considérée. La particule est représentée par le disque vert, et les zones qu'elles a visitées sont coloriées. La longueur développée de la trajectoire L correspond à la longueur du trait noir reliant les positions successives de la particule.

En prenant la différentielle de l'équation 3.18, on obtient l'incrément de surface visité par un marcheur individuel :

$$dS_i = 4D_{eff}dt (3.19)$$

On peut utiliser ce résultat pour calculer l'incrément de surface dS visité par N particules, en considérant que la probabilité de visiter un site nouveau vaut (1 - S):

$$dS = \frac{(1-S)N(t)}{A}dS_i = (1-S)N(t)\frac{4D_{eff}}{A}dt$$
(3.20)

où \mathcal{A} est l'aire du domaine d'étude. On note $B = \frac{4D_{eff}}{\mathcal{A}}$. En utilisant pour le nombre de bactéries présentes à l'instant t la formule donnée en équation 3.1 page 57 décrivant la sédimentation, l'équation différentielle à résoudre devient :

$$\frac{dS}{dt} + B(N_{\infty} - (N_{\infty} - N_0)e^{-t/\tau_N})S = B(N_{\infty} - (N_{\infty} - N_0)e^{-t/\tau_N})$$
(3.21)

On remarque que S=1 est une solution particulière, et une solution particulière est déterminée à l'aide de la méthode de variation de la constante. On a finalement :

$$S(t) = 1 + (S_0 - 1)e^{\tau_N B(N_\infty - N_0)(1 - e^{-t/\tau_N}) - BN_\infty t}$$
(3.22)

où S_0 désigne la proportion de surface recouverte par les N_0 bactéries initialement présentes, avec un nombre final de bactéries N_{∞} .

On choisit comme paramètre D_{eff} =7.7 μ m².s⁻¹. Les autres paramètres du modèle sont fixés par l'expérience, où on a N_{∞} =800 particules, N_0 =0.2 N_{∞} comme l'indique la figure 3.1. S_0 est pris égal à $N_0/\mathcal{A} \sim 0.01$. Avec ces paramètres basés sur les résultats expérimentaux, on obtient la courbe rouge tracée sur la figure 3.19(a) qui ajuste convenablement les données expérimentales.

Le coefficient de diffusion effectif D_{eff} utilisé est cohérent avec les valeurs expérimentales de D(t) du début de l'expérience (figure 3.2(b)). L'équation 3.22 semble sous-estimer les valeurs expérimentales aux instants initiaux, ce qui peut provenir du fait que le coefficient de diffusion mesuré est supérieur au début de l'expérience au coefficient effectif D_{eff} . Cette équation surestime également les données expérimentales aux temps longs. Cela peut provenir du fait qu'en réalité, des marcheurs aléatoires peuvent revenir sur leur pas et visiter des sites sur lesquels ils sont déjà passés. Ainsi, le nombre distincts de sites visités par un marcheur S_i n'est pas proportionnel au temps t, mais plutôt à t/ln(t) [Haus and Kehr, 1987, Bouchaud and Georges, 1990], ce qui n'est pas pris en compte dans notre modèle simplifié. Cependant, nous nous intéressons ici à un domaine spatial comportant un nombre de sites fini, et nous calculons la proportion de surface visitée, qui tend vers 1. Les écarts avec la théorie sont ainsi réduits, puisque la grandeur calculée ne peut pas diverger. Finalement, le modèle simplifié proposé convient dans les plages temporelles et spatiales étudiées.

3.6 Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, nous avons étudié la motilité de surface de la cyanobactérie Synecho-cystis sur une lame en verre. Les résultats obtenus indiquent une intermittence typique de la "twitching motility", avec des périodes de "runs" et de "tumble". Nous avons constaté un ralentissement de sa dynamique diffusive, caractérisée par un coefficient de diffusion dépendant du temps D(t).

Nous avons construit une procédure de séparation de ces deux périodes, validée par des simulations numériques, afin d'avoir accès aux évolutions des temps caractéristiques de cette intermittence. Des expériences complémentaires avec des souches mutantes produisant moins d'exopolysaccharides que la souche sauvage ont permis de mettre en évidence le rôle des EPS, notamment les EPS relâchés, dans la modification de la motilité de surface des bactéries. Nous avons enfin construit un modèle, basé sur ces observations expérimentales et complété par une description de l'intermittence, qui propose des pistes d'explication sur l'adaptation de la motilité des *Synechocystis* à leur arrivée sur une surface.

En "marquant" la surface sur son passage, une bactérie signale sa présence, détectée par d'autres bactéries à l'aide de processus méchano-sensoriels sans doute complexes. Nos résultats indiquent que cela a pour conséquence de provoquer une augmentation des temps de "tumble" pendant lesquels les bactéries s'arrêtent. Nous pensons que ceci constitue un mécanisme précurseur à la formation d'un biofilm où les bactéries sont statiques. Le prochain chapitre traite en détail des liens entre motilité et formation de biofilm.

Chapitre 4

Émergence de micro-colonies

Après avoir décrit dans le chapitre précédent la motilité individuelle des Synechocystis, nous étudions dans ce chapitre comment la structure du biofilm bactérien, qui représente un vaste champ d'études lié à des problématiques très diverses (voir partie 1.4), peut émerger. Il existe deux mécanismes principaux pour la formation de micro-colonies : elles peuvent croître par de multiples divisions cellulaires à partir d'une seule cellule initiale, ou se créer par association de cellules motiles qui se rencontrent [Weber et al., 2015]. Nous analysons ici le lien entre motilité des bactéries et morphologie du biofilm pour tester si ces hypothèses sont à même de décrire la formation de biofilm chez la Synechocystis.

Du point de vue de la motilité, la littérature récente a montré que la dureté du substrat sur lequel se déplacent les bactéries a une influence sur leur dynamique [Zhang et al., 2014, Song et al., 2017]. Leurs déplacements sont aussi davantage corrélés sur les surfaces les plus dures, ce qui peut conduire à un phénomène de durotaxie, où les cellules migrent vers les zones les plus rigides d'une surface [Novikova et al., 2017]. En revanche, des études récentes recensées dans la partie 1.4.3 révèlent qu'il n'y a pas de consensus concernant la formation de micro-colonies : la dureté favorise ou inhibe le biofilm suivant les souches considérées.

Étudier la formation de micro-colonies sur des surfaces de différentes rigidités pourrait donc constituer un moyen de caractériser le rôle de la motilité dans la morphologie des micro-colonies formées par les bactéries. Nous avons utilisé deux protocoles permettant d'étudier d'une part la dynamique de manière similaire au chapitre précédent, et d'autre part la croissance du biofilm. Ceci résulte en une étude aux temps courts pour vérifier la dépendance de la motilité en fonction de la rigidité des surfaces de diffusion, et une étude aux temps longs pour suivre la dynamique bactérienne jusqu'à l'apparition et la stabilisation de micro-colonies.

4.1 Des dynamiques différentes en cellule fermée

Dans cette section, on s'attache à décrire la motilité des *Synechocystis* selon un protocole calqué sur celui du chapitre précédent, en utilisant les outils développés dans la partie 3.2, mais en changeant les surfaces de diffusion. Nous utilisons le dispositif expérimental présenté en figure 2.1 page 48. Les surfaces utilisées sont des PDMS de duretés différentes caractérisées par leur ratio agent réticulant / base 1:5, 1:10 et 1:25. Les modules d'Young de ces différents PDMS sont rappelées en partie 2.4. La raideur des surfaces de PDMS augmente avec le taux d'agent réticulant, et le verre est plus dur que tous les PDMS. Les résultats obtenus sur le PDMS sont systématiquement comparés à notre cas de référence sur une surface de verre déjà étudiée au chapitre précédent.

Pour obtenir différentes surfaces de diffusion, on utilise une lamelle en verre (22×22 mm). Le PDMS est créé en mélangeant dans les proportions désirées la base de polymère avec l'agent réticulant Sylgard 184. A l'aide d'un capillaire de diamètre 100 μ m, on prélève une goutte de solution de PDMS encore liquide que l'on dépose sur une lamelle en verre. Ce processus est réalisé deux jours avant le début des expériences pour que la prise du PDMS ait lieu. Ensuite, on répète les opérations décrites en figure 2.2(b) qui permettent d'obtenir une cellule de mesure, avec cette fois-ci une surface de PDMS sur la lamelle en verre. On focalise alors le microscope sur une partie de la goutte de PDMS solidifiée. Un schéma explicatif est donné en figure 4.1.

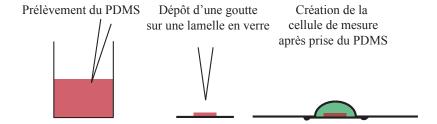


FIGURE 4.1 – Schéma de la fabrication d'une cellule de mesure permettant d'étudier la motilité sur des surfaces de PDMS. Les différentes étapes de la création de la cellule de mesure après prise du PDMS sont détaillées en figure 2.2, sauf que cette fois la lamelle en verre contient une goutte de PDMS solidifié en son centre.

4.1.1 La motilité reste intermittente

Ici, nous excluons de l'analyse les bactéries non motiles, comme dans l'étude menée au chapitre 3. Pour le chapitre 3, environ 5% des trajectoires étaient ainsi rejetées. On note que cette proportion de trajectories rejetées est plus importante sur le PDMS, où elle est supérieure à 20%. La figure 4.2 présente des trajectoires représentatives de bactéries obtenues sur les différentes surfaces d'études, divisées en périodes de "runs" et en périodes de "tumble" conformément à la procédure détaillée dans la partie 3.3.2. Les critères de vitesse seuil V^* et de déplacement minimum Δx^* ont été pris à 0.22 μ m.s⁻¹ et 0.9 μ m

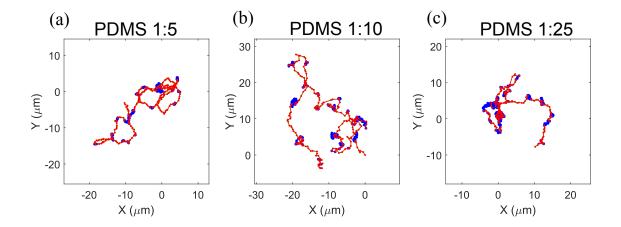


FIGURE 4.2 – Exemple de trajectoires représentatives observées sur (a) du PDMS 1:5, (b) du PDMS 1:10 et (c) du PDMS 1:25. Les périodes de "runs" sont en rouge, les périodes de "tumble" en bleu. Les durées respectives des trajectoires sont 399, 491 et 416 secondes.

respectivement. Ces trajectoires indiquent que les *Synechocystis* se déplacent toujours de manière intermittente sur ces surfaces.

Les évolutions temporelles des temps caractéristiques de cette intermittence, présentés en figure 4.3, sont similaires à celles observées précédemment sur la surface de verre : après 1000 secondes les temps de "run" diminuent, et les temps de tumble augmentent. Les ordres de grandeurs de $\langle \tau_{run} \rangle$ et $\langle \tau_{tumble} \rangle$ sont aussi semblables sur toutes les surfaces. L'augmentation initiale des temps de "runs", surtout notable sur les surfaces de PDMS, n'est pas comprise à ce jour. Nous pensons que cette partie de la courbe est un artefact dû à l'angle de contact entre la goutte de PDMS et la surface en verre. Comme la surface n'est pas plane, le plan focal observé contient les trajectoires de bactéries juste avant leur arrivée sur la surface (notamment au début de la vidéo).

La vitesse moyenne de "run" reste également constante au cours du temps, comme l'indique la figure 4.4. Cette vitesse moyenne ne semble en outre pas dépendre de la surface considérée. Ainsi, la répartition des temps de "run"/"tumble" et les propriétés des périodes de "runs" semblent similaires sur toutes les surfaces étudiées ici.

4.1.2 Proportion de bactéries "actives"

Si les bactéries détectées comme motiles présentent une dynamique similaire, les surface se distinguent en premier lieu par la proportion de bactéries actives qui y est observée. Nous poursuivons maintenant l'analyse avec les données brutes, indépendantes de tout critère de sélection.

La figure 4.5 présente les distributions de probabilités de déplacement, pour un intervalle de temps de 10 secondes, sur les différentes surfaces. Ces distributions sont normées de telle sorte que leur intégrale vaille 1. Elles présentent un pic aux alentours de 0.5 mi-

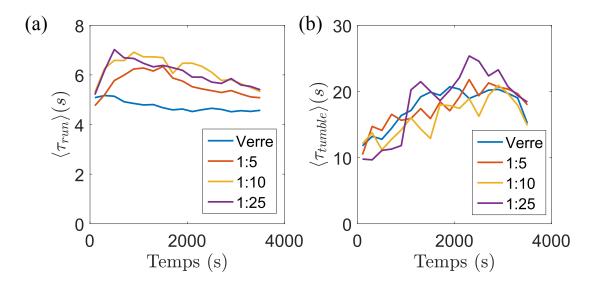


FIGURE 4.3 – (a) Évolution temporelle du temps de "run" moyen et (b) du temps de "tumble" moyen, pour différentes surfaces : PDMS 1:25 (violet), PDMS 1:10 (jaune), PDMS 1:5 (rouge) et verre (bleu).

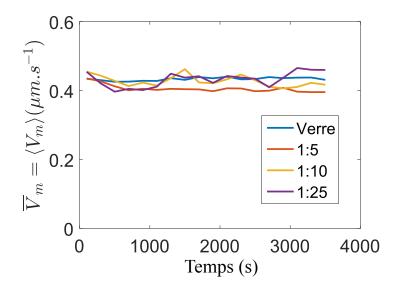


FIGURE 4.4 – Évolution temporelle de la vitesse moyenne de "run", pour des expériences réalisées en cellule fermée pour différentes surfaces : PDMS 1:25 (bleu), PDMS 1:10 (rouge), PDMS 1:5 (jaune) et verre (violet).

crons dont la hauteur diminue quand la dureté de la surface augmente, ceci suggère qu'il y a plus de petits déplacements sur les surfaces molles. La largeur des distributions dépend aussi fortement de la dureté des surfaces : elles sont d'autant plus larges que la surface est dure.

Ces résultats mettent en évidence le fait que les *Synechocystis* ont en moyenne une plus grande tendance à être non motile sur une surface molle. Pour mieux illustrer ce

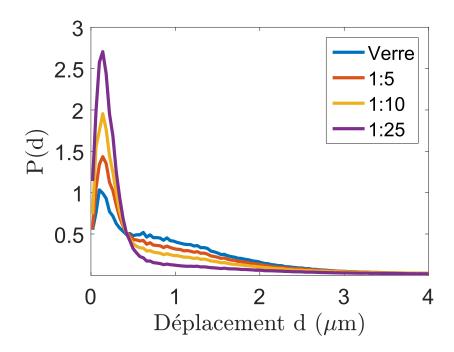


FIGURE 4.5 — Distribution des probabilités de distance parcourue d à 10 secondes, pour des surfaces de différentes duretés : PDMS 1:25 (violet), PDMS 1:10 (jaune), PDMS 1:5 (rouge) et verre (bleu).

résultat, on trace en figure 4.6 les sites visités par les bactéries pendant des périodes de 250 secondes. Chaque trajectoire de 250 secondes est repositionnée par rapport à sa position initiale de sorte que toutes partent du point (0,0) sur la figure 4.6. La surface de diffusion est ensuite discrétisée en N_S sites de 0.2 μ m de coté, dont la valeur est initialisée à 0, puis incrémenté de 1 à chaque fois qu'une bactérie y est détectée. Les valeurs de chaque site sont alors renormalisées de sorte que leur somme soit égale à 1, pour pouvoir comparer les expériences entre elles lorsque le nombre de trajectoires n'est pas le même.

La valeur finale attribuée chaque site n est alors $C_n = C'_n / \sum_{n=1}^{N_S} C'_n$, où N_S est le nombre total de sites. La figure 4.6 montre que plus la surface est molle, plus la tache centrale est marquée, ce qui suggère que le mouvement des Synechocystis est plus localisé. La zone visitée est également de plus en plus petite quand la rigidité de la surface diminue. Ci-dessous, nous quantifions cette proportion de bactéries non motiles.

Dans ce but, on définit une distance seuil d_{lim} de telle sorte qu'une bactérie soit déclarée non motile si elle n'a pas parcouru la distance d_{lim} pendant l'intervalle de temps Δ . Pour avoir accès à la dynamique des proportions de bactéries non motiles, on discrétise l'expériences en fenêtres temporelles de longueur Δ , et on note t le temps correspondant au début de la fenêtre temporelle. On calcule ensuite les trajectoires de durée Δ entre t et $t + \Delta$. La proportion de bactéries actives p_{act} est alors définie suivant l'équation 4.1, où $N_{\Delta}(t)$ désigne le nombre total de trajectoires de durée Δ détectées à l'instant t et $N_{\Delta}(t,d \geq d_{lim})$ est le nombre de trajectoires de durée Δ qui parcourent une distance

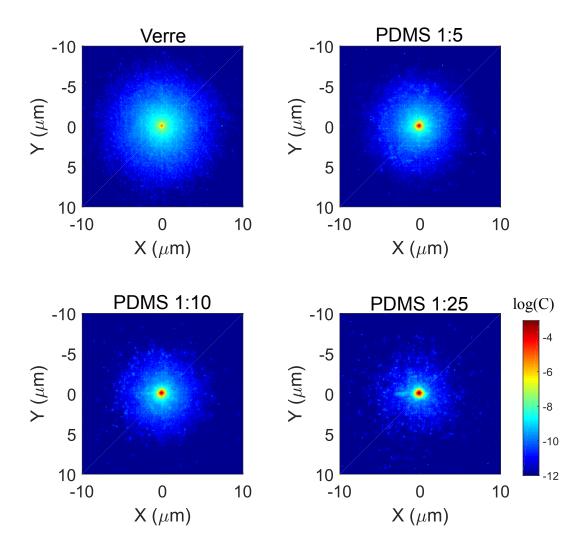


FIGURE 4.6 – Sites visités au cours de périodes de 250 secondes. Rouge : site visité le plus de fois. Bleu : site non visité.

supérieure ou égale à d_{lim} .

$$p_{act}(t) = \frac{N_{\Delta}(t, d \ge d_{lim})}{N_{\Delta}(t)}$$
(4.1)

En prenant $d_{lim}=2~\mu m$ et $\Delta=100$ secondes, on obtient l'évolution temporelle de la proportion de bactéries actives, donnée en figure 4.7.

Sur le verre, quasiment toutes les bactéries sont actives. Sur le PDMS, plus la surface est dure, plus la proportion de bactéries motiles est élevée. Les proportions de bactéries motiles semblent diminuer légèrement au cours du temps pour toutes les surfaces, sauf le PDMS 1:10. Les proportions absolues de particules actives (figure 4.7) dépendent des critères d_{lim} et Δ choisis, mais la hiérarchie est toujours respectée quelles que soient les valeurs des paramètres choisis. Cette représentation illustre une fois de plus que la prin-

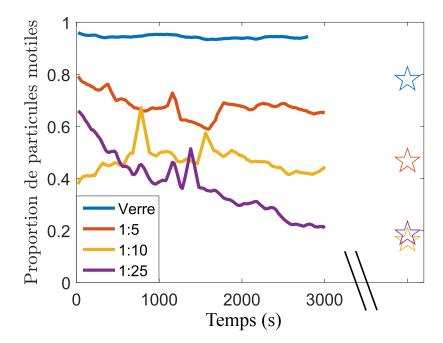


FIGURE 4.7 – Évolution temporelle de la proportion de bactéries motiles, pour différentes surfaces : PDMS 1:25 (violet), PDMS 1:10 (jaune), PDMS 1:5 (rouge) et verre (bleu), pour les expériences de la partie 4.1. Les étoiles correspondent aux proportions obtenues sur chaque surface à la première vidéo des expériences décrites en partie 4.2 (environ trois heures après introduction dans la cellule de mesure). Les codes couleurs ont été conservés.

cipale différence entre les surfaces est la proportion de bactéries en mouvement. Dans la suite, nous étudions comment la morphologie du biofilm est gouvernée par ces dynamiques différentes.

4.2 Colonisation de surface

Cette partie décrit une expérience de colonisation de surface menée sur plusieurs jours, qui nécessite l'utilisation d'un système ouvert pour permettre la croissance des bactéries. Dans ce but, les *Synechocystis* sont introduites dans une boîte de Pétri contenant différents échantillons de surface (voir la photographie 2.6 page 53), et maintenues dans des conditions de croissance comme indiqué sur le schéma 2.5. Au cours de cette expérience, nous réalisons des prises de vidéos de 40 minutes successivement sur chacune des surfaces, environ deux fois par jour. Afin d'étudier la structure et la répartition spatiale des microcolonies, des images sont prises en plusieurs endroits de chaque surface.

Les cyanobactéries sont introduites dans une boîte de Pétri au fond de laquelle sont disposées les PDMS de différentes duretés (voir partie 2.4) ainsi qu'une lamelle en verre. La caméra et son dispositif de réglage sont contenus avec la boîte de Pétri dans l'incubateur, afin d'assurer des conditions de lumière suffisantes à la croissance des *Synechocystis* sur

une semaine.

4.2.1 Évolution de la dynamique

Probabilités de déplacement

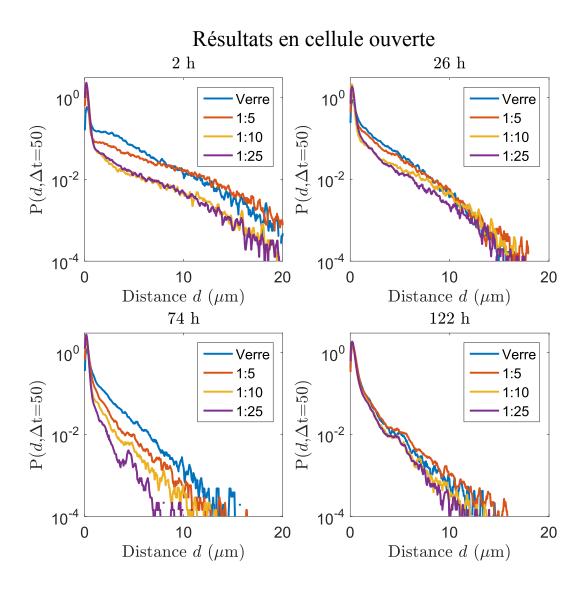


FIGURE 4.8 – Distribution des probabilité de déplacement à 50 secondes, pour différentes surfaces : PDMS 1:25 (violet), PDMS 1:10 (jaune), PDMS 1:5 (rouge) et verre (bleu). Le temps écoulé depuis le début de l'expérience est indiqué en titre du graphique.

A titre de comparaison avec les expériences réalisées en cellule fermée, nous avons calculé les distributions de probabilités de déplacement calculées sur un intervalle de temps de 50 secondes, tracées sur la figure 4.8. Durant les premières 24 heures, les distributions ressemblent à celles obtenues en cellule fermée et tracées sur la figure 4.5 (même si l'échelle des abscisses est différente car l'intervalle utilisé pour calculer les déplacement n'est pas le

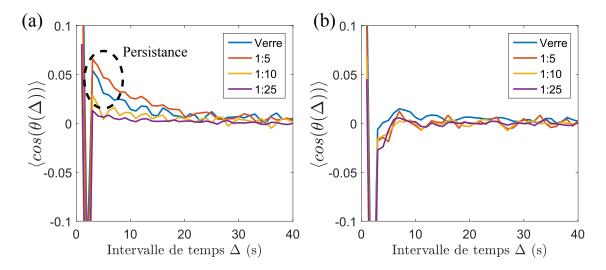


FIGURE 4.9 — Angle moyen entre deux vecteurs déplacements espacés d'un intervalle de temps Δ , pour différentes surfaces : PDMS 1:25 (violet), PDMS 1:10 (jaune), PDMS 1:5 (rouge) et verre (bleu). (a) Au premier jour de croissance. (b) Après 74 heures.

même). Ces distributions bimodales avec un pic initial et des largeurs variables traduisent la coexistence de bactéries motiles avec d'autres qui ne le sont pas. Dans tous les cas, un ralentissement global est observé après l'introduction des bactéries dans la boîte de Pétri.

Plus la surface est molle, plus l'amplitude du maximum à courte distance est grande, signe d'une propension à rester immobile. La largeur des distributions d'autant plus grande que la surface est dure. Lorsque le temps écoulé depuis le début de l'expérience augmente, les distributions sont de plus en plus étroites, et se confondent même au bout d'une semaine de croissance.

Persistance du mouvement

Les différentes formes obtenues pour les probabilités de déplacement pourraient provenir de plus grandes corrélations entre les déplacements sur les surfaces dures, comme cela a été observé par [Novikova et al., 2017]. Nous avons évalué la persistance du mouvement en calculant le cosinus moyen de l'angle entre deux vecteurs déplacement $\langle \cos(\theta) \rangle$ en fonction du temps Δ qui les séparent. Le vecteur déplacement \overrightarrow{d} est calculé sur $\delta t = 2$ secondes comme l'équation 4.2, où $\overrightarrow{X(t)}$ désigne la position d'une bactérie à l'instant t.

$$\overrightarrow{d(t)} = \overrightarrow{X(t+\delta t)} - \overrightarrow{X(t)}$$
 (4.2)

La persistance est quantifiée en calculant $\langle \cos(\theta) \rangle$, où les crochets désignent une prise

de moyenne sur tous les déplacements possibles.

$$\langle cos(\theta(\Delta)) \rangle = \left\langle \frac{\overrightarrow{d(t)} \cdot \overrightarrow{d(t+\Delta)}}{||\overrightarrow{d(t)}|| \times ||\overrightarrow{d(t+\Delta)}||} \right\rangle$$
(4.3)

Le résultat de ce calcul est tracé en figure 4.9, pour deux jours différents : juste après le début de l'expérience et après 74 heures. Pendant le premier jour, une corrélation existe sur les surfaces les plus dures, tandis que $\langle \cos(\theta) \rangle$ est rapidement nul sur les surfaces les plus molles. Après 74 heures, la corrélation est nulle sur quasiment toutes les surfaces. Ainsi, plus la surface est dure, plus les bactéries ont la capacité de corréler leurs mouvements et de se déplacer dans une direction précise. Ce résultat traduit une dynamique plus "aventureuse" sur les surfaces dures, où les Synechocystis explorent davantage leur environnement que sur les surfaces molles. Ce mécanisme révèle les détails de la dynamique inhérente à chaque surface et permet d'expliquer les différences observées dans les distributions de probabilités de déplacement entre les surfaces (figure 4.8). Nous quantifions maintenant ces différences de motilité.

Proportion de bactéries motiles en cellule ouverte

Nous avons vu dans la partie 4.1 que la proportion de bactéries motile constitue un critère pertinent pour distinguer la dynamique sur chaque surface étudiée pour une expérience d'une heure (figure 4.7). Cette proportion est ici calculée selon l'équation 4.1 sur l'ensemble de chaque prise de vidéo. La figure 4.10 montre que des micro-colonies, qui sont signalées par les taches sombres, se forment au cours de l'expérience. Nous nous intéressons ici plutôt à la motilité individuelle des cellules, et de plus nous n'observons aucune dynamique particulière dans les micro-colonies, où les bactéries semblent figées. Nous ne conservons donc pour l'analyse qui suit que les bactéries dont la surface est inférieure à $20 \ \mu m^2$, qui sont détachées des micro-colonies.

La proportion de bactéries motiles calculée environ trois heures après introduction des Synechocystis dans la cellule de mesure est donnée par les symboles de la figure 4.7. Les valeurs sont dans la continuité des résultats de la partie 4.1 obtenus sur une heure dans une cellule fermée : plus la surface est dure, plus la proportion de bactéries motiles est importante. La figure 4.12(a) illustre l'évolution de cette proportion sur plusieurs jours : l'ordre des surfaces est conservé aux temps longs. Au fur et à mesure que le temps passe, de plus en plus de bactéries arrêtent de se déplacer et la proportion de bactéries motiles diminue. On remarque de manière intéressante que sur toutes les surfaces, p_{act} connaît un minimum après deux jours passés dans la cellule de mesure. Une explication de l'existence de ce minimum sera proposée en partie 4.3, on peut néanmoins d'ores et déjà constater que la remontée coïncide avec le début de la croissance bactérienne tracé en figure 4.13.

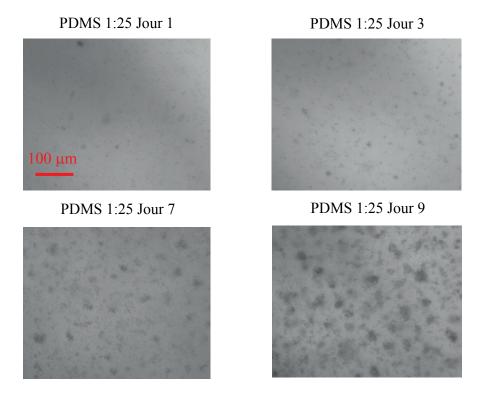


FIGURE $4.10-\,$ Exemple de captures d'écran réalisées sur la surface de PDMS 1:25, pour différents jours.

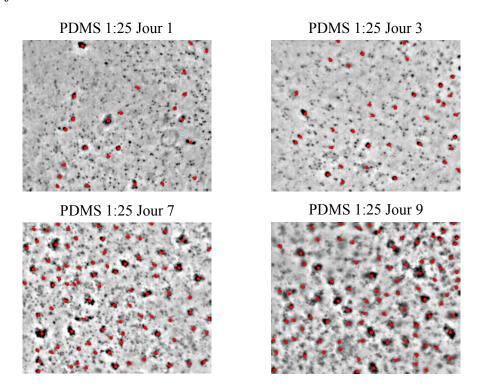


FIGURE 4.11 — Exemple de captures d'écran réalisées sur la surface de PDMS 1:25, pour différents jours. Les images sont post-traitées avec ImageJ. Les micro-colonies détectées sont indiquées avec des points rouges.

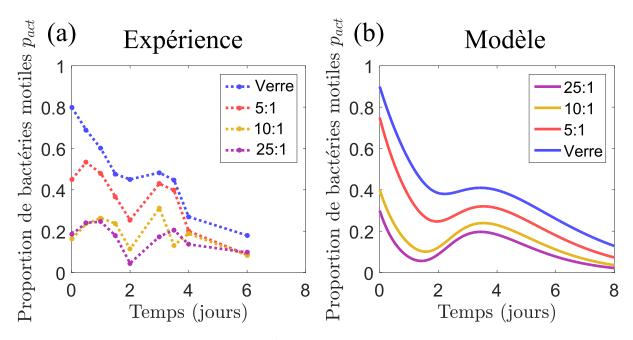


FIGURE 4.12 – (a) Trait pointillé : Évolution temporelle de la proportion de bactéries motiles, pour différentes surfaces : PDMS 1:25 (violet), PDMS 1:10 (jaune), PDMS 1:5 (rouge) et verre (bleu). (b) Trait plein, modèle analytique obtenu avec l'équation 4.11.

4.2.2 Croissance et division des bactéries

Au cours de ce type d'expérience suivie sur une échelle de temps de plusieurs jours, la population de Synechocystis croît par division cellulaire. La figure 4.13, qui présente l'évolution temporelle du nombre de bactéries au cours du temps N(t), permet de quantifier cette croissance. N(t) est le résultat d'une moyenne sur quatre images, prises avec la même caméra sur des zones différentes de la surface, de dimension 800×640 pixels. Des détails supplémentaires sont donnés en annexe A.1.

L'évolution temporelle de N(t) ne présente pas de différence significative entre les différentes surfaces. La population est stable pendant les deux premiers jours, ce qui correspond à une phase de latence, avant d'augmenter significativement ensuite. Le taux de croissance semble fléchir à la fin de l'expérience. Cela implique que le système a atteint la fin de sa phase de croissance exponentielle pour entrer dans sa phase stationnaire. D'autre part, le développement de structures tridimensionnelles, non résolues avec le système expérimental actuel, ne permet plus de dénombrement précis : il est possible que l'on sous-estime la population totale au delà de 6-7 jours d'expérience.

4.2.3 Des morphologies de biofilm différentes

Les résultats précédents indiquent que la motilité des *Synechocystis* dépend de la surface sur laquelle elles se déplacent, tandis que leur dynamique de croissance est similaire.

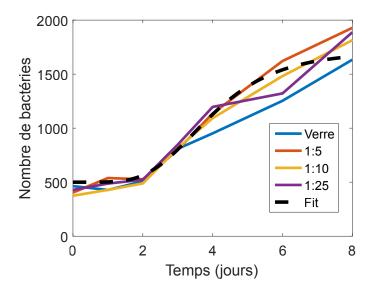


FIGURE 4.13 – Nombre de bactéries détectées sur les différentes surfaces en fonction du temps. La surface considérée est de $600 \times 500~\mu m$. PDMS 1:25 (violet), PDMS 1:10 (jaune), PDMS 1:5 (rouge) et verre (bleu). Le trait pointillé noir correspond au modèle analytique de Gompertz adapté [Zweitering, 1990].

Nous étudions ici l'influence spécifique de la dynamique sur la morphologie du biofilm. Les images montrées en figure 4.14 ont été prises huit jours après l'introduction des bactéries dans la cellule de mesure.

Sur ces images, les bactéries individuelles apparaissent comme de petits points sombres, tandis que les micro-colonies les plus grosses apparaissent comme des taches noires. Les images des surfaces les plus molles (PDMS 1:10 et PDMS 1:25) présentent ainsi de très nombreuses micro-colonies réparties sur toute la surface, tandis que les surfaces les plus dures (PDMS 1:5 et verre) présentent plutôt quelques micro-colonies sur une couche bactérienne mieux répartie. La taille des micro-colonies ne présente pas de différences significatives entre les surfaces. La structure du biofilm dépend donc de la rigidité de la surface : plus celle-ci est molle, plus les *Synechocystis* ont tendance à se regrouper en micro-colonies.

Afin de quantifier ces appréciations qualitatives, nous définissons une procédure pour calculer le nombre de micro-colonies présentes en surface, dont les détails sont donnés en annexe A.2. La figure 4.11 présente les résultats du protocole de traitement d'images pour la surface de PDMS 1:25, à différents temps. Le fond est constitué par les images post-traitées avec ImageJ, et les points rouges aux micro-colonies détectées. Elle peut être comparée à la figure 4.10 qui donne les images brutes correspondantes. Cette représentation permet de mesurer fidèlement l'augmentation progressive du nombre de micro-colonies présentes en surface.

Le résultat quantitatif de cette analyse est donné en figure 4.15, qui présente l'évolution

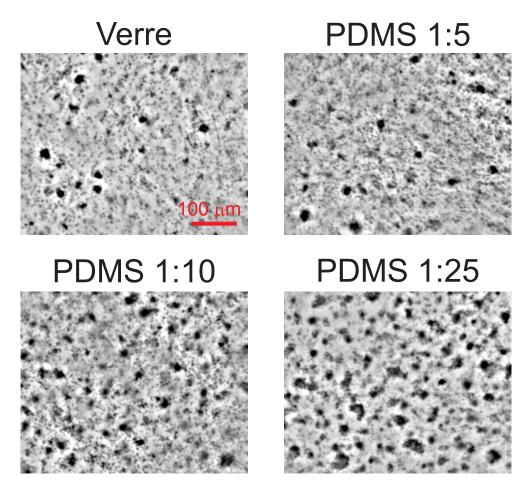


FIGURE 4.14 – Images représentatives des différentes surfaces après 8 jours de croissance de biofilm. Les images sont post-traitées avec ImageJ.

temporelle du nombre de micro-colonies détectées, sur différentes surfaces. Un certain nombre de micro-colonies sont détectées initialement, résultant probablement d'agrégation dans la suspension. Comme observé qualitativement sur la figure 4.14, le nombre final de micro-colonies est d'autant plus important que la surface est molle. On constate que notamment sur les deux PDMS les moins durs, il y a une augmentation rapide du nombre de micro-colonies deux jours après l'introduction des bactéries dans la cellule de mesure.

Nous avons d'autre part cherché à évaluer les interactions entre les bactéries et les différentes surfaces. Nous avons procédé à un rinçage turbulent de la surface en projetant de l'eau distillée à l'aide d'une pipette dont le bec est situé à 2 cm de la surface. Des images représentatives des surfaces observées après rinçage sont données en figure 4.16. De nombreuses *Synechocystis* ont été décrochées de la surface en verre, tandis qu'elles sont davantage restées sur les autres surfaces. Il semble donc que ces bactéries adhèrent différemment selon la dureté de la surface, et que plus celle-ci est molle, plus les *Synechocystis* sont accrochées.

La proportion de particules parties lors du rinçage p_{rinc} est définie par $p_{rinc} = \frac{N_m - N_r}{N_m}$, où N_m est le nombre de micro-colonies détectées à la fin de l'expérience avant rinçage et

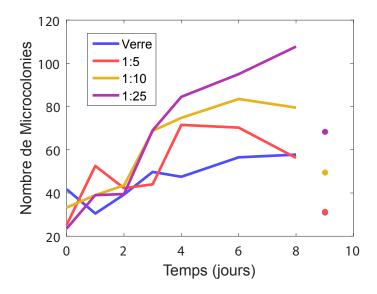


FIGURE 4.15 – Trait plein : Évolution temporelle du nombre de micro-colonies, pour différentes surfaces : PDMS 1:25 (violet), PDMS 1:10 (jaune), PDMS 1:5 (rouge) et verre (bleu). Avec le même code couleur, les points indiquent le nombre de micro-colonies restant sur la surface après son rinçage.

 N_r le nombre après rinçage. Le tableau 4.1 récapitule les valeurs obtenues, et montre bien que les Synechocystis semblent plus fermement attachées aux surfaces les plus molles. Les points correspondants sont également tracés sur la figure 4.15. Le nombre étant similaire entre le verre et le PDMS 1:5, les points sont confondus sur la figure. Les bactéries adhèrent plus fortement aux substrats les plus mous.

| Surface | $p_{rinc}(\%)$ |
|-----------|----------------|
| Verre | 47 |
| PDMS 1:5 | 44 |
| PDMS 1:10 | 38 |
| PDMS 1:25 | 37 |

TABLEAU 4.1 – Proportion de bactéries parties lors du rinçage.

4.3 Description analytique

Nous avons observé dans la partie précédente des dynamiques spécifiques avec plus de bactéries non motiles sur les substrats mous, et une plus grande persistance du mouvement sur les substrats durs. La croissance des bactéries est similaire sur toutes les surfaces, mais nous observons plus de micro-colonies sur les surfaces les plus molles, où les bactéries semblent adhérer davantage. Le tableau 4.2 résume toutes ces observations.

Nous proposons à présent quelques pistes que nous pensons utiles pour faire émerger la

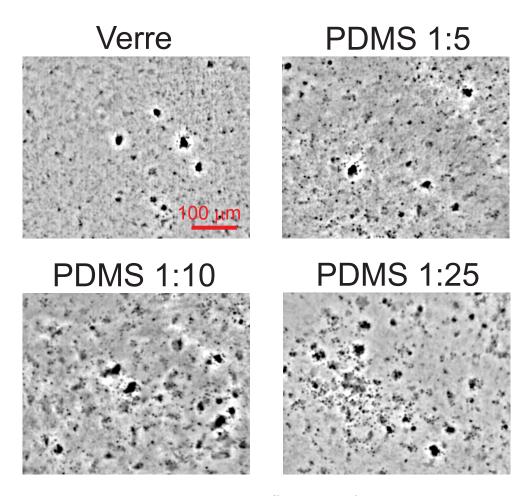


FIGURE 4.16 – Images représentatives des différentes surfaces après 8 jours de croissance de biofilm, puis après avoir rincé la surface. Les images sont post-traitées avec ImageJ.

| | Surface dure | Surface molle |
|-----------------------------|--------------|---------------|
| Nombre de bactéries motiles | + | - |
| Persistance du mouvement | + | - |
| Croissance des bactéries | = | = |
| Nombre de micro-colonies | - | + |
| Adhésion des cellules | - | + |

TABLEAU 4.2 – Récapitulatif des résultats expérimentaux de la partie 4.2.

physique du développement différencié de biofilm selon la surface. Ces ingrédients seront implémentés ensuite dans une simulation numérique présentée en partie 4.4.

4.3.1 Croissance des bactéries

L'un des premiers ingrédients de la croissance du biofilm est la division cellulaire. Le modèle minimal de cette division est le cas où chaque bactérie se divise au bout d'un certain temps τ_{α} . L'évolution de la population est alors donnée par l'équation différentielle

suivante:

$$\frac{dN}{dt} = \frac{1}{\tau_{\alpha}} N(t)$$

Dans ce modèle minimal, la population croît toujours exponentiellement. Cette absence de limite est en contradiction avec de nombreuses observations de croissances, qui montrent qu'une population atteint souvent une valeur seuil N_{∞} . Cette valeur seuil s'explique par l'existence de contraintes biologiques (nutriments, lumière disponibles) ou spatiales (espace disponible), qui imposent une "capacité" maximale. L'existence d'une telle capacité est prise en compte dans le modèle de Verhulst [Verhulst, 1938], qui est décrit par l'équation différentielle suivante :

$$\frac{dN}{dt} = \frac{1}{\tau_{\alpha}} \left(1 - \frac{N(t)}{N_{\infty}} \right) N(t) \tag{4.4}$$

et dont la solution est :

$$N(t) = \frac{N_i N_{\infty}}{N_i + (N_{\infty} - N_i) \times exp(-\frac{t}{\tau_{\alpha}})}$$

$$\tag{4.5}$$

L'équation 4.5 est un modèle classique de croissance de population, avec un seul paramètre temporel τ_{α} qui correspond au temps de division en l'absence de contrainte exercée par le milieu de culture. Dans cette équation, N_i désigne la population initiale. Cependant, ce modèle implique que le taux de croissance maximum sera atteint au début de la croissance de la population, ce qui ne reflète pas toujours la réalité. Dans notre cas particulier, le maximum de croissance semble plutôt être atteint environ deux jours après le début de l'expérience (voir figure 4.13).

Le modèle analytique que nous avons utilisé pour reproduire les courbes expérimentales est le modèle de Gompertz, adapté avec des paramètres représentatifs de nos expériences [Zweitering, 1990, Tjørve and Tjørve, 2017]. Il correspond à la résolution de l'équation différentielle 4.6, pour laquelle $\Delta N = N(t) - N_i$ est la solution :

$$\frac{d(\Delta N)}{dt} = \frac{e\,\mu}{A}log\left(\frac{A}{\Delta N(t)}\right)\Delta N(t) \tag{4.6}$$

Comme précédemment, N_i représente le nombre de bactéries initial et N_{∞} le nombre final, qui correspond à la "capacité" du milieu de culture. On pose $A = N_{\infty} - N_i$ le nombre de bactéries apparues durant le temps d'analyse. Le paramètre μ est utilisé pour définir le maximum de croissance. La constante e est l'exponentielle de 1.

La solution de l'équation différentielle 4.6 est :

$$N(t) = N_i + (N_{\infty} - N_i) \exp\left(-\exp\left(\frac{e\,\mu}{(N_{\infty} - N_i)(\lambda - t) + 1}\right)\right) \tag{4.7}$$

où l'on a introduit le paramètre λ , qui définit un temps de retard pour prendre en compte la phase de latence de la croissance. Cette phase correspond à une adaptation progressive des bactéries à leur milieu. Le modèle établi prédit le début de la division cellulaire à partir du temps λ , et prévoit une "capacité" maximum du milieu qui induit une saturation du nombre de bactéries présentes en surface.

Nous avons fixé λ =2.1 jours, en nous appuyant sur le temps auquel la croissance commence sur la figure 4.13. Nous avons ensuite ajusté la valeur du taux de croissance maximal pour obtenir finalement $\mu = \frac{1000}{3}$ jours⁻¹ (le taux de croissance maximal est de 333 bactéries par jour). Le nombre de bactéries initial N_i quant à lui estimé à 500, et N_{∞} à 1700. Ce modèle, utilisé avec les deux paramètres λ et μ définis précédemment, est superposé aux données expérimentales en figure 4.13. Les valeurs sont récapitulées dans le tableau 4.3.

| Paramètre | Valeur |
|--------------|--------------------------|
| λ | 2.1 jours |
| μ | 333 jours^{-1} |
| N_i | 500 |
| N_{∞} | 1700 |

TABLEAU 4.3 – Paramètres utilisés pour la modélisation de la croissance bactérienne.

4.3.2 Proportion de bactéries actives

Hormis la croissance de la population bactérienne, la croissance du biofilm dépend aussi de la dynamique des cellules. Nous utilisons la proportion de bactéries motiles pour quantifier cette dynamique. Les expériences en cellule fermée (voir figure 4.7) indiquent que la proportion dépend des surfaces. Les expériences aux temps longs dans la boîte de Pétri (voir figure 4.12) confirment cette tendance et montrent que les bactéries restent motiles plus longtemps sur les surfaces dures.

Afin de rendre compte de ces observations, on considère que chaque bactérie est motile pendant un certain temps τ_m , avant que sa position ne soit figée. Pour rendre compte de la diversité cellulaire, les temps de motilité τ_m sont pris dans une distribution exponentielle de moyenne $\tau_{mot,S}$, un temps caractéristique qui dépend de la surface considérée. Plus la surface est molle, plus ce temps est court. La loi de probabilité pour le temps de motilité τ_m est alors donnée par :

$$p(\tau_m) = \frac{1}{\tau_{mot,S}} e^{-\frac{\tau_m}{\tau_{mot,S}}} \tag{4.8}$$

La fonction de répartition d'une telle loi, c'est-à-dire la probabilité de $p(\tau_m \leq \Delta)$, où

 Δ est un intervalle de temps quelconque, est alors donnée par l'équation suivante :

$$p(\tau_m \le \Delta) = 1 - e^{-\frac{\Delta}{\tau_{mot,S}}} \tag{4.9}$$

De plus, on a : $p(\tau_m \leq \Delta) + p(\tau_m > \Delta) = 1$, quelle que soit la valeur de $\Delta > 0$.

On obtient finalement la probabilité qu'une bactérie soit toujours motile après un intervalle de temps Δ :

$$p(\tau_m > \Delta) = e^{-\frac{\Delta}{\tau_{mot,S}}} \tag{4.10}$$

L'intervalle de temps Δ de l'équation 4.10 représente physiquement le temps depuis lequel la bactérie considérée est présente sur la surface. On peut alors distinguer deux sous-populations de bactéries : les bactéries déjà présentes initialement en solution, pour lesquelles Δ est égal au temps absolu t écoulé depuis l'introduction des Synechocystis dans la cellule de mesure ; et les bactéries qui sont apparues par division cellulaire à l'instant t', pour lesquelles $\Delta = t - t'$.

Le nombre de bactéries présentes à l'instant t, N(t), est calculé avec l'équation 4.7, et le taux d'accroissement de la population $g(t) = \frac{dN}{dt}$ est obtenu à partir de l'équation 4.6. On calcule alors p_{act} la proportion de bactéries motiles à l'aide de l'équation 4.10 pour obtenir :

$$p_{act}(t) = \frac{p_i N_i e^{-t/\tau_{mot,S}} + \int_0^t g(t') e^{-(t-t')/\tau_{mot,S}} dt}{N(t)}$$
(4.11)

où p_i la proportion initiale de bactéries motiles.

Dans cette équation, le premier terme désigne la contribution des bactéries initialement présentes, et le deuxième terme la contribution des bactéries apparues par division cellulaire. Ce deuxième terme est en fait le produit de convolution du taux d'accroissement g(t) par la probabilité que les bactéries soient toujours motiles après un temps Δ , $p(\tau_m > \Delta)$ donné par l'équation 4.10.

Le nombre de bactéries N(t) et le taux d'accroissement g(t) sont indépendants de la surface considérée, et p_i est imposé par les valeurs des courbes expérimentales de la figure 4.12. Sur cette même figure on voit que la solution numérique de la formule 4.11 permet de rendre compte des données expérimentales comme montré figure 4.12, avec un seul paramètre ajustable $\tau_{mot,S}$. Les valeurs de $\tau_{mot,S}$ qui ajustent le mieux les données expérimentales sont consignées dans le tableau 4.4 en même temps que les proportions p_i .

Cette description permet de capturer les tendances principales qui émergent des données expérimentales : l'ordre des surfaces est respecté, la remontée qui est observée dans la pro-

| Surface | $\tau_{mot,S}$ (s) | p_i |
|-----------|--------------------|-------|
| Verre | $1,7.10^5$ | 0.9 |
| PDMS 1:5 | $1,2.10^5$ | 0.75 |
| PDMS 1:10 | 8.10^4 | 0.4 |
| PDMS 1:25 | 6.10^4 | 0.3 |

TABLEAU 4.4 – Paramètres $\tau_{mot,S}$ et p_i .

portion de bactéries actives (notée en fin de la partie 4.2) se retrouve par l'équation 4.11. Pour voir quel est le paramètre influençant la position de ce minimum de particules actives, nous avons testé numériquement plusieurs valeurs pour le paramètre λ . Nous avons remarqué que la position du minimum coïncide à chaque fois avec la valeur choisie pour λ , qui représente le temps de latence avant le début de la croissance. Cette étude numérique implique que la division cellulaire permettrait de renouveler la dynamique moyenne en introduisant des bactéries motiles dans le système.

Nous proposons donc un système d'équation qui couple la croissance bactérienne et la dynamique moyenne, pour ramener l'évolution de la proportion de bactéries motiles à la définition d'un temps caractéristique de motilité $\tau_{mot,S}$. Ce temps est d'autant plus élevé que la surface est dure. Cette description simple de "l'activité" des bactéries est un ingrédient important des simulations numériques que nous présentons ensuite.

4.4 Simulations numériques de la formation du biofilm

La croissance de la population bactérienne étant indépendante de la surface considérée, ce phénomène ne peut pas expliquer les différences de morphologies de biofilm constatées sur la figure 4.14 dues au nombre de micro-colonies. En revanche, la dynamique moyenne est nettement plus lente sur les surfaces molles.

D'autre part, des interactions existent entre les bactéries, qui peuvent se regrouper et éventuellement se détacher. Ces interactions sont décrites par un potentiel représenté par une distance d'interaction, qui définit une zone où les interactions sont possibles autour de la bactérie, et des temps caractéristiques qui caractérisent une fréquence d'accroche et de détachement [Taktikos et al., 2015]. Le couplage entre dynamique, croissance et morphologie du biofilm étant complexe, nous proposons des simulations numériques pour relier les modèles élémentaires (croissance et motilité) décrits dans la partie précédente et voir leur influence dans la formation d'un biofilm.

Les simulations numériques sont basées sur la méthode de Monte Carlo, où l'on étudie le comportement moyen d'une population au comportement probabiliste. Des articles récents traitent de la modélisation de la croissance de biofilm induite par les pili de la Neisseria gonorrhoeae [Weber et al., 2015, Taktikos et al., 2015]. L'approche considérée ici est différente dans la mesure où nous ne détaillons pas le comportement des pili, mais prenons en compte la division cellulaire et une probabilité d'être motile pour se déplacer via le paramètre $\tau_{mot,S}$.

La simulation est initialisée avec un certain nombre de particules N_i , qui resteront motiles pendant un temps choisi aléatoirement dans la distribution donnée en équation 4.8. La division cellulaire va progressivement augmenter le nombre de particules présentes en surface, en suivant l'équation 4.7. Les particules peuvent se regrouper pour former une micro-colonie lorsqu'elles se trouvent à une distance inférieure à d_{lim} l'une de l'autre. On associe une probabilité d'accroche via un temps caractéristique T_{col} . Des particules associées peuvent s'échapper selon une probabilité caractérisée par un temps T_{esc} . Les paramètres utilisés sont répertoriés dans les tableaux 4.4 et 4.5. Des détails supplémentaires sont donnés en annexe A.3.

| Paramètre | Signification | Valeur |
|-----------|------------------------|----------------------|
| d_{min} | Distance d'interaction | $6 \ \mu \mathrm{m}$ |
| T_{col} | Temps d'accroche | $6.10^4 { m s}$ |
| T_{esc} | Temps de détachement | $1.10^{4} s$ |

TABLEAU 4.5 – Valeurs choisies pour les paramètres de simulation.

Les positions des particules obtenues après simulation numérique sont représentées en figure 4.17, où les micro-colonies sont en rouge et les autres particules en noir. La figure 4.17(a) représente les positions après huit jours de croissance sur surface molle et la figure 4.17(b) sur une surface dure. Numériquement, les surfaces "molles" et "dures" sont caractérisées par des temps caractéristique de motilité $\tau_{mot,S}$ et des proportions initiales de particules motiles p_i différents, comme observé dans les expériences. Nous obtenons effectivement plus de micro-colonies sur la surface molle que sur la surface dure, et également davantage de zones vides. On retrouve la plus grande hétérogénéité de densité obtenue expérimentalement sur les surfaces molles.

La figure 4.18 reproduit la figure 4.15 en comparant le nombre de micro-colonies expérimentales et celui obtenu par simulation, et indique que les tendances numériques sont similaires les résultats expérimentaux : on obtient une première phase d'augmentation du nombre de micro-colonies (2-4 jours), suivi d'une phase de stagnation du nombre à temps longs (6 jours). La concordance entre les simulations et les expériences suggèrent que $\tau_{mot,S}$ pourrait représenter un paramètre très important dans la mesure où sa seule variation donne lieu à des morphologies totalement différentes. Plus les bactéries sont motiles, plus leur propension à rester groupées est faible, ce qui limite les chances d'apparitions de micro-colonies sur les surfaces les plus dures.

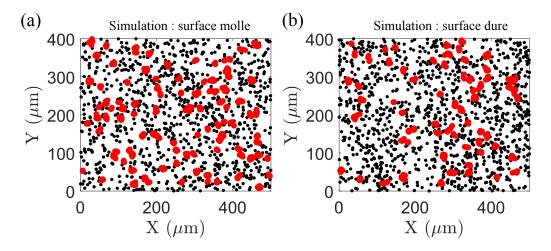


FIGURE 4.17 – Images repérant les positions des particules après simulation numérique. Les points rouges correspondent aux micro-colonies, et les points noirs aux autres particules. (a) Résultat correspondant à une surface molle (PDMS 1:25) et (b) Résultat correspondant à une surface dure (Verre).

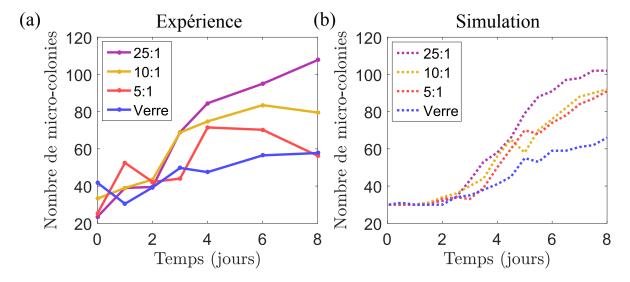


FIGURE 4.18 – (a) Trait plein : nombre de micro-colonies détectées expérimentalement, pour différentes surfaces : PDMS 1:25 (violet), PDMS 1:10 (jaune), PDMS 1:5 (rouge) et verre (bleu). (b) Trait pointillé : résultats obtenus par les simulations numériques décrites dans la partie 4.4 et en annexe A.3.

4.5 Discussion

La différence principale de comportement des *Synechocystis* sur les différentes surfaces étudiées est leur capacité à être motile. On peut penser que la non-motilité résulte d'un mécanisme d'adhésion entre les cellules et la surface. En effet, les images de la figure 4.16 suggèrent que les cyanobactéries étudiées adhèrent plus sur les surfaces molles. L'étude des mécanismes moléculaires d'interaction se situe en dehors du cadre définit pour ce manuscrit, mais nous discutons brièvement des différentes pistes envisageables.

4.5. DISCUSSION 105

La première serait l'adaptation du métabolisme des *Synechocystis* à la dureté du substrat sur lequel elles évoluent. En effet, les résultats expérimentaux du chapitre 3 montrent que la dynamique diffusive des bactéries ralentit lorsqu'elles détectent des exopolysaccharides. Cette détection peut être chimique, mais aussi mécanique, les EPS constituant une matrice plus molle que le substrat. La capacité des micro-organismes à "sentir" les surfaces sur lesquelles ils se déplacent, aussi appelée "mechanosensing", est connue, et le rôle de cette faculté dans l'adaptation aux conditions extérieures a été mis en évidence par exemple dans [Ellison and Brun, 2015]. Cependant, le détail du mécanisme par lequel les bactéries adaptent leur mouvement reste encore à préciser.

On peut aussi envisager que les propriétés viscoélastiques du substrat modifient la quantité d'énergie à mettre en oeuvre pour le déplacement. On peut quantifier les propriétés viscoélastiques d'un matériau par le facteur de perte, qui est le rapport entre son module de perte et son module élastique, ce qui correspond au ratio entre l'énergie dissipée et l'énergie stockée. En général, plus le module élastique est élevé, plus le facteur de perte est faible. C'est aussi le cas pour les PDMS utilisé ici [Murrell et al., 2011, Nase et al., 2013]. La motilité sur des surfaces molles engendre donc davantage de pertes. Ce mécanisme pourrait expliquer pourquoi nous observons une motilité plus importante sur les surfaces rigides.

Les propriétés élastiques du substrat peuvent aussi agir sur la mécanique de contact entre les cellules et la surface. Un des modèles classique du contact est la théorie Johnson-Kendall-Robert (JKR). Elle peut s'appliquer à des cellules vivantes si leur membrane est suffisamment rigide [Chu et al., 2005]. Cette théorie fait alors intervenir un module d'Young de contact E^* calculé comme la moyenne harmonique de celui de la cellule et de celui du substrat. Le rayon de la zone de contact a dépend alors de la rigidité relative entre la particule et la surface, et il est proportionnel à $E^{*-1/3}$. La force d'adhésion F_{adh} est ensuite définie par $F_{adh} = \pi a^2 \gamma$, où a est le rayon de l'aire de contact établi précédemment et γ l'énergie de surface. Il résulte de cette formule que $F_{adh} \sim E^{*-2/3}$, et donc que la force d'adhésion augmente quand la dureté du substrat diminue. Sous condition de validité de la théorie JKR, ces considérations mécaniques vont dans le sens des observations expérimentales : les bactéries adhèrent plus sur des surfaces molles. Afin de vérifier cette proposition, il faudrait observer à haute résolution des Synechocystis en microscopie inverse, pour voir si l'aire de contact dépend bien de la rigidité du substrat.

Enfin, l'adhésion peut être due aux liaisons chimiques établies par les pili avec les surfaces. Dans ce cas, la durée de vie d'une liaison peut être étudiée avec le modèle de Bell [Bell, 1978] qui établit qu'elle dépend d'un potentiel de surface et de la force mécanique exercée sur cette liaison. Ce modèle a été appliqué récemment à la modélisation du comportement non-élastique des pili [Björnham and Axner, 2010, Dansuk and Keten, 2018]. En utilisant la microscopie atomique [Dufrêne, 2015], on pourrait en isolant une bactérie, quantifier son adhésion et la durée de sa liaison avec le substrat.

4.6 Conclusion

Nous avons dans ce chapitre étudié l'influence de la dureté de la surface sur la colonisation d'une surface par des *Synechocystis*. Des études préliminaires réalisées en cellule fermée indiquent une différence de dynamique, non pas dans les caractéristiques du mouvement intermittent mis en évidence dans la partie 3.3, mais plutôt dans la proportion de bactéries en mouvement. Les résultats montrent que la proportion de bactéries motiles est d'autant plus faible que la surface est molle.

Nous avons ensuite réalisé une série d'expériences sur une échelle de temps de l'ordre de la semaine dans une cellule de mesure assurant des conditions de lumière et de nutriments suffisantes pour la croissance des bactéries. Après une semaine de croissance, les morphologies de biofilm observées sont différentes sur les surfaces d'étude : les micro-colonies sont plus nombreuses sur les surfaces molles. De plus, la proportion de bactéries motiles diminue plus rapidement sur ces mêmes surfaces. En revanche, la croissance bactérienne est similaire d'une surface à l'autre.

Nous avons construit un système d'équations pour expliquer l'évolution temporelle de la population motile. Ce modèle a servi de support à une simulation dynamique basée sur le comportement probabiliste de particules, qui permet de reproduire les tendances des caractéristiques de la formation de biofilm en fonction des surfaces. Les simulations prennent en compte la croissance bactérienne, et le ralentissement de la dynamique, qui dépend des surfaces. Ainsi, elles montrent comment de différences de dynamique diffusive peuvent émerger des morphologies de biofilm variées, dominées par le temps $\tau_{mot,S}$ au-delà duquel une bactérie cesse de diffuser.

Chapitre 5

Réponse à un échelon d'intensité lumineuse

La Synechocystis est un organisme phototrophe, pour lequel la photosynthèse permet l'assimilation de l'énergie nécessaire à la croissance. La lumière environnante constitue donc un paramètre important de son métabolisme. Le contrôle de la motilité de microorganismes par la lumière est l'objet de nombreux travaux récents [Wilde and Mullineaux, 2017, Schuergers et al., 2017, Chau et al., 2017]. Si le mouvement phototactique des Synechocystis a déjà été signalé et étudié, la cause de la directionnalité du mouvement reste sujette à discussion. La phototaxie peut être décrite soit comme la réponse à la perception d'un gradient d'intensité lumineuse, par analogie avec la chimiotaxie qui définit la réponse à un gradient de nutriments; soit comme résultant d'une directionnalité de la lumière [Chau et al., 2017]. L'étude du mouvement de Synechocystis soumises à diverses conditions lumineuses isotropes pourrait apporter des éléments nouveaux dans cette discussion en discriminant les effets "dynamiques", en termes de temps caractéristiques, et les effets directionnels en rapport avec l'orientation du mouvement.

Ce chapitre vise à caractériser l'influence de la luminosité sur la motilité des bactéries. Deux configurations différentes sont étudiées, en premier lieu la réponse à des variations d'intensités lumineuses avec un éclairage isotrope, et ensuite la dynamique diffusive biaisée par un éclairage directionnel : la phototaxie. Le dispositif expérimental utilisé est celui décrit dans la partie 2.1. Pour les expériences en lumière isotrope, la source de lumière du microscope (figure 2.1) peut être ajustée afin d'obtenir différentes intensités lumineuses, on utilisera une intensité "normale" et une intensité "forte". Quant à la lumière directionnelle, elle est obtenue avec la LED de la figure 2.7 page 54. La figure 5.1 schématise les dispositifs expérimentaux utilisés dans ce chapitre : (a) pour la partie 5.1 et (b) pour la partie 5.2.

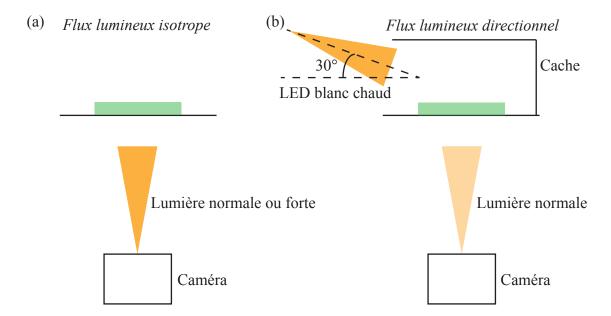


FIGURE 5.1 — Schéma des dispositifs expérimentaux utilisés dans ce chapitre. La cellule de mesure est représentée en vert. (a) En conditions isotropes, les variations de lumière sont apportées par le dispositif d'éclairage associé au microscope. (b) Un flux de lumière directionnel peut être ajouté par une LED "blanc chaud". Un cache permet de maximiser la part de lumière provenant de la LED par rapport à l'éclairage naturel environnant. L'intensité lumineuse du dispositif d'éclairage du microscope est réglée à sa valeur habituelle, utilisée pour toutes les expériences décrites jusqu'à présent. Le reste du dispositif est décrit en figure 2.1 page 48.

5.1 Conditions isotropes

5.1.1 Modification de la dynamique

La littérature concernant la *Synechocystis* mentionne une corrélation positive entre la vitesse moyenne de déplacement et l'intensité lumineuse [Choi et al., 1999]. Cependant, la diffusion de cette bactérie étant intermittente, il est nécessaire d'étudier plus en détail la dynamique par l'intermédiaire des temps caractéristiques, de la longueur des runs, ainsi que la vitesse moyenne des périodes de run. Pour cela, les cyanobactéries sont introduites dans la cellule de mesure décrite en figure 2.2 page 50, puis placées dans le dispositif expérimental décrit en figure 5.1(a). Le dispositif d'éclairage (Illuminateur Fibre Optique Dolan-Jenner MI-150, Edmund Optics), qui assure une illumination suffisante pour l'enregistrement des images par microscopie, permet de régler l'intensité lumineuse désirée. La température de couleur de l'ampoule est de 3200 K, avec un pic de transmittance à 700 nm.

Les bactéries sont soumises à un flux lumineux variable sous forme d'échelons d'une heure, comme illustré en figure 5.2(a). Le flux lumineux "normal", dans les conditions expérimentales classiques utilisées dans le chapitre 3, est de 465 lux $(7 \mu \text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1})$. En

lumière forte, celui-ci passe à 665 lux (10.2 μ mol.m⁻².s⁻¹). Les mesures de flux lumineux ont été réalisées avec un luxmètre AMPROBE LM-120.

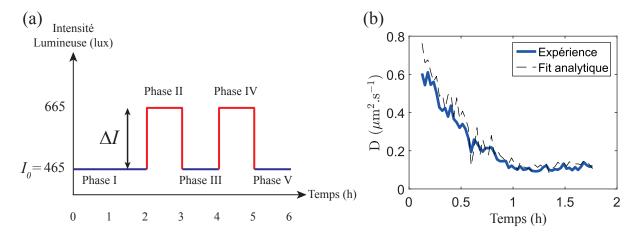


FIGURE 5.2 – (a) Schéma représentatif des variations d'intensité lumineuse subies par les bactéries. La différence de luminosité entre les créneaux est notée ΔI . Les différentes phases de l'expérience sont indiquées, où les chiffres impairs correspondent à une luminosité normale et les chiffres pairs à une luminosité forte. (b) Évolution temporelle du coefficient de diffusion pendant la phase I, et formule analytique correspondant à l'équation 3.12.

L'expérience totale dure six heures, et elle a été répétée trois fois. Il est délicat de la faire durer plus longtemps en raison de la dynamique transitoire observée dans le chapitre 4, qui entraine une chute globale du coefficient de diffusion aux temps longs. Nous n'étudierons pas ici les mécanismes de cette chute globale, qui peut être attribuée soit à un vieillissement progressif des cellules sur le temps long de l'expérience, soit à l'augmentation de l'épaisseur de la couche d'EPS, dont les effets sur la motilité ont été étudiés dans le chapitre 3.

On applique un premier échelon lumineux deux heures après l'introduction des cyanobactéries dans la cellule de mesure. Ce temps d'attente de deux heures permet de démarrer les expériences à partir d'un coefficient de diffusion "stabilisé", après l'atteinte du plateau caractéristique du coefficient de diffusion (voir par exemple la 3.2(b) page 59) et dont nous avons longuement discuté dans le chapitre 3. La figure 5.2(b) trace l'évolution du coefficient de diffusion D(t) pendant la phase I (éclairage normal), et montre que celui-ci est bien constant avant le début de la phase II (premier échelon). Le coefficient de diffusion est calculé à partir de l'équation 3.3 page 59 qui donne $MSD(t, \Delta)$.

Nous nous intéressons dans un premier temps à la différence de dynamique suivant les conditions d'éclairage. Suite à l'application d'échelons de forte intensité lumineuse, D augmente brusquement, puis relaxe ensuite plus lentement pour se stabiliser. Lorsque la lumière redevient normale (application d'échelons "négatifs"), le comportement est symétrique : D diminue d'abord avant de relaxer vers une valeur plateau D_{∞} . Ces observations se répètent à chaque nouvel échelon. Pour comparer plus facilement les coefficients

de diffusion obtenus malgré la dérive globale du coefficient de diffusion (qui tend à diminuer aux temps longs), on les renormalise par la valeur D_{∞} atteinte à la fin de la phase considérée (phases II à V de la figure 5.2). La figure 5.3 présente les évolutions temporelles des coefficients de diffusion ainsi renormalisés pour les phases II à V de l'une des expériences réalisées.

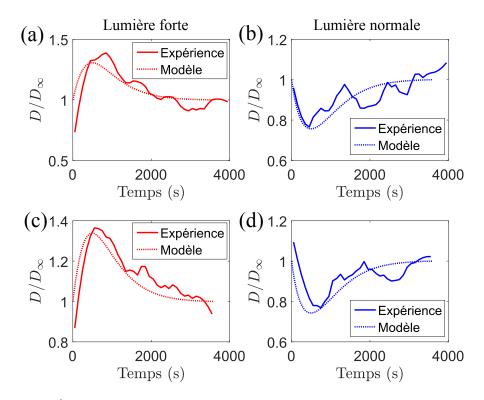


FIGURE 5.3 – Évolution temporelle des coefficients de diffusion normalisés par leur valeur finale. Trait plein : résultats expérimentaux. Trait pointillé : formule analytique (équation 5.10). Les résultats sont donnés pour les phases II à V (a-d) respectivement. Voir le schéma illustratif de la numérotation des échelons en figure 5.2(a).

Pour avoir une connaissance plus fine des détails de la dynamique sous-jacente, nous traçons en figure 5.4(a) et (b) les distributions de probabilité de déplacement suivant la direction horizontale, pour les deux types d'éclairage. Ces distributions sont symétriques, les déplacements sont donc isotropes. On note cependant des différences de formes entre les distributions obtenues sous éclairage normal et celles obtenues sous forte intensité lumineuse. L'amplitude du pic central est plus haute dans les conditions normales d'éclairage, signe d'une plus grande propension des bactéries à être dans une période de "tumble". Dans le même temps, la queue des distributions prend une forme exponentielle. Sous une forte intensité lumineuse, les queues des distributions sont plus arrondies et se rapprochent d'une fonction Gaussienne aux temps longs, comme l'illustre la figure 5.4(c).

Sur ces distributions de déplacements, en vertu du théorème central limite, on s'attend à retrouver une forme Gaussienne lorsque les déplacements sont indépendants entre eux. La motilité des *Synechocystis* étant caractérisée par l'existence de périodes de "runs" pen-

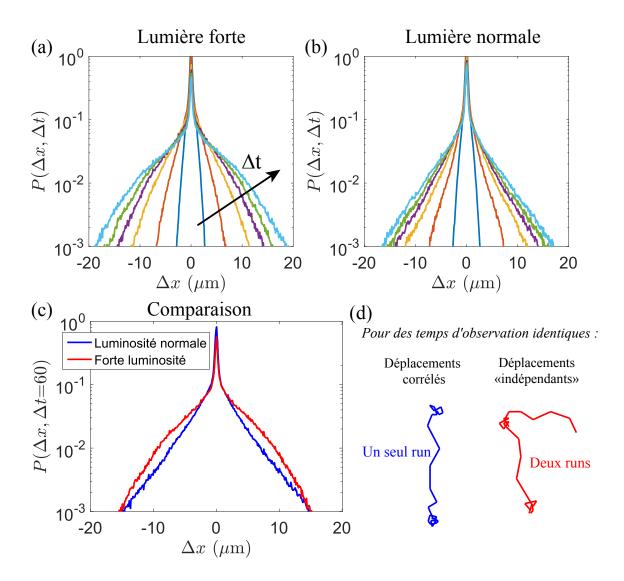


FIGURE 5.4 – Distribution des probabilités de déplacement suivant une direction, pour les instants Δt =2, 10, 30, 50, 70 et 100s. La flèche indique les temps croissants. (a) Pendant la phase II (lumière forte). (b) Pendant la phase III (lumière normale). (c) Superposition des distributions de déplacements entre les phases II (en rouge) et III (en bleu), pour un intervalle Δt =60 s. (d) Schéma illustrant des portions de trajectoires de 60 secondes en lumière normale (bleu) et en lumière forte (rouge).

dant lesquels les déplacements sont directionnels, une forme Gaussienne émerge lorsque plusieurs "runs" ont eu lieu au cours de l'intervalle de temps considéré. C'est pourquoi les distributions aux temps courts ne présentent pas de queues arrondies sur les figures 5.4(a) et (b). En revanche, les formes différentes des distributions tracées en figure 5.4(c) indiquent que pour Δt =60 secondes, les mouvements sont plus corrélés en lumière normale qu'en lumière forte. Ces résultats suggèrent que davantage de runs ont pu avoir lieu pendant cet intervalle de temps en lumière forte. La discussion est schématisée par le schéma tracé en figure 5.4(d).

Les formes différentes des distributions de déplacement signalent ainsi que les temps

caractéristiques de "run" et de "tumble" peuvent varier au gré des changements de luminosité. Nous appliquons sur les trajectoires le critère de séparation entre périodes de "runs" et de "tumbles" défini dans la partie 3.3.2 (pour rappel : $\Delta x^*=0.9~\mu m$ et $V^*=0.22~\mu m.s^{-1}$). Pour vérifier la pertinence de ces choix dans le cadre de ces nouvelles expériences, nous avons superposé au coefficient de diffusion expérimental de la figure 5.2(b) le résultat de la formule analytique 3.12, que nous rappelons ici :

$$D \sim \frac{1}{4} \overline{V}_m^2 \frac{\langle \tau_{run}^2 \rangle}{\langle \tau \rangle}$$

Le bon accord entre données expérimentales et formule analytique indique que les critères utilisés pour détecter les périodes de "runs" et de "tumbles" sont toujours pertinents. Ces critères sont conservés pour dans toute cette partie.

Nous avons, pour chaque échelon des trois expériences, calculé l'évolution temporelle des temps moyens $\langle \tau_{run} \rangle$ et $\langle \tau_{tumble} \rangle$. Nous avons retiré de l'analyse les temps de "tumble" supérieurs à 200 secondes, en considérant que cela correspond à une bactérie qui arrête définitivement de se déplacer. Pour pouvoir comparer et moyenner les expériences entre elles, les temps sont renormalisées par leurs valeurs finales : $\overline{\tau}_{run}$ et $\overline{\tau}_{tumble}$. Les valeurs finales sont les valeurs moyennées après l'instant t=2500 secondes, qui correspond à l'atteinte d'une valeur plateau. La figure 5.5 schématise la normalisation pour un échelon de forte intensité lumineuse.

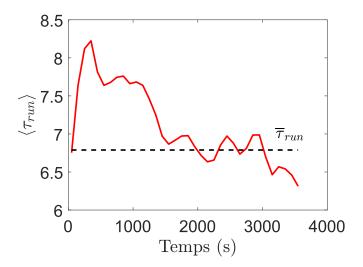


FIGURE 5.5 – Évolution temporelle du temps de "run" moyen pour un échelon lumineux. La valeur calculée pour la renormalisation $\overline{\tau}_{run}$ est indiquée par les pointillés. Elle est obtenue comme la moyenne de $\langle \tau_{run} \rangle$ pour $t \geq 2500$ secondes.

Les évolutions temporelles de $\langle \tau_{run} \rangle / \overline{\tau}_{run}$ et $\langle \tau_{tumble} \rangle / \overline{\tau}_{tumble}$ sont tracées en figure 5.6. Les données sont moyennées sur quatre échelons de lumière représentatifs (lumière forte / lumière normale) réalisés au cours de trois expériences différentes. Les temps de "run" ne sont pas constants au cours du temps. A chaque augmentation de l'intensité lumineuse, les temps τ_{run} augmentent rapidement puis relaxent vers leur valeur initiale. Avec une diminution d'intensité lumineuse, l'évolution est symétrique. Les temps de "tumble" suivent l'évolution opposée : après une augmentation d'intensité lumineuse, ils décroissent brusquement avant de remonter, et inversement. La diminution des temps de "tumble" a pour conséquence que le temps séparant deux périodes de "run" est plus court sous forte intensité lumineuse, comme supposé à partir des distributions de déplacement expérimentales (figure 5.4). Les vitesses pendant les périodes de "run", tracées en figure 5.7, sont quant à elles sensiblement constantes.

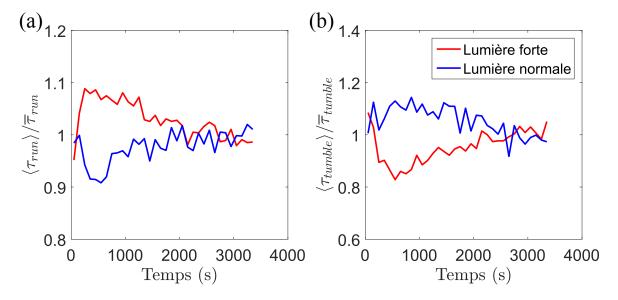


FIGURE 5.6 – Évolution en fonction du temps : (a) des temps de "run", (b) des temps de "tumble", renormalisés par leur valeur finale $\overline{\tau}_{run}$ et $\overline{\tau}_{tumble}$ respectivement. Les données sont le résultat d'une moyenne sur quatre échelons différents. En rouge : lumière forte, en bleu : lumière normale.

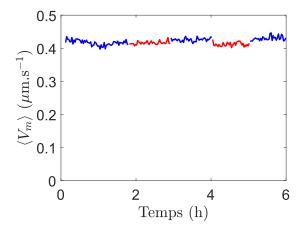


FIGURE 5.7 – Vitesse moyenne pendant les périodes de "runs" en fonction du temps.

Ces résultats mettent en évidence l'adaptation des temps de "run" et de "tumble" à des conditions de lumières variables. Ils traduisent l'existence d'une réponse du comportement dynamique aux changements de conditions extérieures. Une telle capacité de

réponse d'organismes vivants a été observée par [Segall et al., 1986], qui ont étudié le changement de fréquence de "run" pour des bactéries *Escherichia coli* soumises à des stimuli chimiques. Pour rappel, la réponse à une injection constante d'aspartate est reproduite en figure 1.15 page 37. Plus récemment, ces résultats expérimentaux ont fait l'objet d'études théoriques [De Gennes, 2004, Clark and Grant, 2005, Celani and Vergassola, 2010], en termes de théorie de la réponse linéaire.

5.1.2 Fonction réponse

La réponse chimiotactique des *Escherichia coli* mentionnée ci-dessus, a été modélisée par [De Gennes, 2004] dans le cas de faibles gradients en composés chimiques. Pour de petites perturbations, d'après la formule 1.28 rappelée ici, le signal de sortie est égal à :

$$S(t) = \int_{-\infty}^{t} R(t - t') F(t') dt$$
(5.1)

où F(t) est la perturbation imposée au système, qui est caractérisé par la fonction réponse R(t).

Les expressions résultantes exprimant l'évolution des temps de "run" et de "tumble" sont alors les suivantes :

$$\frac{1}{\langle \tau_{run} \rangle(t)} = \frac{1}{\overline{\tau}_{run}} \left[1 - \int^t R_{run}(t - t')c(t') dt' \right]$$
 (5.2)

$$\frac{1}{\langle \tau_{tumble} \rangle(t)} = \frac{1}{\overline{\tau}_{tumble}} \left[1 - \int^{t} R_{tumble}(t - t')c(t') dt' \right]$$
 (5.3)

Les fonctions R_{run} et R_{tumble} désignent les fonctions réponses lors des différentes périodes du mouvement. Dans ce formalisme, c(t) désigne la concentration en molécules perturbatrices. Dans notre cas, la perturbation étudiée est plutôt la variation d'intensité lumineuse, et par analogie nous posons $c(t) \leftrightarrow \pm \Delta I$, $+\Delta I$ dans le cas d'une augmentation de la luminosité et $-\Delta I$ lorsqu'elle est abaissée.

Pour nous ramener aux grandeurs mathématiques des équations 5.2 et 5.3, on trace sur la figure 5.8 les évolutions de $\frac{\overline{\tau}_{run}}{\langle \tau_{run} \rangle}$ et $\frac{\overline{\tau}_{tumble}}{\langle \tau_{tumble} \rangle}$, moyennées sur quatre créneaux de lumière. Cette représentation correspond juste à tracer l'inverse de l'axe des ordonnées de la figure 5.6.

Les évolutions temporelles tracées en figure 5.8 sont symétriques par rapport à la droite d'ordonnée 1. D'après l'équation 5.2, l'écart par rapport à 1 représente le produit de convolution de la fonction réponse avec la perturbation $\pm \Delta I$. En reprenant les notations de l'équation 5.1, la sortie du système est $\mathcal{S}(t) = (1 - \frac{\overline{\tau}_{run}}{\langle \tau_{run} \rangle})$, et l'entrée est $F(t) = \pm \Delta I$. La symétrie par rapport à l'axe y = 1 est donc cohérente avec la théorie de la réponse

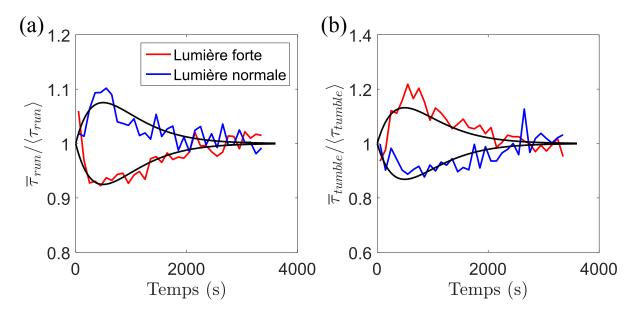


FIGURE 5.8 – (a) Évolution temporelle de l'inverse des temps moyens de "run", renormalisés par la valeur finale $\frac{\overline{\tau}_{run}}{\langle \tau_{run} \rangle}$. (b) Évolution temporelle de l'inverse des temps moyens de "tumble", renormalisés par la valeur finale $\frac{\overline{\tau}_{tumble}}{\langle \tau_{tumble} \rangle}$. Les valeurs tracées correspondent aux inverses des valeurs de la figure 5.6. Trait plein noir : modèle analytique correspondant à la formule 5.6.

linéaire, dans la mesure où l'on s'attend à ce que la fonction en sortie d'une entrée +F soit l'opposé de la réponse à une entrée -F. Ce raisonnement s'applique également aux temps de "tumble" (figure 5.8(b)).

Nos données expérimentales sont bruitées et proches de la limite de résolution. Elles ne permettent pas le calcul d'une fonction réponse de manière précise en déconvoluant le signal de sortie. Nous décidons donc de les ajuster avec une forme de fonction réponse connue donnée ci-dessous [Clark and Grant, 2005, Celani and Vergassola, 2010], obtenue en suivant des méthodes d'optimisation et permettant de décrire la chimiotaxie de bactéries *Escherichia coli*:

$$R_{run}(t) = W_{run}(1 - \frac{\lambda t}{2} - \frac{\lambda^2 t^2}{4})e^{-\lambda t}$$
 (5.4)

Dans l'équation 5.4, W_{run} est un paramètre d'amplitude qui caractérise l'intensité de la sortie en fonction de celle de l'entrée. λ correspond à l'inverse d'un temps de relaxation, ce paramètre gère l'instant du maximum de réponse en sortie. On utilise cette forme pour R_{run} , que l'on injecte dans l'équation 5.2 avec $c(t) = +\Delta I$, et on calcule :

$$\frac{\overline{\tau}_{run}}{\langle \tau_{run} \rangle(t)} = 1 - \int_0^t W_{run} (1 - \frac{\lambda t'}{2} - \frac{\lambda^2 t'^2}{4}) e^{-\lambda t'} \Delta I \, dt'$$
 (5.5)

pour aboutir finalement à la forme suivante :

$$\frac{\overline{\tau}_{run}}{\langle \tau_{run} \rangle(t)} = 1 - W_{run} \Delta I(t + \frac{\lambda t^2}{4}) e^{-\lambda t}$$
(5.6)

La figure 5.8 indique que les variations temporelles de τ_{run} et de τ_{tumble} s'effectuent avec le même temps caractéristique. Nous gardons le même paramètre λ pour la fonction réponse des temps de "tumble". Comme les variations sont opposées à celles des temps de "run", on change le signe devant le paramètre d'amplitude W_{run} pour obtenir finalement :

$$\frac{\overline{\tau}_{tumble}}{\langle \tau_{tumble} \rangle(t)} = 1 + W_{tumble} \Delta I(t + \frac{\lambda t^2}{4}) e^{-\lambda t}$$
(5.7)

La variation d'intensité lumineuse ΔI sont fixées à ± 200 lux. Comme montré en figure 5.8, l'ajustement des courbes expérimentales par les équations 5.6 et 5.7 est satisfaisant et avec les paramètres de fit λ^{-1} =400 s, W_{run} =4 10⁻⁶ lux⁻¹.s⁻¹ et W_{tumble} =7 10⁻⁴ lux⁻¹.s⁻¹.

Pour vérifier la pertinence de l'analyse menée jusqu'ici, on peut tester la formule théorique :

$$D \sim \frac{1}{4} \overline{V}_m^2 \frac{\langle \tau_{run}^2 \rangle}{\langle \tau \rangle}$$

avec les $\langle \tau_{run} \rangle$ et $\langle \tau_{tumble} \rangle$ provenant de l'inversion des équations 5.6 et 5.7, et confronter le résultat aux valeurs expérimentales du coefficient de diffusion. Pour cela, on approxime le temps moyen entre deux "runs" : $\langle \tau \rangle \approx \langle \tau_{run} \rangle + \langle \tau_{tumble} \rangle$. Il nous faut aussi exprimer $\langle \tau_{run}^2 \rangle$ en fonction de $\langle \tau_{run} \rangle$, qui est la grandeur obtenue par l'équation 5.6. Dans ce but, on trace la variance des temps de "runs" : $Var(\tau_{run}) = \langle \tau_{run}^2 \rangle - \langle \tau_{run} \rangle^2$, en fonction de $\langle \tau_{run}^2 \rangle$. Les résultats sont présentés en figure 5.9 pour deux périodes de lumière forte et deux périodes de lumière normale (phases II à V sur la figure 5.2(a)). On réalise une interpolation linéaire sur les données expérimentales, pour obtenir la formule empirique suivante :

$$Var(\tau_{run}) = a\langle \tau_{run}^2 \rangle + b \tag{5.8}$$

avec a=0.6 et b=-16 s². En utilisant la définition de la variance, il vient :

$$\langle \tau_{run}^2 \rangle = \frac{b + \langle \tau_{run} \rangle^2}{1 - a} \tag{5.9}$$

On pose $f_{run}(t) = W_{run}\Delta I(t + \frac{\lambda t^2}{4})e^{-\lambda t}$ et $f_{tumble}(t) = W_{tumble}\Delta I(t + \frac{\lambda t^2}{4})e^{-\lambda t}$. En combinant les équations 5.6, 5.7, 5.9 et 3.12, on aboutit à la formule finale pour le coefficient

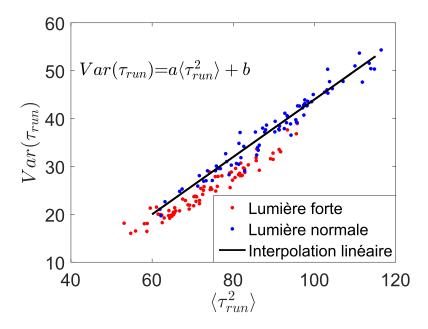


FIGURE 5.9 – Variance des temps de "runs" en fonction du second moment de leur distribution. Points rouges : expériences sous lumière forte, points bleus : expériences sous lumière normale. Trait plein noir : interpolation linéaire $Var(\tau_{run})=a\langle\tau_{run}^2\rangle+b$ avec a=0.6 et b=-16 s².

de diffusion:

$$D = \frac{\overline{V}_m^2}{4(1-a)} \frac{b + (\frac{\overline{\tau}_{run}}{1-f_{run}})^2}{\frac{\overline{\tau}_{run}}{1-f_{run}} + \frac{\overline{\tau}_{tumble}}{1+f_{tumble}}}$$
(5.10)

Les coefficients de diffusion obtenus avec l'équation 5.10, renormalisés par leur valeur finale (la moyenne aux temps supérieurs à 3000 secondes), sont comparés avec les résultats expérimentaux sur la figure 5.3. Ils présentent un bon accord avec les valeurs expérimentales. À partir des fonctions réponses des temps de "runs" et de "tumble", on peut donc prédire l'évolution de la dynamique du système.

Si la symétrie des réponses à des flux opposés est bien cohérente avec cette théorie (voir figure 5.8), pour valider définitivement son utilisation il faudrait pouvoir relier linéairement l'amplitude de la réponse avec celle de l'entrée (flux lumineux imposé). La vérification expérimentale de cette proportionnalité est délicate pour une première raison : la faible amplitude de la réponse empêche de la mesurer pour des ΔI trop faibles.

Pour des ΔI modérés utilisés jusqu'ici, la fonction réponse choisie a une intégrale qui tend vers 0 à temps long. Cela implique que le signal de sortie est le même avant le début de la perturbation et après avoir attendu suffisamment longtemps. Pour étudier l'effet de ΔI grands par rapport au signal initial, nous avons répété l'expérience décrite en

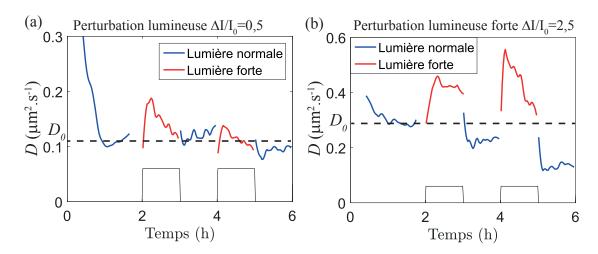


FIGURE 5.10 – Évolution temporelle du coefficient de diffusion (a) avec des échelons de $\frac{\Delta I}{I_0}$ =0.5 et (b) avec des échelons de $\frac{\Delta I}{I_0}$ =2.5.

figure 5.2(a), avec une intensité lumineuse initiale I_0 =80 lux. L'évolution du coefficient de diffusion au cours des cinq premiers échelons de l'expérience est donnée en figure 5.10(b), et comparée avec l'expérience étudiée jusqu'ici pour I_0 =465 lux dont les résultats sont donnés en figure 5.10(a). Suite à une perturbation forte, la valeur des coefficients de diffusion à la fin de l'échelon est très différente d'un échelon à l'autre. Cette différence n'est pas prévue par la fonction réponse choisie. La forme utilisée est donc valable pour une certaine gamme de perturbation, mais pas généralisable, soit parce que le système devient non-linéaire à de plus fortes perturbations, soit parce qu'il faut en proposer une nouvelle.

Pour rechercher classiquement la forme d'une fonction réponse, on soumet le système à une fonction Dirac en entrée. Par les propriétés du produit de convolution (équation 1.28), la sortie mesurée est alors directement la fonction réponse du système. Nous avons imposé aux bactéries des impulsions courtes (30 secondes) de lumière, mais sans obtenir de résultat probant, peut-être à cause de l'amplitude trop faible de la source lumineuse utilisée. Des expériences avec une source lumineuse plus puissante et un très grand nombre de bactéries pourraient peut-être permettre de proposer une fonction réponse mieux identifiée.

5.1.3 Interaction entre les bactéries

Nous avons aussi remarqué que ces régimes transitoires décrits en termes de fonction réponse s'accompagnent d'un léger changement morphologique du système. La figure 5.11(a) trace les distributions des aires \mathcal{A} des particules détectées, pour les phases I à III de l'expérience. Les particules détectées correspondent aux zones blanches des images binarisées, comme montrées sur la figure 2.8 page 55. On observe des pics successifs, qui correspondent au nombre de bactéries dans les groupements de tailles discrètes

(1, 2 ou 3 bactéries). Cette distribution s'élargit après l'augmentation de l'intensité lumineuse (transition de la phase I à II), puis se raccourcit lorsque la lumière redevient normale (transition de la phase II à III). A titre illustratif, on a repéré l'évolution du pic correspondant au groupement de deux bactéries par une flèche. Cette alternance est signe d'un regroupement cellulaire lorsque l'intensité lumineuse augmente, suivi d'une séparation lorsque l'intensité redevient "normale". Le schéma en figure 5.11(b) illustre ce mécanisme.

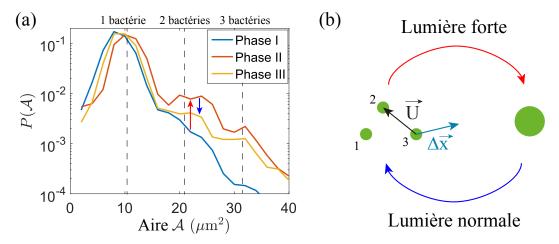


FIGURE 5.11 – (a) Distribution des tailles des particules détectées pour les trois premières phases de l'expérience. Les flèches rouges et bleues indiquent les changements lors de créneaux de lumière montants et descendants respectivement. (b) Schématisation du mécanisme réversible expliquant la variation du nombre de bactéries détectées : trois bactéries proches peuvent se rassembler puis se dissocier. Le vecteur entre une bactérie et sa plus proche voisine \overrightarrow{U} et son vecteur déplacement $\Delta \overrightarrow{x}$ sont définis pour la bactérie n°3.

Pour quantifier ce regroupement, on calcule la corrélation entre le vecteur déplacement $\Delta \overrightarrow{x}$ et le vecteur reliant la bactérie considérée et sa plus proche voisine \overrightarrow{U} . Ces vecteurs sont définis sur la figure 5.11(b). La corrélation est calculée en fonction de la distance d entre les deux bactéries considérées (égale la norme du vecteur \overrightarrow{U}), et normalisée par les normes des deux vecteurs respectif :

$$C(d) = \left\langle \frac{\Delta \overrightarrow{x} \cdot \overrightarrow{U}}{||\Delta \overrightarrow{x}||.||\overrightarrow{U}||} \right\rangle \tag{5.11}$$

où les crochets indiquent une moyenne sur tous les déplacements enregistrés avec une plus proche voisine située à une distance d. Une corrélation positive indique une attraction des bactéries entre elles, une corrélation négative une répulsion, et une corrélation nulle signale l'absence d'interaction entre les bactéries. C(d) est évalué sur chaque image de la vidéo expérimentale considérée, le déplacement étant calculé sur $\delta t = 5$ s : $\Delta \overrightarrow{x} = \overrightarrow{X}(t + \delta t) - \overrightarrow{X}(t)$. Les résultats sont présentés en figure 5.12.

Les corrélations positives à des courtes distances inter-particulaires signifient que les

bactéries peuvent s'attirer lorsqu'elles sont suffisamment proches. On définit la distance d'interaction comme la distance pour laquelle C(d) s'annule. La figure 5.12 montre que sous un éclairage fort, cette distance est supérieure de $\Delta l \sim 2~\mu m$ par rapport à l'éclairage normal. Ces résultats suggèrent qu'une forte intensité lumineuse tend à favoriser la capacité d'attraction entre les bactéries, ce qui pourrait expliquer les variations des distributions de taille des particules repérées en figure 5.11(a).

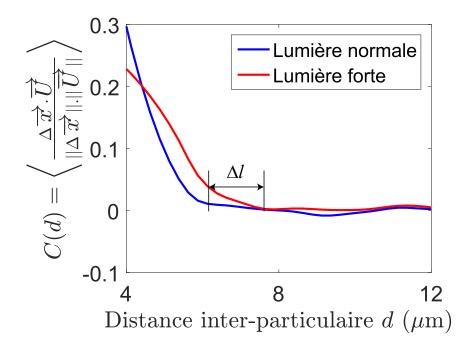


FIGURE 5.12 – Corrélation entre les déplacements d'une bactérie et le vecteur pointant vers sa plus proche voisine en fonction de la distance d les séparant. Δl représente l'écart entre les distances de corrélations obtenues sous éclairage fort et sous éclairage normal.

Les résultats de cette partie montrent une interaction plus importante entre bactéries à haute luminosité. Les distances d'interactions obtenues, de l'ordre de 6-7 μ m, sont cohérentes avec celles utilisées pour les simulations numériques de la partie 4.4, conjecturées à partir de considérations géométriques sur le diamètre des cellules et la longueur de leur pili de type IV. [Nakane and Nishizaka, 2017] ont établi l'augmentation du nombre de pili avec l'éclairement dans le cas d'une lumière directionnelle. De plus, les pili de type IV sont responsables de l'attraction des bactéries entre elles [Bonazzi et al., 2018]. L'augmentation de la longueur de corrélation avec l'intensité lumineuse que nous mettons en évidence serait ainsi consistante avec les données de la littérature : l'intensité lumineuse favoriserait l'accrochage entre bactéries par une prolifération des pili.

Il serait intéressant d'étudier si cette agrégation donne lieu à des formes de croissance de micro-colonies différentes selon l'intensité lumineuse. En effet, la capacité d'interaction entre particules fait partie des mécanismes important à prendre en compte dans la formation d'un biofilm, comme le montrent les résultats du chapitre 4 et d'autres travaux sur ce sujet [Taktikos et al., 2015].

5.1.4 Discussion

Pour revenir à la réponse dynamique du système aux stimuli lumineux, nos résultats indiquent que la lumière n'influence pas la vitesse de déplacement pendant les périodes de "runs", mais plutôt les temps caractéristiques de la motilité : les temps de "run" augmentent et les temps de "tumble" diminuent. Ces variations de temps caractéristiques sont décrites par un régime transitoire dont la forme est complexe, avec un maximum suivi d'une relaxation vers un plateau. Si nos données expérimentales ne permettent pas l'établissement d'une fonction réponse précise, l'utilisation d'une forme obtenue pour l'étude de la chimiotaxie des *Escherichia coli* les modélise convenablement.

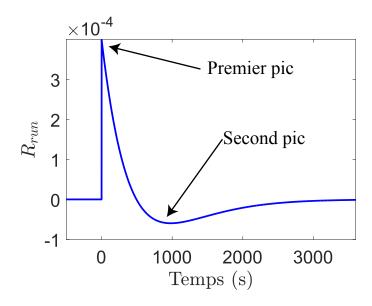


FIGURE 5.13 – Fonction réponse pour les périodes de "runs", définie par l'équation 5.4. Les flèches indiquent les points caractéristiques de cette fonction.

Cette fonction, définie par l'équation 5.4, est tracée en figure 5.13. Elle présente un premier maximum à l'instant initial, et un minimum aux alentours de 1000 secondes, qui définit un second pic. Dans le cas de la chimiotaxie, le premier pic correspond à une augmentation rapide de la vitesse des bactéries pour qu'elles puissent se diriger vers la zone qui contient le plus de nutriments. Le second pic traduit quant à lui la capacité à ralentir pour rester dans les zones favorables une fois qu'elles sont atteintes. La forme de la fonction réponse correspond à un compromis entre ces deux mécanismes antagonistes. La réponse des *Synechocystis* aux changements de conditions lumineuses pourrait donc résulter de la recherche d'un optimum, et la fonction réponse utilisée ici pourrait être testée avec d'autres types de perturbations physico-chimique (température, nutriments...).

En ce qui concerne la réponse chimiotactique des bactéries *Escherichia coli*, le temps caractéristique λ^{-1} est de l'ordre de 1s, ce qui correspond au temps moyen de "run". Notre valeur de λ^{-1} =400 s est nettement supérieure, mais reste cohérente car le système que nous étudions est également plus lent. Il est néanmoins notable que λ^{-1} n'est pas

de l'ordre de grandeur de τ_{run} dans notre système. Ceci peut être dû soit au fait que les taxies étudiées sont différentes, soit à des propriétés de réponse qui diffèrent d'un microorganisme à l'autre. Une étude de la chimiotaxie des Synechocystis pourrait permettre de répondre à cette question en comparant les temps caractéristiques obtenus en réponse à des stimuli chimiques à ceux observés ici pour des stimuli lumineux.

5.2 Phototaxie

La partie précédente a mis en évidence l'adaptation de la motilité des Synechocystis à des variations de lumière isotropes. Nous étudions maintenant comment prendre en compte l'introduction d'une directionnalité du flux lumineux. L'éclairage est assuré par une diode électro-luminescente (LED) blanc chaud, dans le dispositif détaillé en partie 2.5 page 53. On ajoute un cache sur le système expérimental afin d'éviter la pollution lumineuse extérieure. La figure 5.1(b) schématise l'installation expérimentale. Le flux lumineux incident est orienté de 30° par rapport à l'horizontale avant réfraction par le verre de la cellule de mesure, nos expériences ne sont donc pas réalisées en incidence rasante.

Les expériences sont réalisées selon le principe représenté en figure 5.2(a): on alterne des périodes d'éclairage isotrope d'une heure avec des périodes d'éclairage directionnel à haute intensité de même durée. La phase I de l'expérience, où les bactéries sont soumises à une lumière normale pendant deux heures, permet d'atteindre un coefficient de diffusion constant, conformément aux résultats du chapitre 3. Sous éclairage normal, les bactéries sont soumises à un flux lumineux de 80 lux. Le flux total reçu avec la diode est de 5000 lux, soit 80 μ moles.m⁻².s⁻¹. La LED utilisée n'a pas un éclairage purement directionnel, mais la lumière est émise dans un cône de demi-angle 45°, comme le montre la figure 5.14.

5.2.1 Première analyse

Une diffusion biaisée

Les trajectoires sont découpées en périodes de 250 secondes, dont l'origine est ramenée à la position (0,0). Les trajectoires dont la distance totale parcourue est inférieure à 2 μ m sont retirées de l'analyse. Le domaine est divisé en sites de côté $0.2~\mu$ m. On incrémente ensuite chaque site de l'image à chaque fois qu'une position y est détectée. La valeur de chaque site est ensuite renormalisée de sorte à ce que la somme sur le domaine soit égale à 1 (la procédure est détaillée dans la partie 4.1.2). Les probabilités de visite de site obtenues sont données en figure 5.15 pour une heure d'enregistrement avec et sans éclairage directionnel.

Le protocole expérimental permet de distinguer la dynamique avec et sans lumière directionnelle. En effet, les sites visités de la figure 5.15(a) présentent bien un biais dans

5.2. PHOTOTAXIE

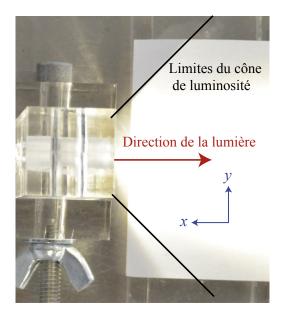


FIGURE 5.14 – Photographie du cône de lumière généré par la LED utilisée. Les limites du cône de luminosité ont été tracées dans les directions $\pm 45^{\circ}$ par rapport à la direction principale de la lumière. La direction x indique la direction vers la source de lumière et y sa direction transverse.

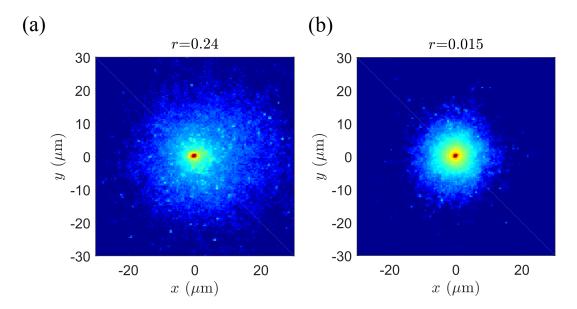


FIGURE 5.15 – Sites visités au cours de périodes de 250 secondes. Rouge : site visité le plus de fois. Bleu : site non visité. (a) Résultats avec une lumière directionnelle provenant de x > 0 et (b) résultats avec un éclairage isotrope. L'axe x correspond à la direction longitudinale de la lumière et l'axe y à sa direction transverse. Les valeurs r placées au-dessus des images indiquent les résultats d'un test de Rayleigh, calculé suivant l'équation 5.15.

la direction de la lumière, vers les x positifs. La figure 5.15(b) correspond quant à elle à un éclairage isotrope et est assimilable à une tache diffusive classique, sans direction privilégiée apparente. L'émergence d'une direction privilégiée du déplacement témoigne

d'un mouvement phototactique des Synechocystis, aux longueurs d'ondes utilisées dans cette expérience. On note aussi que même suivant la direction transverse y, la distribution des sites visités est plus large en présence d'une lumière directionnelle. Celle-ci augmente donc en même temps les déplacements suivant les directions longitudinale x et transverse y.

Ces premiers résultats mettent en évidence la directionnalité du mouvement. Nous nous focalisons maintenant sur la dynamique de cette directionnalité, pour voir si la reconnaissance d'une direction privilégiée est immédiate ou s'il y a un délai entre le changement de conditions lumineuses et l'introduction d'un biais dans le déplacement. Pour cela, nous calculons pour un instant t depuis le début de l'échelon la vitesse moyenne suivant les axes x et y, définis comme :

$$V_x = \left\langle \frac{x(t+\delta) - x(t)}{\delta} \right\rangle \tag{5.12}$$

$$V_y = \left\langle \frac{y(t+\delta) - y(t)}{\delta} \right\rangle \tag{5.13}$$

Les positions x et y viennent des trajectoires d'une durée δ =50 s enregistrées entre les instants t et $t+\delta$, et les crochets désignent une moyenne sur l'ensemble de ces trajectoires. Les bactéries s'étant déplacées de moins de 2 μ m pendant δ sont retirées de l'analyse. La figure 5.16 présente les vitesses de déplacements V_x et V_y .

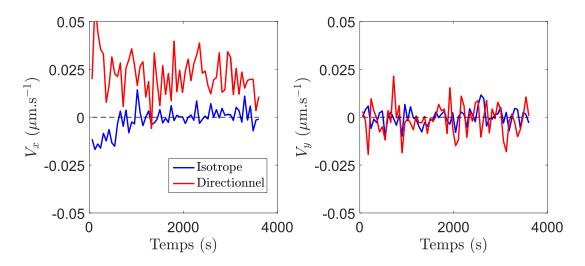


FIGURE 5.16 – Vitesse moyenne suivant en fonction du temps suivant les directions (a) longitudinale x et (b) transverse y. En rouge : vitesses enregistrées avec un éclairage directionnel, en bleu : avec un éclairage isotrope. Le trait pointillé noir indique une vitesse nulle.

La vitesse V_x est non nulle en présence d'un éclairage directionnel, ce qui traduit l'existence d'un déplacement moyen dans la direction de la lumière. Cette composante est

5.2. PHOTOTAXIE

nulle dans le cas d'un éclairage isotrope, sauf pour les temps inférieurs à 500 secondes pour lesquels une vitesse négative moyenne semble exister (nous n'avons pas d'explication pour cette portion de la courbe). La vitesse V_y reste égale à 0 quelles que soient les conditions de luminosité.

D'autre part, on constate sur la figure 5.16(a) que la vitesse V_x est non nulle instantanément après l'introduction d'une lumière directionnelle. Les Synechocystis sont donc capables de choisir une direction précise et de s'orienter dans cette direction dans un temps très court.

Les distributions de probabilité de déplacements suivant les deux axes, qui donnent plus de détail sur la dynamique des cellules, confirment ces premières observations sur la directionnalité du mouvement. Elles sont tracées en figure 5.17 pour les deux conditions d'éclairage.

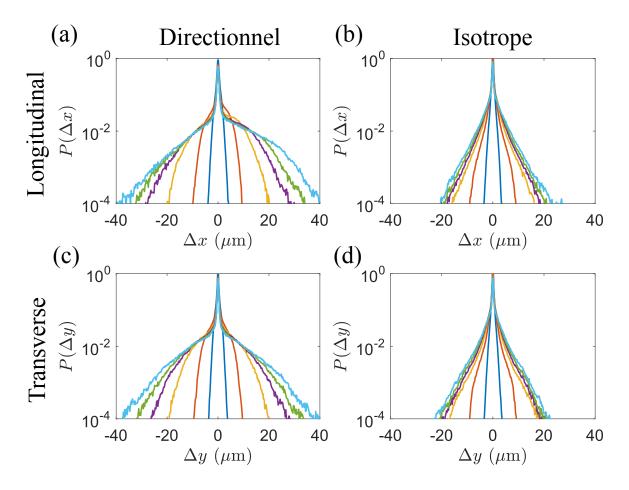


FIGURE 5.17 – Distributions des probabilités de déplacement pour les instants Δt =2, 10, 30, 50, 70 et 100s. En haut : dans la direction longitudinale, en bas : dans la direction transverse. A gauche, sous une lumière directionnelle, à droite : sous une lumière isotrope.

La distribution des déplacements selon x est asymétrique lorsque les Synechocystis sont soumises à un flux lumineux directionnel, comme indiqué en figure 5.17(a). Cette

asymétrie ne se retrouve pas selon la direction transverse (figure 5.17(c)). On ne la trouve pas non plus avec des conditions d'éclairage isotropes, où les distributions sont les mêmes suivant les axes x et y (figure 5.17(b) et (d)).

Un point marquant est à noter en ce qui concerne les distributions transverses avec ou sans flux lumineux directionnel (c et d): les distributions sont plus larges en présence du flux, bien que celui-ci soit ne soit pas orienté dans cette direction. De plus, les distributions de la figure (c) sont plus arrondies et ressemblent davantage à des fonctions Gaussiennes. Ce résultat rappelle la discussion autour de la figure 5.4(c) basée sur le théorème central limite. La forme plus Gaussienne des distributions aux temps longs avec un flux lumineux directionnel signale que les déplacements sont plus indépendants, et donc que la fréquence de "runs" est augmentée par ce flux, selon le mécanisme schématisé en figure 5.4(d). Ceci suggère que le flux lumineux directionnel a aussi une influence sur la dynamique globale des bactéries, pas seulement dans la direction de la source lumineuse.

On remarque aussi que dans la direction opposée à la source (x < 0), les distributions sont aussi larges que dans la direction transverse (a et c). Il existe bien un déplacement moyen non nul, révélé par l'asymétrie des distributions, mais les largeurs similaires suivant x < 0 et y traduisent aussi l'existence de déplacements aléatoires. Le mouvement global a donc une composante directionnelle, et une composante diffusive, dont les proportions respectives restent à mesurer. Les distributions de la figure 5.17 sous-entendent qu'une lumière directionnelle peut avoir deux effets : l'orientation du mouvement dans une direction privilégiée et l'augmentation globale de la dynamique par l'augmentation de l'intensité lumineuse.

Quantification de l'anisotropie du mouvement

Pour quantifier le biais du déplacement moyen résultant, nous avons calculé la direction du mouvement associé aux déplacements enregistrés. À chaque trajectoire motile de 250 seconde utilisée pour le tracé de la figure 5.15, on associe ses déplacements Δx et Δy entre le début et la fin de la trajectoire suivant les directions x et y. On évalue ensuite sa direction moyenne $\theta \in [-\pi; \pi]$ dans le repère (x, y) de la manière suivante :

$$\theta = sign(\Delta y) \ acos\left(\frac{\Delta x}{\sqrt{\Delta x^2 + \Delta y^2}}\right) \tag{5.14}$$

Le biais d'une distribution de déplacement peut se calculer à partir de la valeur r d'un test de Rayleigh [Mardia, 1975, Berens, 2009]. Celle-ci est définie de la manière suivante

5.2. PHOTOTAXIE

pour les N trajectoires motiles de 250 secondes enregistrées :

$$r = \frac{1}{N} \sqrt{\left(\sum_{i=1}^{N} \cos(\theta)\right)^2 + \left(\sum_{i=1}^{N} \sin(\theta)\right)^2}$$
 (5.15)

L'équation 5.15 garantit que r reste borné entre 0 et 1: une valeur nulle traduit l'absence de direction privilégiée, et si r=1, alors toutes les trajectoires vont dans la même direction. Le résultat de ce test est annoté sur la figure 5.15, on trouve r=0.24 avec un éclairage directionnel, et r=0.015 sous éclairage isotrope. Il confirme donc l'existence d'un biais dans le mouvement créé par la source lumineuse. Cependant, la valeur r obtenue reste éloignée de 1 même avec l'éclairage directionnel : l'orientation des déplacements n'est pas uniforme.

5.2.2 Différentes populations

Cette hétérogénéité de l'orientation traduit l'existence de comportements hétérogènes des bactéries. La figure 5.18 présente différentes trajectoires de δ =100 secondes obtenues dans le cas d'un éclairage directionnel. Par souci de lisibilité, nous nous sommes focalisés sur une zone de 250 pixels de côté, dans une image totale de 800×640 pixels. Les points noirs désignent la position finale des bactéries. Certaines trajectoires sont très courtes, d'autres montrent des déplacements dans la direction du flux lumineux (indiqué par la flèche rouge au centre de l'image), et enfin une dernière partie des trajectoires se déplace, mais dans une direction aléatoire. A chaque trajectoire i, on associe son déplacement $\overrightarrow{d_i}$ entre les positions initiales et finales, ainsi que son déplacement suivant la direction longitudinale de la lumière $x_i = x(\delta) - x(0)$. Cela permet de définir la corrélation entre son déplacement et la direction de la lumière c_i , de la manière suivante :

$$c_i = \frac{x_i}{||\overrightarrow{d_i}||} \tag{5.16}$$

Avec cette définition, c_i est le cosinus de l'angle entre le vecteur déplacement et le vecteur unitaire donnant la direction de la lumière. Ces grandeurs permettent de définir trois populations :

- Si $||\overrightarrow{d_i}|| < d_{min}$, la trajectoire est déclarée non-motile, quelle que soit la valeur de c_i .
- Si $c_i < C$, la trajectoire est déclarée aléatoire.
- Si $c_i \geq C$ la trajectoire est déclarée phototactique.

La figure 5.18 présente les résultats de cette procédure de séparation avec $d_{min}=3~\mu\mathrm{m}$ et $C=\sqrt{2}/2$, ce qui correspond à un faisceau de demi-angle 45° autour de la direction de la lumière. Sur les 30 trajectoires tracées, 3 sont non motiles, 15 sont aléatoires et 12 sont phototactiques.

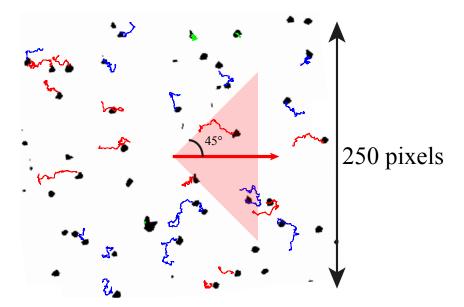


FIGURE 5.18 — Exemple de trajectoires enregistrées sur 100 secondes, sur une vidéo avec un éclairage directionnel. Les couleurs correspondent au résultat de la procédure de différenciation décrite ci-dessus. Rouge : trajectoires phototactiques, bleu : trajectoires aléatoires, vert : trajectoires non motiles. La flèche rouge indique la direction vers la source lumineuse (direction x) et le cône rouge le faisceau de demi-angle 45° utilisé pour définir les trajectoires phototactiques.

À partir de cette procédure de distinction, on peut tracer l'évolution temporelle des proportions des différentes populations. Nous excluons de l'analyse les bactéries non motiles. En raison de la proportion du domaine couverte par un cône de demi-angle 45° (voir figure 5.18), on s'attend statistiquement à avoir $2\times45/360=25$ % des trajectoires motiles déclarées comme phototactiques. Cette valeur de référence (25%) est tracée sur la figure 5.19(a) avec les évolutions des proportions respectives de trajectoires aléatoires et phototactiques. La figure 5.19(b) rappelle les conditions lumineuses imposées aux Sy-nechocystis.

En conditions isotropes, la proportion de bactéries détectées comme phototactiques correspond bien à la valeur prévue, due à la portion de surface couverte par notre critère de sélection. Les écarts à cette référence uniquement pendant les échelons lumineux anisotropes témoignent d'un mouvement phototactique. La proportion de trajectoires aléatoires diminue de manière significative après application d'un échelon de lumière directionnelle. Dans le même temps, la proportion de bactéries phototactiques augmente, ce qui indique un transfert d'une population vers l'autre. L'existence d'une part importante de trajectoires "aléatoires" peut provenir de la faible directionnalité de l'éclairage obtenu par la LED, en raison de l'angle d'incidence du faisceau lumineux (voir figure 5.1(b)).

Les distributions de déplacement moyennées sur toute la population (figure 5.17), traduisent une motilité différenciée suivant les directions x et y, et suivant la présence ou non d'un flux lumineux directionnel. De plus, la description proposée en termes de popula5.2. PHOTOTAXIE

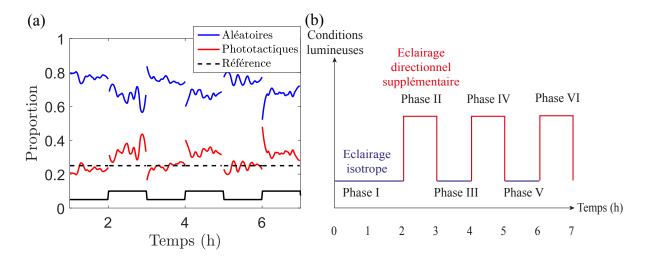


FIGURE 5.19 – (a) Répartition temporelle des différentes populations de bactéries motiles, pour deux cycles lumière directionnelle/lumière isotrope (phases I à VI de l'expérience). Les bactéries non motiles n'ont pas été considérées ici. Bleu : trajectoires aléatoires et rouge : trajectoires phototactiques. Le trait pointillé noir désigne la valeur théorique de référence de la population phototactique (25%), définie dans le texte. Le profil de lumière est indiqué par le créneau : la valeur 0 correspond à un flux isotrope et la valeur 0.05 à un flux directionnel. (b) Schéma illustrant les évolutions temporelles des conditions lumineuses pendant l'expérience.

tion met en évidence une importante hétérogénéité, révélée par l'existence de populations diverses au comportement dynamique complexe. Ces différents détails nous incitent à étudier non plus un coefficient de diffusion D global, mais plutôt de calculer des coefficients différents pour la direction longitudinale D_x et pour la direction transverse D_y .

5.2.3 Régime transitoire

Pour obtenir ces coefficients de diffusion, on peut calculer l'écart quadratique moyen selon chacun des axes. Cet écart est calculé à l'aide de l'équation 3.3 page 59, où la position en deux dimensions de la bactérie X est remplacée par ses composantes suivant x et y. On définit alors les coefficients de diffusion effectifs suivants :

$$\langle x^2(t,\Delta)\rangle = \frac{1}{2}D_x(t)\Delta$$
 (5.17)

$$\langle y^2(t,\Delta)\rangle = \frac{1}{2}D_y(t)\Delta$$
 (5.18)

où les crochets désignent une moyenne sur tous les déplacements enregistrés sur la fenêtre temporelle centrée en t. Cette fois, l'écart quadratique moyen n'évolue pas forcément linéairement en fonction de Δ puisque la phototaxie induit une direction privilégiée de déplacement. Les différents coefficients définis ainsi ne sont donc pas des coefficients de

diffusion à proprement parler, mais des coefficients de diffusion effectifs.

Afin de différencier la dynamique des populations phototactiques et aléatoires, on distingue sur chaque fenêtre temporelle les trajectoires aléatoires et phototactiques, comme expliqué en partie 5.2.2 avec les critères de déplacement minimum $d_{lim}=3$ μ m et de corrélation des déplacements $acos(C)=45^{\circ}$. La comparaison des coefficients de diffusion obtenus pour chaque population est donnée en figure 5.20.

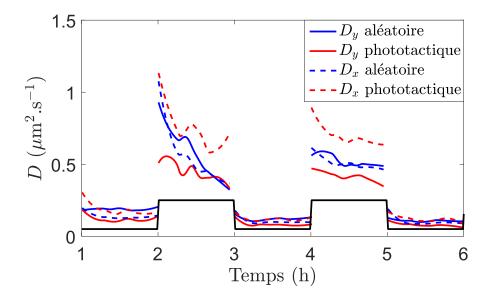


FIGURE 5.20 — Évolution temporelle des différents coefficients de diffusion effectifs, pour les phases I à V de l'expérience, pour les populations phototactiques (en rouge) et aléatoires (en bleu). Trait plein : dans la direction longitudinale x, pointillés : dans la direction transverse y. Les créneaux représentent le profil lumineux : un signal bas correspond à une faible luminosité isotrope, un signal haut à l'ajout d'un éclairage directionnel.

Après l'introduction d'un flux lumineux directionnel, tous les coefficients de diffusion augmentent, sur les deux populations. Cette augmentation rapide s'effectue en un temps inférieur à 100 secondes. Pour les bactéries ayant une direction aléatoire, les coefficients D_x et D_y sont égaux. Ce n'est pas le cas pour celles qui se déplacent vers la source lumineuse, où le coefficient suivant la direction longitudinale D_x est supérieur de 50% à celui obtenu dans la direction transverse D_y . Lorsque la lumière redevient isotrope, tous les coefficients de diffusion diminuent et redeviennent très proches les uns des autres. Cette évolution est constatée pour chacun des cycles de l'expérience. L'introduction d'un flux lumineux directionnel augmente donc la motilité globale des Synechocystis, y compris dans sa direction transverse. Cela conforte l'analyse effectuée précédemment sur les distributions de probabilité de déplacement, où nous avions trouvé des distributions plus larges dans la direction transverse en présence du flux lumineux directionnel (figure 5.17(c et d)).

En plus des valeurs absolues, la figure 5.20 donne accès aux dynamiques temporelles des coefficients. Ceux-ci évoluent non seulement à la transition entre chaque créneau de

5.2. PHOTOTAXIE

lumière, mais aussi au sein d'un même créneau d'une heure, où on observe systématiquement une diminution des coefficients.

Bien que le modèle CTRW tel que nous l'avons adapté dans les chapitres 3 et 4 ne soit pas applicable stricto sensu dans ce cas d'une diffusion biaisée, il est désirable de comprendre comment cette diminution des coefficients de diffusion est liée aux caractéristiques des périodes de "run" et de "tumble". En conditions isotropes, l'étude des temps caractéristiques de la motilité avait permis de mieux comprendre l'évolution de la dynamique observée, qui était liée aux variations de ces temps. Les trajectoires tracées en figure 5.18 présentent toujours des mouvements intermittents, avec des périodes de "runs" et des périodes de "tumble". Nous avons appliqué la procédure habituelle de distinction des deux périodes décrite en partie 3.3.2 page 62 à toutes les bactéries motiles (aléatoires et phototactiques) pour étudier plus en détail les variations de la dynamique sous une lumière directionnelle. Nous n'avons pas ici fait de distinction entre les populations (phototactiques et aléatoires) pour quantifier le comportement moyen de toutes les bactéries motiles présentes sur la surface.

On note par \overrightarrow{l}_{run} le vecteur déplacement entre le début et la fin d'une période de "run", dont la norme est l_{run} . Nous avons calculé les projections moyennes $\langle l_x \rangle$ et $\langle l_y \rangle$ des déplacements pendant les runs suivant les expressions suivantes :

$$\langle l_x \rangle = \langle \overrightarrow{l}_{run} \cdot \overrightarrow{x} \rangle \tag{5.19}$$

$$\langle l_y \rangle = \langle \overrightarrow{l}_{run} \cdot \overrightarrow{y} \rangle \tag{5.20}$$

dont le résultat est tracé en figure 5.21(a). $\langle l_y \rangle$ reste nulle au cours de l'expérience, tandis que $\langle l_x \rangle$ passe d'une valeur nulle en éclairage isotrope à une valeur non nulle et positive sous éclairage directionnel. La directionnalité du mouvement provient donc d'un biais dans l'orientation des "runs".

La figure 5.21(a) indique également que $\langle l_x \rangle$ devient non-nul juste après l'allumage de la LED directionnelle : on note comme pour les coefficients de diffusion l'absence de temps de retard significatif entre le début de l'échelon et le choix de l'orientation par les bactéries. Après le retour en conditions lumineuses isotropes (phases III et V), on constate une valeur légèrement négative de $\langle l_x \rangle$, qui est cohérente avec les vitesses négatives observées en figure 5.16(a). Cet effet significatif et répétable pourrait donner des informations importantes sur la dynamique de la directionnalité, avec des fonctions réponses complexes qui traduiraient une forme de "mémoire".

Nous avons représenté en figure 5.21(b) la longueur moyenne des "runs" en fonction de la direction de leur déplacement. L'ajout d'un éclairage directionnel augmente la longueur moyenne dans toutes les directions du plan, mais leur longueur n'est pas plus grande dans la direction pointant vers la source lumineuse. Pour résumer, cette étude met en évidence un temps très court au-delà duquel une direction privilégiée apparaît dans les mouvements

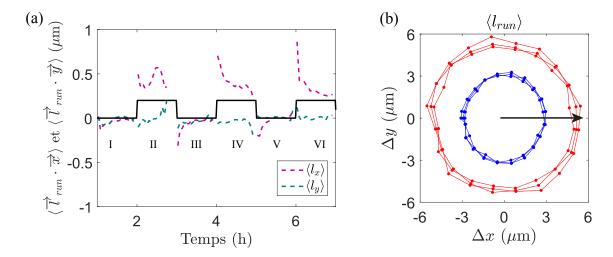


FIGURE 5.21 – (a) Évolution temporelle de la longueur moyenne d'un "run" dans les directions longitudinales x ou transverses y au cours du temps. Les créneaux représentent le profil lumineux : un signal nul correspond à une faible luminosité isotrope, un signal haut à l'ajout d'un éclairage directionnel. (b) Distance moyenne parcourue pendant l_{run} en fonction de sa direction, pour les 6 échelons lumineux donnés en figure 5.19(b). En bleu : sous un éclairage isotrope, en rouge : avec l'ajout d'un éclairage directionnel. La flèche indique la direction vers la source lumineuse.

de "run" (figure 5.21(a)). En revanche leur longueur semble davantage sensible à l'intensité de la source lumineuse qu'à sa direction (figure 5.21(b)).

La directionnalité du mouvement, traduite par le fait que $\langle l_x \rangle$ soit non nul contrairement à $\langle l_y \rangle$, est cohérente avec les résultats de la figure 5.20, où nous avions observé un coefficient de diffusion effectif dans la direction de l'éclairage D_x supérieur à celui D_y obtenu dans la direction transverse. Mais ceci ne permet pas d'expliquer les variations de D_y entre les différents échelons lumineux, constatées en figure 5.20. Or, dans la partie précédente, nous avons remarqué que l'illumination faisait varier les temps caractéristiques de l'intermittence. Nous nous focalisons donc sur les évolutions des temps caractéristiques de "run" et de "tumble", en opérant de nouveau la distinction entre une population "phototactique" et d'une population "aléatoire".

La figure 5.22 présente leurs évolutions au cours de l'expérience. Les temps de "run" sont bien égaux pour les deux populations sous un éclairage isotrope, car la distinction entre population est juste statistiquement due à la surface du "cône" tracé en figure 5.18. Ils augmentent lors de l'application de l'échelon de lumière directionnelle. Ce qui est notable, c'est que cette fois-ci leurs temps de "run" restent égaux, de même que leurs temps de "tumble", alors que la distinction entre les deux populations a un sens, les unes se déplaçant vers la direction de la lumière et les autres non. Les temps caractéristiques sont donc similaires pour les deux populations observées, malgré les différences de coefficients de diffusion donnés en figure 5.20. Cela signifie que les différences de coefficients D_x et D_y observés sont dominées par la directionnalité du mouvement caractérisée par l'orien-

5.2. PHOTOTAXIE

tation des "runs" (figure 5.21(a)) et non par des différences de temps caractéristiques. On remarque également des régimes transitoires qu'il conviendrait d'étudier plus en détail, notamment vis-à-vis des conclusions proposées dans la partie précédente sur les réponses à des échelons d'intensité lumineuse isotrope.

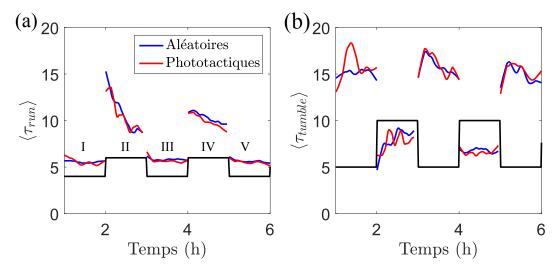


FIGURE 5.22 — Évolutions temporelles des temps moyen (a) de "run" et (b) de "tumble" en fonction du temps, pour les phases I à V de l'expérience. En rouge : trajectoires phototactiques, en bleu : trajectoires aléatoires. Les créneaux représentent le profil lumineux : un signal bas correspond à une faible luminosité isotrope, un signal haut à l'ajout d'une luminosité directionnelle.

5.2.4 Discussion

Les résultats expérimentaux permettent d'avoir accès à la réponse dynamique des *Synechocystis* à des changements de lumière directionnelle. Deux hypothèses sur le mécanisme phototactique s'opposent : (i) les bactéries intègrent sur leur déplacement les conditions lumineuses qu'elles ont ressenties, pour choisir ensuite une direction privilégiée, comme c'est le cas pour la chimiotaxie, et (ii) les bactéries ressentent directement la direction de la lumière. Le premier mécanisme supposerait une réponse différée aux changements de luminosité, le deuxième permettrait une réponse instantanée du système.

Actuellement, la phototaxie de ces cyanobactéries est décrite en rapport avec les propriétés optiques de leur membrane, qui focalise la lumière à l'aval du flux lumineux, de telle sorte que les pili se forment préférentiellement en amont du flux [Schuergers et al., 2016]. Le schéma de principe correspondant est donné en figure 5.23. D'après cette description, la réponse des *Synechocystis* à une lumière directionnelle s'effectue en mois d'une minute, ce qui a été confirmé par des résultats expérimentaux récents [Ursell et al., 2013, Nakane and Nishizaka, 2017]. Nos résultats semblent confirmer ces observations expérimentales, dans la mesure où les variations de coefficients de diffusion et l'orientation des "runs"

dans la direction de la source lumineuse s'effectuent en moins de 100 secondes (figures 5.20 et 5.21).

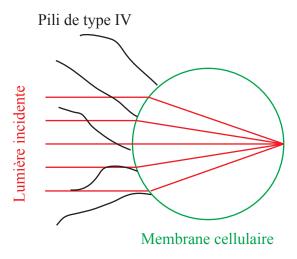


FIGURE 5.23 — Schéma de principe de la perception de la direction du flux lumineux dominant par une *Synechocystis*: par des effets micro-optiques, les rayons sont focalisés en un point de la membrane à l'aval du flux, et des pili sont créés en amont. Schéma adapté de [Wilde and Mullineaux, 2017].

A priori, il suffit d'avoir une direction privilégiée de déplacement pour obtenir une diffusion anisotrope. La figure 5.21(a) montre que cette direction privilégiée existe sous un flux lumineux directionnel. Mais ce flux modifie non seulement la direction du mouvement, mais aussi les temps caractéristiques de "run" et de "tumble" (figure 5.22), sans que les "runs" ne soient plus longs vers la source lumineuse (figure 5.21(b)). La diffusion observée ne résulte donc pas uniquement de déplacements directionnels, mais d'un changement dynamique global du système. Ceci est de plus consistant avec les résultats de la première partie de ce chapitre, où nous avons pu décrire l'évolution temporelle des temps caractéristiques en termes de fonctions réponses. Le flux lumineux directionnel qui induit la phototaxie a donc deux effets sur les *Synechocystis*: (i) il oriente les déplacements dans une direction précise et (ii) il augmente les temps de "run" et diminue les temps de "tumble".

5.3 Conclusion

Nous nous sommes intéressés dans ce chapitre à la réponse dynamique des *Synecho-cystis* soumises à des échelons d'intensités lumineuses. En situation isotrope, les cyanobactéries adaptent leurs temps caractéristiques à chaque augmentation de luminosité : leur coefficient de diffusion augmente en raison de l'accroissement des durées moyennes des "runs" et de la diminution des durées moyennes des "tumbles". Ces variations sont transitoires et relaxent en environ 1000 secondes vers l'état initial. Nous avons interprété

5.3. CONCLUSION 135

les évolutions obtenues dans le cadre de la théorie de la réponse linéaire. Si nos résultats ne visent pas à établir une fonction réponse précise, l'introduction d'une forme utilisée pour la chimiotaxie des *Escherichia coli* modélise convenablement les données expérimentales.

Nous avons ensuite étudié la pertinence de ces régimes transitoires dans le cas de la phototaxie des Synechocystis. Nous constatons un mouvement orienté vers la source de lumière pour une certaine partie de la population, d'autres bactéries conservant un mouvement aléatoire. Nous avons comparé la dynamique de ces deux populations. Les bactéries aux trajectoires aléatoires sont sensibles à l'application de l'éclairage directionnel, sans doute à cause de l'augmentation de l'intensité moyenne qui en résulte. Ainsi, leurs temps de "runs" et de "tumble" varient de manière similaire à ce que nous avons observé en conditions isotropes, sans que leurs périodes de "runs" ne s'effectuent dans une direction privilégiée. En revanche, les bactéries phototactiques sont spécifiques uniquement de par la moyenne non nulle des directions de "runs" vers la source de lumière. De manière notable, leurs temps caractéristiques sont identiques à ceux de la population aléatoire mentionnée ci-dessus. Nous concluons que dans le cas de la Synechocystis, la phototaxie s'effectue selon deux mécanismes différents, l'un directionnel nécessaire à l'anisotropie du mouvement, et l'autre dynamique lié aux variations d'intensités lumineuses globales. Des expériences complémentaires pourraient être destinées à déconvoluer ces effets grâce à un meilleur contrôle de la formation du faisceau incident sur les bactéries, en termes de géométrie, d'intensité et de longueurs d'onde.

Conclusion générale

L'identification du mode de transport de la souche Synechocystis est une problématique pertinente vis-à-vis de ses potentielles applications à des procédés bio-industriels. Nous avons donc étudié en premier lieu la motilité de surface de cette cyanobactérie. Celle-ci est intermittente, avec des temps caractéristiques de "run" et de "tumble" qui lui sont propres. La dynamique résultante, qui peut être assimilée à une marche aléatoire à temps continu, est caractérisée par un coefficient de diffusion que nous avons exprimé en fonction des temps caractéristiques de la motilité intermittente. Sans contrainte extérieure, les bactéries ralentissent après leur arrivée sur la surface car elles secrètent des exopolysaccharides. En effet, nous n'observons pas cette adaptation avec les souches mutantes qui ne produisent pas de substance extra-cellulaire. Un modèle basé sur le recouvrement progressif de la surface par les exopolysaccharides est proposé pour expliquer la chute du coefficient de diffusion. Cette étude met en évidence le rôle majeur des exopolysaccharides dans le ralentissement des micro-organismes, qui constituerait une étape importante vers leur organisation sous forme de biofilm.

Pour étudier plus précisément le lien entre motilité et structure du biofilm, nous avons réalisé des expériences de colonisation sur des surfaces de duretés différentes. La motilité cellulaire est affectée par la rigidité du substrat, avec notamment une proportion de bactéries non motiles plus importantes sur les surfaces molles. Après une semaine de croissance, des morphologies de biofilms différentes émergent : le nombre de microcolonies et leur adhésion sont liés à la raideur du substrat, sans que la croissance cellulaire ne soit impactée. Nous proposons que la densité de micro-colonies est pilotée par un temps caractéristique, dépendant de la raideur de la surface, au-delà duquel les particules cessent de diffuser. Nous avons ensuite envisagé la constitution de micro-colonies comme un phénomène résultant de la croissance des bactéries et de leur capacité à se lier entre elles, et construit une simulation numérique permettant de lier le développement de micro-colonies à la non-motilité des bactéries. Il reste cependant à expliquer la propension des *Synechocystis* à être moins motiles sur les surfaces molles. Est-ce que cela résulte d'une dissipation énergétique plus importante lors du mouvement? D'une déformation locale du substrat? De liaisons chimiques entre les pili et les surfaces?

Les derniers résultats expérimentaux de cette thèse portent sur la modification du comportement diffusif des cellules en fonction des conditions lumineuses. Lorsque les Sy-

nechocystis sont soumises à des échelons de luminosité isotropes, leur motilité est affectée et les temps de "run" et de "tumble" varient. Nous décrivons cette modification dans le cadre de la théorie de la réponse linéaire, où l'évolution de ces temps dépend d'une fonction réponse et du signal d'entrée. Nos résultats sont convenablement reproduits grâce à une fonction réponse qui est au départ adaptée pour d'autres souches bactériennes soumises à des stimuli de natures différentes. La possibilité de généralisation de la fonction utilisée ici à d'autres types de contrainte ou de micro-organismes constitue une piste intéressante à explorer pour étudier les mécanismes généraux d'adaptation du vivant à son milieu.

Sous un flux lumineux directionnel, nous observons un mouvement moyen dans la direction de la lumière, caractéristique des propriétés phototactiques des Synechocystis. Ce mouvement commence dès la mise en place du flux, signe d'une reconnaissance de la direction de la lumière par les bactéries avec un laps de temps très court. Cependant, la dynamique des bactéries demeure hétérogène, certaines continuant de se déplacer aléatoirement pendant que d'autres se dirigent vers la source lumineuse. La dynamique diffusive accélère non seulement dans la direction de l'éclairage, mais également dans sa direction transverse, et évolue au cours d'un échelon. Ceci indique une seconde échelle de temps dans la réponse au flux lumineux, qui concerne non pas leur orientation, mais leur dynamique globale, comme dans le cas isotrope. Nos résultats indiquent que si la direction de la lumière influence rapidement l'orientation choisie par les Synechocystis, son intensité entre également en jeu en modifiant les temps caractéristiques de la motilité.

Ce travail ouvre quelques perspectives de recherches. Parmi celles-ci, nous avons mis en évidence le fait que l'adhésion des bactéries au substrat est fortement liée à l'apparition de biofilms. Il faudrait compléter nos connaissances dans ce domaine avec des expériences dimensionnées, où l'on pourrait imposer une dépression à une bactérie isolée pour la détacher de surfaces de différentes rigidités. Le processus d'adhésion est probablement dû aux pili de type IV, qui sont des appendices répandus chez de nombreuses souches bactériennes, et concerne aussi les liaisons des cellules entre elles. La compréhension du mécanisme d'interaction entre cellules permettrait de mieux caractériser la formation de micro-colonies.

Ces interactions peuvent aussi générer des mouvements collectifs dans les systèmes denses. Dans ce manuscrit, nous n'avons pas étudié la dynamique à haute densité cellulaire, mais des expériences préliminaires indiquent l'existence probable de corrélations à longue portée. Celles-ci pourraient être liées à la rigidité de la matrice d'exopolysaccharides produite par les *Synechocystis*. La caractérisation d'une dynamique collective et une étude comparative avec des souches mutantes disposant de caractéristiques de production de pili ou d'EPS modifiées serait également pertinente pour améliorer les connaissances sur les mécanismes de formation de biofilm.

De tels mouvements collectifs sont présents dans l'instabilité de digitation observée chez la *Synechocystis* sous un éclairage directionnel (voir figure 1.16). Cette instabilité est généralement modélisée avec une équation de diffusion macroscopique. Les résultats

présentés dans ce manuscrit montrent comment les conditions d'éclairage modifient les temps caractéristiques individuels des bactéries. Il pourrait être utile de suivre la formation de cette instabilité à la fois d'un point de vue macroscopique et microscopique, en termes de temps de "run" et de "tumble", pour approfondir la compréhension du lien entre motilité individuelle et dynamique d'ensemble.

Annexes

A Annexes du chapitre 4

A.1 Calcul du nombre de bactéries pour les expériences de colonisation de surface

Au cours de la croissance, les bactéries peuvent former des agrégats, qui sont alors considérés comme une seule particule. Pour éviter ce biais, N(t) a été déterminé en sommant les aires de chaque particule détectée, en divisant par la médiane de ces aires. L'équation 1 explicite ce calcul, où P particules de taille $\mathcal{A}_{10} \geq 10$ pixels sont détectées sur quatre images différentes, et où $\overline{\mathcal{A}_{10}}$ est la valeur médiane de ces tailles.

$$N(t) = \frac{\sum_{i=1}^{P} \mathcal{A}_{10}(i)}{\overline{\mathcal{A}_{10}}} \tag{1}$$

A.2 Calcul du nombre de micro-colonies

Pour calculer le nombre de micro-colonies présentes en surface, nous partons des images brutes, auxquelles on applique un filtre passe-bande sous ImageJ. Afin de pouvoir utiliser pour le calcul des images qui ont été prises sur des zones différentes de la même surface, sur laquelle l'éclairage n'est pas forcément homogène, on calcule le champ de luminosité moyen en arrière-plan des images avec l'outil cftool de MATLAB. On soustrait alors à chaque image son arrière-plan, ce qui permet d'avoir des images de valeur moyenne nulle partout.

Le contraste est ensuite inversé de telle sorte que les bactéries ressortent en blanc sur fond noir. Sur ces images inversées, les micro-colonies sont détectées grâce à deux critères : on cherche les pixels de l'image dont la valeur est supérieure à un certain seuil S^* . Les pixels contigus répondant à ce critère sont ensuite regroupés et définissent les régions sur lesquelles une bactérie ou plus est présente. Afin d'éliminer les bactéries individuelles, un critère de taille est appliqué sur ces régions : toutes les régions dont l'aire (en pixels) est inférieure à \mathcal{A}_{inf} sont retirées. Le nombre de micro-colonies est alors défini comme le

142 ANNEXES

nombre de régions restantes. Nous avons fixé $A_{inf}=150$ pixels et $S^*=0.25$.

A.3 Détails de la simulation numérique

Initialisation

Initialement, N_i =500 particules sont présentes sur la surface, certaines sous forme libre, d'autres déjà organisées en micro-colonies. On fixe N_c = 30 micro-colonies initiales de 4 particules chacune, il reste alors 380 particules libres. Toutes les particules présentes en micro-colonies seront déclarées non motiles. On attribue à une proportion p_i de particules libres un temps τ_m pendant lequel elles seront motiles, tiré dans la distribution donnée en équation 4.8, où $\tau_{mot,S}$ est pris dans le tableau 4.4, tout comme p_i . Les autres particules libres seront non-motiles. A chaque micro-colonie est attribué un numéro, de telle sorte que l'on peut retrouver les bactéries présentes dans chaque colonie. Chaque particule peut ainsi être soit libre, soit en colonie.

On choisit un pas de temps δt =50 s pour la simulation, qui sera notre résolution temporelle. Le temps maximum de simulation est fixé à 8 jours, soit le temps de l'expérience. Le domaine de simulation est un rectangle de 500×400 μ m, comme les images expérimentales. On fixe des conditions aux limites périodiques, de telle sorte qu'une particule "sortant" par le haut du domaine "réapparaît" par le bas, et de même pour des sorties gauche/droite.

Croissance de la population

La croissance de la population est définie à chaque instant par l'équation 4.6, avec les paramètres donnés en partie 4.3.1. La partie entière de N(t), $\mathcal{N}(t)$ est calculée. A chaque fois que $\mathcal{N}(t+\delta t) > \mathcal{N}(t)$, il faudra créer autant de particules nouvelles sur le domaine. Pour cela, à chaque particule initialement présente est associée une valeur pour stocker l'information sur la division cellulaire. Cette valeur vaut 1 si la particule s'est déjà divisée une fois, 0 sinon.

Cette valeur est initialisée à 0 au début de la simulation pour toutes les particules. Si à l'instant t une nouvelle particule doit être créée, une particule "mère" est choisie aléatoirement parmi celles ayant subi le moins de divisions cellulaires. Si cette particule est libre, la nouvelle particule "fille" est créée sur la position de la "mère", sinon elle est créée aléatoirement dans un cercle ayant pour centre le milieu de la colonie à laquelle appartient la "mère", et de rayon $R_{eq}=R\sqrt{n}$ où $R=1.5~\mu m$ est le rayon moyen d'une bactérie est n le nombre de particules dans la micro-colonie. A la particule "fille" est attribué un temps de motilité τ_m tiré dans la distribution donnée en équation 4.8.

ANNEXES 143

Dynamique

A chaque pas de temps δt , les opérations suivantes sont réalisées :

– Le temps de motilité τ_m restant à chacune des particules présentes est soustrait de $\delta t : \tau_m(t + \delta t) = \tau_m(t) - \delta t$.

- Les particules libres (pas en micro-colonie) dont le temps de motilité est supérieur à 0 se déplacent de 2 μ m dans une direction aléatoire. Cette valeur correspond au critère utilisé pour la définition de la proportion expérimentale de bactéries motiles.
- Les conditions périodiques sont appliquées de telle sorte que toute particule sortant du domaine est ramenée à l'intérieur par le côté opposé à sa sortie.
- Les particules qui sont intégrées dans une micro-colonie ne se déplacent pas.
- Si cela est nécessaire, une particule nouvelle est créée (voir la procédure ci-dessus).
- Les processus de formation et de dissolution des micro-colonies s'effectuent ensuite selon la procédure détaillée ci-après.

Formation et dissolution des micro-colonies

La formation d'une micro-colonie ne peut se faire que si la particule considérée est libre (pas en mico-colonie), qu'elle soit motile ou non. Si elle est située à une distance $d \leq d_{lim}$ d'une particule cible, alors elle peut se lier à elle avec une probabilité $p_{col} = \frac{\delta t}{T_{col}}$, où T_{col} correspond à un temps caractéristique d'interaction pour lequel les bactéries s'attachent. Cette probabilité est simulée à l'aide d'un nombre aléatoire r généré aléatoirement, et il y aura accroche si $r < p_{col}$. On peut alors distinguer deux cas de figure :

- Si la particule cible est une particule libre également, alors une nouvelle microcolonie est créée, avec un nouveau numéro. Les deux particules sont retirées de la liste des particules libres, et conservent leur temps de motilité et leur compteur de division.
- Si la particule cible est déjà dans une micro-colonie, alors la particule initiale rejoint la micro-colonie considérée, qui s'agrandit. Elle conserve son temps de motilité et son compteur de division.

Deux micro-colonies peuvent également fusionner si deux de leurs particules sont séparées par une distance inférieure $d \leq d_{min}$, selon le même principe en utilisant la probabilité p_{col} . Les particules concernées sont alors déplacées vers le barycentre des positions initiales.

La dissolution d'une micro-colonie peut s'effectuer si au moins l'une des particules de la colonie est motile, c'est-à-dire si son temps de motilité à l'instant considéré $\tau_m(t)$ est supérieur à 0. On regarde le τ_m associé à chaque particule présente dans une micro-colonie. Si $\tau_m > 0$, la particule considérée peut s'échapper de la micro-colonie avec une probabilité $p_{esc} = \frac{\delta t}{n \, T_{esc}}$, où T_{esc} est un temps caractéristique de détachement de la particule. Cette probabilité prend également en compte le nombre n de particules présentes dans la micro-

144 ANNEXES

colonie, en considérant que le nombre de liaisons entre les particules est proportionnel au nombre de particules concernées, et donc qu'une particule aura plus de mal à se délier dans une grande micro-colonie. Après s'être détachée, la nouvelle particule sera située à une position aléatoire à une distance de 2 μ m de sa position initiale. Elle rejoint la liste des particules libres, conserve son compteur de division et son temps de motilité τ_m . Deux cas de figure sont également à distinguer :

- Si n=2, alors l'autre particule de la micro-colonie est également décrochée puisqu'elle n'appartient plus à aucune micro-colonie. Elle rejoint la liste des particules libres, conserve son compteur de division et son temps de motilité τ_m .
- Si n > 2, rien ne change pour les autres particules de la micro-colonie concernée.

Les simulations numériques sont lancées quatre fois successives, avec les paramètres $\tau_{mot,S}$ et p_i répertoriés dans le tableau 4.4, qui représente les quatre surfaces d'études. Le reste des paramètres de simulation, c'est-à-dire la distance minimum d_{min} d'interaction entre deux particules, ainsi que les temps caractéristiques d'accroche et de détachement T_{col} et T_{esc} , sont indépendants des surfaces. Leurs valeurs sont classées dans le tableau 4.5. La distance d'interaction d_{min} a été prise en considérant que celle-ci se faisait par l'intermédiaire de pili de 1.5 μ m chacun, et avec des particules de R=1.5 μ m. A la fin du calcul, afin de pouvoir comparer plus facilement avec les images expérimentales où un critère de taille de colonie a dû être défini, seul les micro-colonies de taille supérieure à 4 particules ont été conservées.

B Article publié

Nous reproduisons ici l'article [Vourc'h et al., 2018], publié en cours de thèse, qui reprend des résultats du chapitre 3.

Slowdown of surface diffusion during early stages of bacterial colonization

T. Vourc'h and H. Peerhossaini*

Laboratoire AstroParticules et Cosmologie, CNRS, Université Paris-Diderot, Université Sorbonne Paris Cité, 5 Rue Thomas Mann, 75013 Paris, France

J. Léopoldès[†]

ESPCI Paris, PSL Research University, CNRS, Institut Langevin, 1 Rue Jussieu, 75005 Paris, France and Université Paris-Est Marne-la-Vallée, 5 Boulevard Descartes, Champs sur Marne, Marne-la-Vallée Cedex 2, France

A. Méjean

Laboratoire Interdisciplinaire des Énergies de Demain, CNRS, Université Paris-Diderot, Université Sorbonne Paris Cité, 5 Rue Thomas Mann, 75013 Paris, France

F. Chauvat and C. Cassier-Chauvat

Laboratory of Biology and Biotechnology of Cyanobacteria. Institute for Integrative Biology of the Cell, CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette Cedex, France



(Received 10 November 2017; published 14 March 2018)

We study the surface diffusion of the model cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803 during the incipient stages of cell contact with a glass surface in the dilute regime. We observe a twitching motility with alternating immobile tumble and mobile run periods, resulting in a normal diffusion described by a continuous-time random walk with a coefficient of diffusion D. Surprisingly, D is found to decrease with time down to a plateau. This is observed only when the cyanobacterial cells are able to produce released extracellular polysaccharides, as shown by a comparative study between the wild-type strain and various polysaccharides-depleted mutants. The analysis of the trajectories taken by the bacterial cells shows that the temporal characteristics of their intermittent motion depend on the instantaneous fraction of visited sites during diffusion. This describes quantitatively the time dependence of D, related to the progressive surface coverage by the polysaccharides. The observed slowdown of the surface diffusion may constitute a basic precursor mechanism for microcolony formation and provides clues for controlling biofilm formation.

DOI: 10.1103/PhysRevE.97.032407

I. INTRODUCTION

In nature, bacteria develop preferentially in contact with solid surfaces by forming biofilms, i.e., masses of adherent cells embedded in slimy extracellular matrices. Biofilms are essential to bacterial growth and survival to environmental stresses. They capture nutrients in the vicinity of the cells and the peripheral cells exposed to the noxious agents protect the internal cells [1,2]. Biofilms also develop in many industrial and medical situations and their formation is a key mechanism in the infection of a living host by pathogenic organisms [3-5].

The biofilm structure depends critically on mass transport, surface chemistry, and surface topology [6]. The initial contact of the bacteria with the surface is followed by the formation of microcolonies [7]. Then the three-dimensional morphology of the mature film develops and chemical signaling triggers the release of bacteria in the liquid medium, which are then transported to other colonization sites via the flow of the liquid medium [8].

*hassan.peerhossaini@univ-paris-diderot.fr †julien.leopoldes@espci.fr

Bacteria are known to produce high-molecular-weight polymeric substances such as extracellular polysaccharides (EPSs) [9], which play important roles during the main stages of biofilm formation. For example, the mature biofilm contains the macromolecules adsorbed on the solid substrate which provide mechanical stability and adhesion. A distinction can be made between capsular EPSs (firmly bound to the outer cell membrane) and released EPSs (easily detached from the outer cell membrane) [10]. Moreover, it has been proved recently that the polysaccharides excreted by motile bacteria form attracting trails, giving rise to spatial accumulation of the cells, thereby yielding the localized growth of microcolonies [11–13]. The production of EPSs is also linked to the emergence of peculiar dynamics during the initial stages of surface colonization by altering the distribution of the velocity of bacterial cells [14].

In this work we study the relationship between excreted EPSs and the diffusion coefficient D at the early stages of surface colonization. Investigations are carried out with the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803, a model of environmentally important photosynthetic prokaryote that produces EPSs in various forms [10,15]. The motility of Synechocystis on solids relies on the action of type IV pili [11,16–19] (the pili extend, bind on the solid surface, and then

retract). Results collected for the wild-type cells are compared with those obtained with different mutant strains described elsewhere [10].

Surface motion occurs by the usual twitching motility but the diffusion coefficient is observed to decrease systematically with time down to a plateau. This effect is observed only with the wild-type and the $\Delta sll1581$ mutant strain, both able to produce released exopolysaccharides. This is not noticed for two double-mutant strains ($\Delta sll581$ -sll1875 and $\Delta sll0923$ -sll5052) that produce a lower amount of released EPSs. We propose an interpretation that takes into account the coverage of the solid surface by the trails of the excreted EPSs. This affects the temporal characteristics of the intermittent twitching motility of the cells. We believe that such a process constitutes an important step in the adaptation of microorganisms to hard surfaces prior to the formation of microcolonies and biofilms.

II. MATERIALS AND METHODS

A. Bacterial suspensions and measurement of cell motion

The wild-type (WT) strain of the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803 was obtained from the Pasteur Institute, while the EPS-depleted single mutant ($\Delta sll1581$) and double mutants ($\Delta sll581$ -sll1875 and $\Delta sll0923$ -sll5052) were previously constructed by Jittawuttipoka *et al.* [10]. The three mutant strains produce less capsular EPSs than the WT cells. The amount of released EPSs produced by the single mutant ($\Delta sll1581$) is similar to that of the WT cells; both double mutants ($\Delta sll1581$ -sll1875) and ($\Delta sll0923$ -sll5052) form less released EPSs.

All strains are routinely cultured in the BG11 standard mineral medium and subcultivated by diluting 3 mL of a mother culture in 47 mL of fresh BG11. The suspensions are stirred by a magnetic agitator operating at 360 rotations per minute in a clean room at 20 °C. They are placed under white light of an intensity of 1.3 W m⁻² for 7 days followed by 24 h of darkness and a subsequent 2 h of light before running the experiments. At this stage, the concentration of cyanobacteria is approximately 2×10^7 cells per mL. The suspensions are diluted from twofold to tenfold in fresh BG11 before introduction in the measurement chamber. With this protocol, some of the cells are dividing, which results in an average particle diameter $d \sim 3 \, \mu \text{m}$, slightly larger that single cells, whose size is approximately 2 μm .

Experiments are conducted in two different systems as represented in Fig. 1. One measurement cell consists in a BRAND® cavity microscope slide ($26 \times 76 \text{ mm}^2$) closed by a coverslip (Menzel-Gläser, $22 \times 22 \text{ mm}^2$) and sealed with high-vacuum grease [Fig. 1(a)]. The second measurement cell is a Y-junction microfluidic channel of cross section $100 \times 205 \ \mu\text{m}^2$ [see the protocol detailed in Fig. 1(b)].

B. Cell tracking

The cyanobacterial cells are observed with a homemade inverted microscope equipped with a Nikon TU Plan 10× objective and a white light source. Their motion is recorded with a monochrome camera (Edmund Optics) at one frame per second. The recordings are postprocessed with IMAGEJ software to obtain binary images and then analyzed for particle

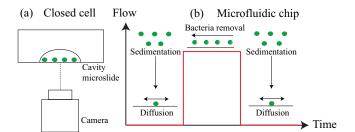


FIG. 1. Experimental setup. (a) Closed cavity where the bacterial cells (dots) sediment and diffuse on the lower surface. (b) Protocol followed with the microfluidic cell: The first experiment is carried out similar to that in (a) but in a microfluidic cell with controllable flow. After sedimentation is completed and having let the bacteria diffuse enough on the lower surface, a pressure gradient is applied to detach the cells from the surface. Then the flow is stopped and the sedimentation-diffusion process starts again. In both setups, bacterial cells are observed with the same equipment (optical microscope coupled to a CCD camera).

tracking [20] with MATLAB. Only trajectories whose duration is longer than 250 s are retained for further analysis, while the few nonmotile cells are ignored. The number of analyzed trajectories is 9843 in Sec. III A, 453 in Sec. III B, and 1424 for the experiments in the microfluidic chip. Details on the computation of the mean-square displacement (MSD) are given in Appendix A.

III. RESULTS

A. Cell transport, contact with a solid surface, and slowdown of motion

Data recording starts a short time after the introduction of the cyanobacterial cells in the measurement chamber. Due to cell sedimentation, the number N(t) of bacterial cells detected on the hard surface increases with observation time t until a final value N_{∞} is reached [see Fig. 2(a)]. The sedimentation process is reproducible and can be described by the empirical law

$$N(t) = N_0 + (N_{\infty} - N_0)(1 - e^{-t/\tau_N}), \tag{1}$$

where $\tau_N=2081\pm4\,\mathrm{s}$ and N_0 is the initial number of bacteria at the surface. The characteristic time for sedimentation τ_N can be obtained from the Stokes velocity $v_S=\Delta\rho g V_p/6\pi\,\eta R$, where $\Delta\rho$ is the density contrast between the bacterial cells and the culture medium, g is the acceleration of gravity, V_p is the volume of the bacterial cells, R is their radius, and $\eta\approx 10^{-3}$ Pa s is the dynamical viscosity of the suspension as measured by means of a horizontal capillary. With $\Delta\rho=100\,\mathrm{kg}\,\mathrm{m}^{-3}$ [21], $g=9.81\,\mathrm{m}\,\mathrm{s}^{-2}$, $R=1.5\,\mu\mathrm{m}$, and the height of the cell $h=1\,\mathrm{mm}$, we obtain $\tau_N\sim 2000\,\mathrm{s}$, consistent with experiments.

The dynamics of surface motion is first described by computing the mean-square displacement during a short-time interval $10 < \Delta < 80$ s, as a function of the observation time t [Eq. (A1)]. Figure 2(b) indicates that this short-time MSD is a linear function of Δ for all observation times t, as for Fickian diffusion. However, the corresponding

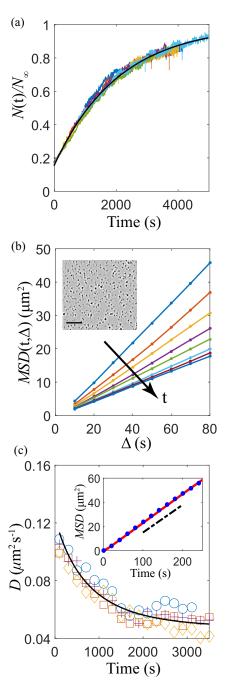


FIG. 2. (a) For five different experiments, temporal evolution of the number of cyanobacterial cells detected on the hard surface divided by the final number of cells. The plain line corresponds to Eq. (1). (b) Mean-square displacement at several observation times for a selected experiment, computed according to Eq. (A1). The MSD is plotted for observation times ranging from t=100 to 2900 s in steps of 400 s. Increasing observation time is indicated by the arrow. The inset shows a snapshot of a typical experiment where bacteria appear as dark spots on the gray background (scale bar 50 μ m). (c) Symbols show the temporal evolution of the diffusion coefficient for experiments similar to (a); the black line is the fit based on Eqs. (2) and (3) (see the discussion Sec. IV C for details on the fitting procedure). The inset shows the experimental MSD at long times (circles) and as computed from numerical simulations (line). The dashed black line indicates the slope given by Eq. (2).

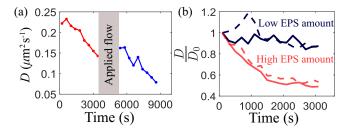


FIG. 3. (a) Temporal evolution of the coefficient of diffusion for experiments carried out in the microfluidic system [see Fig. 1(b)]. Renewal of the bacterial cell population due to the liquid flow occurs during the period corresponding to the vertical gray bar. (b) Temporal evolution of the diffusion coefficient normalized by its initial value D_0 for various Synechocystis strains. Data are the result of averaging over two different experiments. The black (dark) dashed line shows Δsll 1875-sll1581, the black (dark) solid line Δ sll0923-sll5052, the red (light) solid line the wild type, and the red (light) dashed line Δ sll1581.

time-dependent diffusion coefficient D(t) defined by $\mathrm{MSD}(t,\Delta) = 4D(t)\Delta$ decreases with t. Such a slowdown of the dynamics, which constitutes the main result of this work, is reported in Fig. 2(c) for different experiments, showing a systematic gradual decrease of D(t) until a plateau is reached at $D_{\infty} \approx 0.053 \pm 0.006~\mu\mathrm{m}^2\,\mathrm{s}^{-1}$ after approximately 2500 s. Here D_{∞} is independent of the instantaneous bacterial surface density in the range explored here $(10^9-10^{10}~\mathrm{particles/m}^2)$. This corresponds to a surface fraction less than 8% and a typical interparticle distance of at least $10~\mu\mathrm{m}$, larger than the average cell diameter $d \sim 3~\mu\mathrm{m}$ [see Fig. 2(b), inset].

Figure 3(a) shows the results obtained with the microfluidic system, which is used to renew the population of bacteria in the surface vicinity without changing the surface on which diffusion occurs. After the introduction to the microfluidic cell, the cyanobacteria are allowed to sediment and diffuse onto the surface without applied flow. The observed trend is similar to the experiments in the closed chamber: The diffusion coefficient decreases with time. After about 1 h of surface diffusion, the cells are detached from the surface by establishing a fluid flow for 20 min [vertical gray bar in Fig. 3(a)]. Then the flow is stopped and the cells are allowed to sediment and diffuse onto the surface again. The diffusion coefficient takes the same value as what was found just before the washing flow. Since the population of cells was totally renewed by the washing flow, this observation suggests that the surface has retained a signature of the past diffusion events, which influences the behavior of the new incoming cells.

Moreover, we find that the time evolution of the diffusion coefficient is highly dependent on the ability of *Synechocystis* to produce released EPSs [see Fig. 3(b)]. The wild-type and the single mutant $\Delta sll1581$ strains, which produce similar high quantities of released EPSs as compared to the two double-mutant strains ($\Delta sll1581$ -sll1875 and $\Delta sll0923$ -sll5052), are characterized by the significant decrease of about 60% of the initial diffusion coefficient. In contrast, the $\Delta sll1581$ -sll1875 and $\Delta sll0923$ -sll5052 double mutants, which produce much less released EPSs, exhibit a smaller decrease of 10% in their

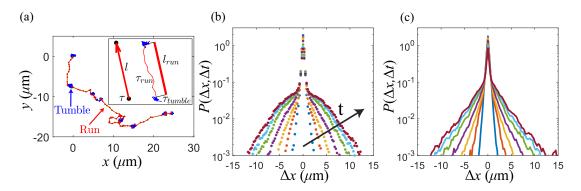


FIG. 4. (a) Trajectory of a bacterial cell (668 s). Runs correspond to (red) lines and tumble to (blue) dots. The inset shows a representation of a diffusion step by the continuous-time random-walk model (left) and the corresponding experimental diffusion step where the distance traveled during a run l_{run} , the corresponding run duration τ_{run} , and the tumble duration τ_{tumble} are indicated (right). Also shown are displacement probabilities along one direction for (b) experimental trajectories at the plateau and (c) simulated trajectories. The distributions are given for time intervals $\Delta = 2, 5, 10, 20, 40, 60$, and 80 s. Increasing time interval is indicated by the arrow.

diffusion coefficient. Hence, the released EPSs are identified as a major cause for the slowdown of the cell dynamics.

B. Normal diffusion resulting from twitching motility

We now focus on the permanent regime once the plateau has been reached and analyze the trajectories of the bacterial cells for a representative experiment which will be referred to as experiment 1. Figure 2(c) (inset) displays the linearity of the mean-square displacement (A2) for the representative experiment with a diffusion coefficient at the plateau $D_{\infty,1}$ = $0.059 \pm 0.001 \ \mu \text{m}^2 \text{ s}^{-1}$. Yet the apparently normal surface diffusion of Synechocystis stems from the complex dynamics illustrated by the non-Gaussian probability distribution function (PDF) of displacement shown in Fig. 4(b). The central part of the distribution corresponds to a state of low mobility (tumble), while the tails reflect the higher cell mobility occurring during the run periods [22,23]. A typical trajectory in Fig. 4(a) indeed reveals twitching motility with run and tumble motion. The run periods are directional and detected with the procedure explained in Appendix B, from which we obtain the run times τ_{run} and additionally the tumble times τ_{tumble} and the mean velocity of runs, defined as $V_m = l_{\text{run}}/\tau_{\text{run}}$, where l_{run} is the distance traveled during the run.

We conduct numerical simulations in order to check for the relevance of the detection procedure (see details in Appendix C). First, we fit the experimental distributions of run and tumble time as in Fig. 9 (Appendix C). Additionally, we assume that runs are *ballistic* excursions of length $l_{\rm run} = \tau_{\rm run} \times V_m$, as suggested by experiments. Then, for each step of the simulation, $\tau_{\rm run}$, $\tau_{\rm tumble}$, and V_m are chosen randomly along the fits of the experimental distributions. This reproduces the experimental displacement PDF, as shown by comparing Figs. 4(b) and 4(c), and provides a diffusion coefficient from simulations $D_{\rm simu} \approx D_{\infty,1}$ [inset of Fig. 2(c)].

Details on the slowdown of motion are provided by analyzing the time variation of $\langle \tau_{\text{run}} \rangle$, $\langle \tau_{\text{tumble}} \rangle$, and $\langle V_m \rangle$ (here angular brackets indicate a time average over temporal windows of 200 s), plotted Figs. 5(a), 5(b), and 5(c), respectively. For the wild-type and the Δsll 1581 mutant that produce released EPSs, $\langle \tau_{\text{run}} \rangle$ decreases and $\langle \tau_{\text{tumble}} \rangle$ increases with time. This

is not observed with the two double mutants that produce less released EPSs and their tumble and run times are almost constant. Importantly, $\langle V_m \rangle$ is not only similar but also constant for all the bacterial strains studied.

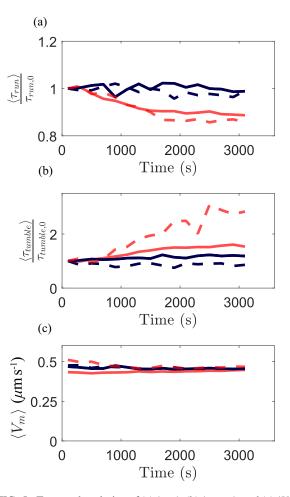


FIG. 5. Temporal evolution of (a) $\langle \tau_{\text{run}} \rangle$, (b) $\langle \tau_{\text{tumble}} \rangle$, and (c) $\langle V_m \rangle$. Here \overline{V}_m is indicated by the arrow. Data are normalized by their initial value for the various *Synechocystis* strains. The lines are defined as in Fig. 3(b).

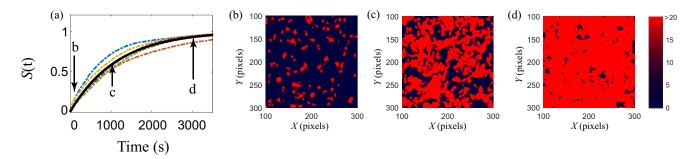


FIG. 6. (a) Fraction of surface area covered by trajectories in various experiments as a function of time (dot-dashed lines). The thick black solid line is a curve fitted with Eq. (3) (see the discussion in the text). (b)–(d) Colonization maps of the surface for the times indicated in (a). Colormaps indicate the cumulated number of visits in the considered pixel (dark areas indicate empty sites whereas bright areas indicate sites visited more than 20 times).

C. Surface area covered by trajectories

As a basic step for early stages of biofilm formation, we analyze how the surface is explored by the diffusing bacteria. The images are binarized such that the bacteria appear as black disks on a white background and every black pixel is given a value of 1 (zero otherwise). The cumulated number of visits for each pixel at a given time is then obtained by summing iteratively all preceding images. Figures 6(b)-6(d) display how the surface area is progressively filled by the trajectories of the diffusing bacteria during the time scale of the experiment. Moreover, although the experiments are conducted in the dilute regime, the fraction of distinct sites (pixels) visited S(t) tends to 1, meaning that the whole surface area of the sample can be screened by EPSs. Figure 6(a) points out the robustness of this feature.

IV. DISCUSSION

A. Dynamics

The fact that the average velocity of runs $\langle V_m \rangle$ is common to all cyanobacterial strains used in this study implies that it is not linked to the production of EPSs and calls for a simple estimate based on lubrication theory. The motion of cyanobacterial cells is ensured by the traction of type IV pili which provides the force F necessary to shear a layer of fluid of viscosity η and thickness h squeezed between the bacteria and the surface, leading to $F \sim a\eta V/h$, where $a \sim \pi R^2$ is the sheared area ($R = 1.5 \,\mu\text{m}$ is the radius of a bacterial cell). With $V \sim 1~\mu\mathrm{m~s^{-1}}$ the maximum velocity during runs, $h \sim 1~\mathrm{nm}$ the thickness of the sheared layer, and $\eta \sim 1 \times 10^{-3}$ Pa s the dynamical viscosity, we obtain the force exerted by the pili $F \sim 7$ pN, consistent with the order of magnitude obtained from mechanical testing with atomic force microscopy [24]. The velocity of the bacterial cells during run periods is thus limited by the viscous dissipation of the sheared water (liquid mineral medium BG11) layer at the interface between the bacterial cells and the solid surface.

B. Continuous-time random walk

The diffusion coefficient at long times may be obtained by considering a continuous-time random walk, where the particle jumps instantaneously over a length l after a waiting time τ [25,26], as illustrated in the inset of Fig. 4(a). We

have computed both $l=l_{\rm run}$ and $\tau=\tau_{\rm run}+\tau_{\rm tumble}$ (taken consecutively) and verified that the second moment of the jump length PDF and the first moment of the waiting-time PDF exist. Then the diffusion coefficient takes the simple expression $D=\langle l^2\rangle/4\langle \tau\rangle$. Ballistic runs occurring at constant velocity $\overline{V}_m\sim 0.47\pm 0.3~\mu{\rm m~s^{-1}}$ [see Fig. 5(c)] suggest the approximation $\langle l^2\rangle\approx \overline{V}_m^2\langle \tau_{\rm run}^2\rangle$. Therefore, an expression for the diffusion coefficient reads

$$D \sim \frac{1}{4} \overline{V}_m^2 \frac{\langle \tau_{\text{run}}^2 \rangle}{\langle \tau \rangle}.$$
 (2)

The computation of the PDF for $\tau_{\infty,1}$ and $\tau_{\mathrm{run},\infty,1}^2$ leads to well-defined average quantities but without a second moment. To calculate D from Eq. (2) we use therefore $\langle \tau_{\infty,1} \rangle \approx 64~\mathrm{s}$ and $\langle \tau_{\mathrm{run},\infty,1}^2 \rangle \approx 67~\mathrm{s}^2$ with both quantities rounded to the nearest whole number and taken at the plateau value for the representative experiment corresponding to $D_{\infty,1}$. This provides $D \approx 0.058~\mu\mathrm{m}^2~\mathrm{s}^{-1}$, which is similar to experimental values, as indicated in the inset of Fig. 2(c). From now on, we will describe the time evolution of the diffusion coefficient presented in Fig. 2(c) with the two parameters $\langle \tau \rangle$ and $\langle \tau_{\mathrm{run}}^2 \rangle$.

The coefficient of diffusion is not affected by interparticle interactions since experiments are achieved in a dilute regime precluding intercell friction and adhesion. Instead, our results with the WT strain and various mutants depleted or not in EPSs reveal that the amount of released EPSs is key. Moreover, renewal of the population of bacterial cells with the microfluidic setup indicates that the decrease of the diffusion coefficient is due to the modification of the surface properties by previously diffusing cells. In the following we propose a mechanism whereby released EPSs stick on the surface in the form of excreted trails [27,28], which modifies the coefficient of diffusion.

C. Mechanism for the slowdown

The decrease of the coefficient of diffusion and the progressive surface coverage by the trajectories occur on concomitant time scales. Therefore, it is tempting to correlate the surface coverage and the parameters of the model described by Eq. (2). Figure 7 shows that $\langle \tau \rangle$ and $\langle \tau_{\text{run}}^2 \rangle$ vary monotonically with the fraction of distinct sites visited S(t). These two essential temporal parameters, which govern the expression of the diffusion coefficient, may be a function of the probability P(t)

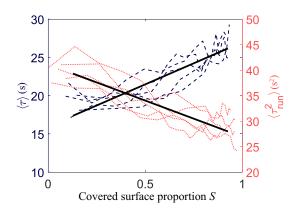


FIG. 7. Variation of $\langle \tau \rangle$ (dashed lines) and $\langle \tau_{\text{run}}^2 \rangle$ (dotted lines) as functions of the fraction of distinct visited sites S(t) for five different experiments. The solid lines are linear interpolations.

to be located on a surface coated by an extracellular matrix. By approximating $P(t) \approx S(t)$, both parameters can be written simply as a weighted sum of the covered surface such as $\langle \tau \rangle \approx \langle \tau_{glass} \rangle [1 - S(t)] + \langle \tau_{EPS} \rangle S(t)$, with the same formula for τ_{run}^2 instead of each τ .

The computation of S(t) for N random walkers pertains to a class of longstanding problems [29]. Here, both the number of diffusing bacterial cells and the coefficient of diffusion are time dependent and the empirical formula

$$S(t) = 1 - e^{-t/\tau_S} (3)$$

is used to describe experimental data, resulting in a convenient fit with $\tau_S = 1150 \pm 6$ s $< \tau_N$ [Fig. 6(a)]: Most of the surface is visited before sedimentation is complete.

Then, plugging Eq. (3) into the expression for $\langle \tau \rangle$ and $\langle \tau_{\text{run}}^2 \rangle$ as above yields a numerical estimate of the temporal evolution of D(t) from Eq. (2), which can be compared to measurements. Figure 2(c) indicates good agreement. Therefore, the present analysis implies that the slowdown of the diffusive dynamics can be reasonably attributed to the coverage of the surface by the excreted exopolysaccharides.

Finally, one may ask why cells have longer tumble times and shorter run times on EPSs than on glass. Our results show that the decrease of the diffusion coefficient is not related to viscous drag that could result from the shearing of EPS trails left on the surface, since the average velocity during run periods \overline{V}_m remains constant during the experimental time scale. Moreover, \overline{V}_m is similar for the wild-type strain and for all mutants regardless of their total EPS production rate, confirming that EPSs do not provide additional dissipation during motion. However, it is known that during the early stages of the interaction of the bacterial cells with a surface, cells detect the presence of the extracellular matrix, which induces a positive feedback loop that in turn leads to enhancement of EPS production and cell accumulation [30,31]. For example, B. subtilis uses its flagella as mechanosensory organelles for surface sensing. For other microorganisms such as Myxococcus xanthus, EPSs play a fundamental role in pilus retraction during social motility [32] and pili-mediated twitching motility is affected by surface stiffness, topography, and chemistry [2,33,34].

Hence, we propose that *Synechocystis* cells sense the EPSs deposited on the surface, which triggers cellular changes that affect the temporal characteristics of run and tumble motion. This is consistent with the description of run and tumble rates from linear response theory for bacteria submitted to spatial changes in concentration of chemicals [35,36].

V. CONCLUSION

The experimental results presented here show a correlation between the diffusive dynamics of the bacterial cells and their propensity for released EPS excretion. The observed slowdown of the diffusion is due to the evolution of the characteristic times of the intermittent dynamics rather than to the enhanced dissipation during the runs due to the viscosity of EPSs. Since the estimated surface fraction of visited sites and the coefficient of diffusion evolve with similar time scales, we propose a model for the decrease of the diffusion coefficient based on the deposition of EPSs on the surface. This suggests strategies for controlling biofilm formation and therefore limiting the infection of host tissues or undesired adhesion in industrial applications.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Di Prima and L. Platzer for assistance with the experimental setup and M. Jaharri (LIMSI, Université Paris–Sud) and G. Chau for help with the microfluidic system. We also thank J. Tailleur (MSC, Université Paris–Diderot) for helpful discussions.

APPENDIX A: CALCULATION OF MEAN-SQUARE DISPLACEMENT

In order to study the temporal evolution of the motility, we introduce a time-dependent MSD, which is computed at observation time t for different time intervals Δ as

$$MSD(t,\Delta) = \frac{1}{N_{\delta}} \sum_{i=1}^{N_{\delta}} \frac{1}{2\delta - \Delta} \sum_{t'=t-\delta+\Delta/2}^{t+\delta-\Delta/2} \left[X_i \left(t' + \frac{\Delta}{2} \right) - X_i \left(t' - \frac{\Delta}{2} \right) \right]^2, \tag{A1}$$

where δ is half the time separating two successive values of t and N_{δ} is the number of active particles between times $t - \delta + \Delta/2$ and $t + \delta - \Delta/2$. The long-time limit of the diffusion is described by computing the ensemble- and time-averaged MSDs, as defined in Eq. (A2), where N is the total number of particles, T_i the trajectory length i, $X_i(t)$ the position of the particle i at time t, and Δ a given time interval:

$$MSD(\Delta) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{N} \frac{1}{T_i - \Delta} \sum_{t=1}^{T_i - \Delta} [X_i(t + \Delta) - X_i(t)]^2.$$
 (A2)

APPENDIX B: RUN AND TUMBLE TIMES

Run times τ_{run} are measured by computing a coarse-grained velocity V_{δ} at each time point, with δ an adjustable time

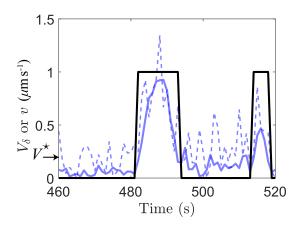


FIG. 8. Coarse-grained velocity V_{δ} [solid (gray) line] and instantaneous velocity v (dashed line). The black solid line indicates the selection of run periods according to the criteria explained in the text (set to 1 when a run is detected and 0 otherwise). The velocity threshold V^* is indicated with an arrow.

interval,

$$V_{\delta}(t) = \frac{|X(t+\delta/2) - X(t-\delta/2)|}{\delta}.$$

An example of such a computation with $\delta=4$ is shown Fig. 8, where the highest velocity peaks correspond to runs and are separated by tumbles. Run periods are selected according to two different criteria: the velocity $V_{\delta} > V^{\star}$ and the distance traveled $\Delta x > \Delta x^{\star}$, where V^{\star} and Δx^{\star} are some threshold velocity and length, respectively. Once run periods are accepted, the rest of the trajectory is filled with tumble periods.

The criteria $V^* = 0.2 \ \mu \text{m s}^{-1}$ and $\Delta x^* = 0.9 \ \mu \text{m}$ [as suggested by tails of the PDF in Fig. 4(b)] provide a faithful distinction between the various types of motion. While the choice of V^* and Δx^* is somewhat arbitrary, the conclusions based on the use of run and tumble times do not depend significantly on these criteria.

APPENDIX C: NUMERICAL SIMULATIONS

Numerical simulations are based on the Monte Carlo method. Here 453 particles are launched, with trajectories of 969 s. The duration of tumbles and runs is taken from the experimental distributions [Figs. 9(a) and 9(b)], fitted by a

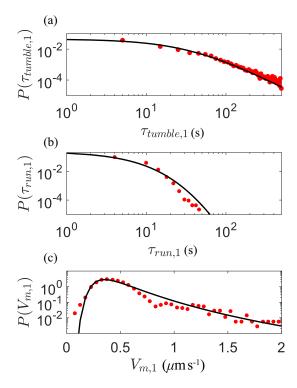


FIG. 9. Distribution of (a) tumble times, (b) run times, and (c) average velocity during runs $V_m = l_{\rm run}/\tau_{\rm run}$. Experimental data (points), corresponding to the experiment leading to $D_{\infty,1}$ described in Sec. III B, are fitted with expressions given in Appendix C (solid lines), which are used for numerical simulations.

power law of the form

$$P(\tau_i) = \frac{\alpha_i}{A_i} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau_i}{A_i}\right)^{1 + \alpha_i}},$$

with $A_{\text{tumble}} = 38 \text{ s}$, $\alpha_{\text{tumble}} = 1.7$, $A_{\text{run}} = 42 \text{ s}$, and $\alpha_{\text{run}} = 11$. The tumble motion is simulated by making a given particle jiggle in the polar system of coordinates whose center is the fixed position between two runs. The coordinates (r,θ) are chosen such that θ is random and r is selected in an exponential distribution of mean $\lambda_{\text{tumble}} = 0.19 \ \mu\text{m}$. The run motion is defined by ballistic excursions of duration τ_{run} , during which the traveled distance is $l_{\text{run}} = V_m \tau_{\text{run}}$, where τ_{run} is selected from $P(\tau_{\text{run}})$ and V_m is chosen from a generalized extreme value probability law, which conveniently fit the experimental distribution [Fig. 9(c)]. This law is defined with a location parameter $\mu = 0.37 \ \mu\text{m s}^{-1}$, a scale parameter $\sigma = 0.13 \ \mu\text{m s}^{-1}$, and a shape parameter k = 0.17. The angle between two successive runs is random.

^[1] S. Singh, S. K. Singh, I. Chowdhury, and R. Singh, Open Microbiol. J. 11, 53 (2017).

^[2] H. H. Tuson and D. B. Weibel, Soft Matter 9, 4368 (2013).

^[3] D. Davies, Nat. Rev. Drug Discov. 2, 114 (2003),

^[4] J. W. Costerton, Science **284**, 1318 (1999).

^[5] A. Omar, J. Wright, G. Schultz, R. Burrell, and P. Nadworny, Microorganisms 5, 9 (2017).

^[6] M. G. Mazza, J. Phys. D 49, 203001 (2016).

^[7] J. Taktikos, Y. T. Lin, H. Stark, N. Biais, and V. Zaburdaev, PLoS One 10, e0137661 (2015).

^[8] H. Vlamakis, Y. Chai, P. Beauregard, R. Losick, and R. Kolter, Nat. Rev. Microbiol. 11, 157 (2013).

^[9] K. C. Marshall, R. Stout, and R. Mitchell, Microbiology 68, 337 (1971).

- [10] T. Jittawuttipoka, M. Planchon, O. Spalla, K. Benzerara, F. Guyot, C. Cassier-Chauvat, and F. Chauvat, PLoS One 8, e55564 (2013).
- [11] T. Ursell, R. M. W. Chau, S. Wisen, D. Bhaya, and K. C. Huang, PLoS Comput. Biol. 9, e1003205 (2013).
- [12] K. Zhao, B. S. Tseng, B. Beckerman, F. Jin, M. L. Gibiansky, J. J. Harrison, E. Luijten, M. R. Parsek, and G. C. L. Wong, Nature (London) 497, 388 (2013).
- [13] A. Gelimson, K. Zhao, C. K. Lee, W. T. Kranz, G. C. L. Wong, and R. Golestanian, Phys. Rev. Lett. 117, 178102 (2016).
- [14] W. Hu, M. L. Gibiansky, J. Wang, C. Wang, R. Lux, Y. Li, G. C. L. Wong, and W. Shi, Sci. Rep. 6, 17790 (2016).
- [15] J. M. Panoff, B. Priem, H. Morvan, and F. Joset, Arch. Microbiol. 150, 558 (1988).
- [16] D. Bhaya, N. R. Bianco, D. Bryant, and A. Grossman, Mol. Microbiol. 37, 941 (2000).
- [17] W.-O. Ng, A. R. Grossman, and D. Bhaya, J. Bacteriol. 185, 1599 (2003).
- [18] R. M. W. Chau, T. Ursell, S. Wang, K. C. Huang, and D. Bhaya, Biophys. J. 108, 1623 (2015).
- [19] A. Wilde and C. W. Mullineaux, Mol. Microbiol. 98, 998 (2015).
- [20] H. C. Berg, N. Darnton, and J. Jaffe, http://www.rowland. harvard.edu/labs/bacteria/software/index.php.

- [21] D. Glaser and M. Higgins, J. Bacteriol. 171, 669 (1989).
- [22] H. C. Berg and D. A. Brown, Nature (London) 239, 500 (1972).
- [23] O. Bénichou, C. Loverdo, M. Moreau, and R. Voituriez, Rev. Mod. Phys. 83, 81 (2011).
- [24] A. Touhami, M. H. Jericho, J. M. Boyd, and T. J. Beveridge, J. Bacteriol. 188, 370 (2006).
- [25] E. Montroll and G. Weiss, J. Math. Phys. 6, 167 (1965).
- [26] J. P. Bouchaud and A. Georges, Phys. Rep. 195, 127 (1990).
- [27] A. Ducret, M.-P. Valignat, F. Mouhamar, T. Mignot, and O. Theodoly, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 10036 (2012).
- [28] R. Yu and D. Kaiser, Mol. Microbiol. 63, 454 (2007).
- [29] H. Larralde, P. Trunfio, H. E. Stanley, and G.H. Weiss, Nature (London) 355, 423 (1992).
- [30] F. Rossi and R. De Philippis, Life 5, 1218 (2015).
- [31] N. Steinberg and I. Kolodkin-Gal, J. Bacteriol. 197, 2092 (2015).
- [32] Y. Li, H. Sun, X. Ma, A. Lu, R. Lux, D. Zusman, and W. Shi, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 5443 (2003).
- [33] B. Maier and G. C. L. Wong, Trends Microbiol. 23, 775 (2015).
- [34] V. Zaburdaev, N. Biais, M. Schmiedeberg, J. Eriksson, A. B. Jonsson, M. P. Sheetz, and D. A. Weitz, Biophys. J. 107, 1523 (2014).
- [35] P.-G. de Gennes, Eur. Biophys. J. 33, 691 (2004).
- [36] J. E. Segall, S. M. Block, and H. C. Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8987 (1986).

Liste des tableaux

| 2.1 | Concentration des différents minéraux nécessaires à la préparation du mi- lieu de culture BG11 |
|-----|---|
| 2.2 | Récapitulatif des diverses surfaces de PDMS utilisées |
| 3.1 | Comparaison des concentrations en exopolysaccharides des souches étudiées. 69 |
| 4.1 | Proportion de bactéries parties lors du rinçage |
| 4.2 | Récapitulatif des résultats expérimentaux de la partie 4.2 |
| 4.3 | Paramètres utilisés pour la modélisation de la croissance bactérienne 100 |
| 4.4 | Paramètres $\tau_{mot,S}$ et p_i |
| 4.5 | Valeurs choisies pour les paramètres de simulation |

Liste des figures

| 1.1 | Evolution de la pression partielle de dioxygène dans l'atmosphère depuis la naissance de la Terre | 17 |
|------|--|----|
| 1.2 | Représentation schématique du processus d'endosymbiose | 18 |
| 1.3 | Exemple des différentes morphologies de cyanobactéries | 19 |
| 1.4 | Schéma de principe de l'obtention de produits d'intérêt à partir de la culture de cyanobactéries | 20 |
| 1.5 | Exemple d'images obtenues par microscopie électronique à balayage de la souche sauvage de Synechocystis | 21 |
| 1.6 | Présentation de différents types de motilité | 22 |
| 1.7 | Microscopie électronique en transmission d'une <i>Synechocystis</i> | 24 |
| 1.8 | Schéma d'un assemblage d'un pilus de type IV et de sa rétractation | 25 |
| 1.9 | Images successives en fluorescence de deux <i>Synechocystis</i> | 26 |
| 1.10 | Réponse en force d'un pilus à une élongation imposée | 27 |
| 1.11 | Exemple de trajectoires Browniennes | 28 |
| 1.12 | Densité de probabilité de déplacement de traceurs inertes dans une suspension de bactéries <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> | 32 |
| 1.13 | Densité de probabilité de déplacement de colloïdes et de grains | 32 |
| 1.14 | Trajectoire typique d'une bactérie Neisseria gonorrhoeae | 35 |
| 1.15 | Probabilité d'être en période de "run" pour des <i>Escherichia coli</i> soumises à un échelon de concentration de nutriments | 37 |
| 1.16 | Instabilité de digitation observée après 49h d'éclairage unidimensionnel de Synechocystis | 39 |
| 1.17 | Densité de probabilité des vitesses de différentes souches de $Myxococcus$ $xanthus$ | 39 |
| 1.18 | Distribution de probabilité du nombre de visites par unité de surface, pour des bactéries <i>Pseudomonas aerigunosa</i> | 40 |

| 1.19 | Exemples de développement problématique de biofilm | 42 |
|------|--|---------|
| 1.20 | Schéma de principe des différentes étapes de la formation d'un biofilm sur une surface | 43 |
| 1.21 | Lien entre production d'EPS et adhésion pour différentes souches de la bactérie <i>Myxococcus xanthus</i> | 44 |
| 2.1 | Dispositif expérimental permettant l'enregistrement de la dynamique dif- fusive des cyanobactéries | 48 |
| 2.2 | Schéma des différentes étapes de la construction d'une cellule de mesure | 50 |
| 2.3 | Image du canal microfluidique utilisé expérimentalement | 50 |
| 2.4 | Schéma du dispositif expérimental pour l'expérience en microfluidique | 51 |
| 2.5 | Schéma du dispositif expérimental pour l'étude de croissance de biofilm | 52 |
| 2.6 | Photographie de la boîte de Pétri utilisée pour les expériences de colonisation. | 53 |
| 2.7 | Photographie du dispositif permettant l'étude de la phototaxie | 54 |
| 2.8 | Différentes étapes de la procédure de traitement d'images | 55 |
| 3.1 | Évolution temporelle du nombre de cyanobactéries détectées sur la surface divisé par le nombre final de cellules | 58 |
| 3.2 | Évolution temporelle du coefficient de diffusion | 59 |
| 3.3 | Évolution du coefficient de diffusion en fonction de la distance inter-particulaire moyenne | e 61 |
| 3.4 | Exemple d'une trajectoire expérimentale | 61 |
| 3.5 | Distributions des probabilités de déplacement expérimentales | 62 |
| 3.6 | Vitesses instantanées et moyennées pour la distinction des périodes de "run". | 63 |
| 3.7 | Distributions expérimentales des temps caractéristiques et modèle analytique. | 65 |
| 3.8 | Comportement schématisé des particules simulées | 65 |
| 3.9 | Comparaison des MSD expérimentaux, simulés et analytiques | 66 |
| 3.10 | Description schématique du protocole utilisé pour l'expérience réalisée dans le canal microfluidique | 67 |
| 3.11 | Évolution du coefficient de diffusion au cours du temps dans le canal mi- crofluidique | 68 |
| 3.12 | Histogramme des productions de RPS et de CPS des différentes souches utilisées dans cette étude | 69 |
| 3.13 | Évolutions comparées de la dynamique pour différentes souches bactériennes. | 70 |

| 3.14 | Evolutions temporelles des temps caractéristiques pour différentes souches bactériennes | 70 |
|------|--|----|
| 3.15 | Distributions des probabilités de déplacement pour les différentes souches de Synechocystis. | 71 |
| 3.16 | Equivalence entre le modèle CTRW et les temps caractéristiques de l'intermittence | 73 |
| 3.17 | Distributions de probabilités des paramètres utilisés dans le modèle CTRW. | 74 |
| 3.18 | Nombre de sauts moyen en fonction du temps | 74 |
| 3.19 | Proportion de surface recouverte en fonction du temps | 76 |
| 3.20 | Évolution τ et τ_{run}^2 en fonction de la proportion de surface recouverte | 78 |
| 3.21 | Schématisation de la marche aléatoire considérée pour la description du nombre de sites disctincts visités | 79 |
| 4.1 | Schéma de la fabrication d'une cellule de mesure comportant une surface de PDMS | 84 |
| 4.2 | Exemple de trajectoires représentatives observées sur différentes surfaces | 85 |
| 4.3 | Évolution temporelle des temps caractéristiques sur différentes surfaces | 86 |
| 4.4 | Évolution temporelle de la vitesse moyenne de "run" sur différentes surfaces. | 86 |
| 4.5 | Distribution des probabilités de distance parcourue pour différentes surfaces. | 87 |
| 4.6 | Sites visités au cours de périodes de 250 secondes | 88 |
| 4.7 | Évolution temporelle de la proportion de bactéries motiles pour différentes surfaces. | 89 |
| 4.8 | Distribution des probabilité de déplacement pour différentes surfaces en cellule ouverte. | 90 |
| 4.9 | Corrélation des déplacements sur différentes surfaces | 91 |
| 4.10 | Exemple de captures d'écran réalisées sur la surface de PDMS 1:25 à différents jours de colonisation | 93 |
| 4.11 | Exemple d'images post-traitées obtenues sur la surface de PDMS 1:25 à différents jours de colonisation | 93 |
| 4.12 | Évolution temporelle de la proportion de bactéries motiles obtenue en cellule ouverte | 94 |
| 4.13 | Nombre de bactéries détectées sur les différentes surfaces en fonction du temps | 95 |
| 4.14 | Images représentatives des différentes surfaces après 8 jours de croissance de biofilm | 96 |

| 4.15 | Evolution temporelle du nombre de micro-colonies pour différentes surfaces. 97 |
|------|--|
| 4.16 | Images représentatives des différentes surfaces après les avoir rincées 98 |
| 4.17 | Images repérant les positions des particules après simulation numérique 104 |
| 4.18 | Nombre de micro-colonies détectées expérimentalement, pour différentes surfaces |
| 5.1 | Schéma des dispositifs expérimentaux utilisés dans le chapitre 5 108 |
| 5.2 | Schéma représentatif des variations d'intensité lumineuse subies par les bactéries |
| 5.3 | Évolution temporelle des coefficients de diffusion normalisés par leur valeur finale |
| 5.4 | Distribution des probabilités de déplacement sous différentes conditions d'éclairage |
| 5.5 | Évolution temporelle du temps de "run" moyen pour un échelon lumineux. 112 |
| 5.6 | Évolution temporelle des temps caractéristiques au cours d'un échelon d'intensité lumineuse |
| 5.7 | Vitesse moyenne pendant les périodes de "runs" en fonction du temps 113 |
| 5.8 | Évolution temporelle de l'inverse des temps caractéristiques pendant un échelon d'intensité lumineuse |
| 5.9 | Variance des temps de "runs" en fonction du second moment de leur distribution |
| 5.10 | Évolution temporelle du coefficient de diffusion pour des échelons d'intensité lumineuse différente |
| 5.11 | Distribution des tailles des particules détectées pour les trois premières phases de l'expérience |
| 5.12 | Corrélation entre les déplacements et la position du plus proche voisin pendant un échelon lumineux |
| 5.13 | Fonction réponse pour les périodes de "runs" |
| 5.14 | Photographie du cône de lumière généré par la LED utilisée |
| 5.15 | Sites visités au cours de périodes de 250 secondes, avec ou sans éclairage directionnel |
| 5.16 | Vitesse moyenne suivant en fonction du temps suivant les directions longitudinales et transverses du flux lumineux |
| 5.17 | Distributions des probabilités de déplacement pour différentes conditions d'éclairage |

| 5.18 | Exemple de trajectoires enregistrées avec un éclairage directionnel 128 |
|------|---|
| 5.19 | Répartition temporelle des différentes populations de bactéries motiles 129 |
| 5.20 | Évolution temporelle des différents coefficients de diffusion effectifs 130 $$ |
| 5.21 | Évolution temporelle de la longueur moyenne d'un "run" dans les directions longitudinales et transverses du flux lumineux |
| 5.22 | Évolutions temporelles des temps caractéristiques sous des conditions d'éclairage variables |
| 5.23 | Schéma de principe de la perception de la direction du flux lumineux par une Synechocystis |

Bibliographie

- [Bakker et al., 2003] Bakker, D. P., Huijs, F. M., de Vries, J., Klijnstra, J. W., Busscher, H. J., and van der Mei, H. C. (2003). Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber. *Colloids and Surfaces B*: Biointerfaces, 32(3):179 190.
- [Bell, 1978] Bell, G. (1978). Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science*, 200(4342):618–627.
- [Bénichou et al., 2011] Bénichou, O., Loverdo, C., Moreau, M., and Voituriez, R. (2011). Intermittent search strategies. *Reviews of Modern Physics*, 83(1):81–129.
- [Berens, 2009] Berens, P. (2009). CircStat: A <i>MATLAB</i> Toolbox for Circular Statistics. *Journal of Statistical Software*, 31(10).
- [Berg and Brown, 1972] Berg, H. C. and Brown, D. a. (1972). Chemotaxis in Escherichia coli analysed by three-dimensional tracking. *Nature*, 239(5374):500–504.
- [Berg et al., 2004] Berg, H. C., Darnton, N., and Jaffe, J. (2004). Object tracking software.
- [Bhattacharya et al., 2007] Bhattacharya, D., Archibald, J. M., Weber, A. P., and Reyes-Prieto, A. (2007). How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. *BioEssays*, 29(12):1239–1246.
- [Bhaya et al., 2000] Bhaya, D., Bianco, N. R., Bryant, D., and Grossman, A. (2000). Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803. *Molecular Microbiology*, 37(4):941–951.
- [Björnham and Axner, 2010] Björnham, O. and Axner, O. (2010). Catch-bond behavior of bacteria binding by slip bonds. *Biophysical Journal*, 99(5):1331–1341.
- [Bonazzi et al., 2018] Bonazzi, D., Lo Schiavo, V., Machata, S., Djafer-Cherif, I., Nivoit, P., Manriquez, V., Tanimoto, H., Husson, J., Henry, N., Chaté, H., Voituriez, R., and Duménil, G. (2018). Intermittent pili-mediated forces fluidize neisseria meningitidis aggregates promoting vascular colonization. *Cell*.
- [Bouchaud and Georges, 1990] Bouchaud, J. P. and Georges, A. (1990). Anomalous diffusion in disordered media: Statistical mechanisms, models and physical applications, volume 195.

[Brocks et al., 1999] Brocks, J. J., Logan, G. A., Buick, R., and Summons, R. E. (1999). Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science*, 285(5430):1033–1036.

- [Burchmore et al., 2003] Burchmore, J. S., Rodriguez-contreras, D., Barrett, M. P., Modi, G., Sacks, D., Burchmore, R. J. S., Rodriguez-contreras, D., Mcbride, K., Merkel, P., Barrett, M. P., Modi, G., Sacks, D., Landfear, S. M., Maier, B., Potter, L., So, M., Long, C. D., Seifert, H. S., Sheetz, M. P., Maier, B., Potter, L., So, M., Seifert, H. S., and Sheetz, M. P. (2003). Single pilus motor forces exceed 100 pN. 100(7).
- [Burns, 2012] Burns, A. (2012). Photobioreactor Design for Improved Energy Efficiency of Microalgae Production. *Bioresource Technology*, 11(1):1–180.
- [Cairns et al., 2013] Cairns, L. S., Marlow, V. L., Bissett, E., Ostrowski, A., and Stanley-Wall, N. R. (2013). A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in bacillus subtilis. *Molecular Microbiology*, 90(1):6–21.
- [Callow and Callow, 2011] Callow, J. A. and Callow, M. E. (2011). Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. *Nature Communications*, 2(1):210–244.
- [Carbonnelle et al., 2006] Carbonnelle, E., Helaine, S., Nassif, X., and Pelicic, V. (2006). A systematic genetic analysis in Neisseria meningitidis defines the Pil proteins required for assembly, functionality, stabilization and export of type IV pili. *Molecular Microbiology*, 61(6):1510–1522.
- [Cassier-Chauvat and Chauvat, 2015] Cassier-Chauvat, C. and Chauvat, F. (2015). Responses to oxidative and heavy metal stresses in cyanobacteria: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1):871–886.
- [Celani and Vergassola, 2010] Celani, A. and Vergassola, M. (2010). Bacterial strategies for chemotaxis response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4):1391–1396.
- [Chau et al., 2017] Chau, R. M. W., Bhaya, D., and Huanga, K. C. (2017). Emergent phototactic responses of cyanobacteria under complex light regimes. *mBio*, 8(2):1–15.
- [Chau et al., 2015] Chau, R. M. W., Ursell, T., Wang, S., Huang, K. C., and Bhaya, D. (2015). Maintenance of motility bias during cyanobacterial phototaxis. *Biophysical Journal*, 108(7):1623–1632.
- [Chaudhuri et al., 2007] Chaudhuri, P., Berthier, L., and Kob, W. (2007). Universal nature of particle displacements close to glass and jamming transitions. *Physical Review Letters*, 99(6):2–5.
- [Choi et al., 1999] Choi, J.-s., Chungl, Y.-h., Moon, Y.-j., Kimtl, C., Watanabe, M., Song, P.-s., Joe, C., Bogorad, L., and Park, Y. M. (1999). Photomovement of the Gliding Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Photochemistry and Photobiology*, 70(1):95–102.

[Chu et al., 2005] Chu, Y. S., Dufour, S., Thiery, J. P., Perez, E., and Pincet, F. (2005). Johnson-Kendall-Roberts theory applied to living cells. *Physical Review Letters*, 94(2):1–4.

- [Clark and Grant, 2005] Clark, D. a. and Grant, L. C. (2005). The bacterial chemotactic response reflects a compromise between transient and steady-state behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26):9150–9155.
- [Copeland and Weibel, 2009] Copeland, M. F. and Weibel, D. B. (2009). Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft Matter*, 5(6):1174.
- [Dansuk and Keten, 2018] Dansuk, K. C. and Keten, S. (2018). Tunable seat belt behavior in nanocomposite interfaces inspired from bacterial adhesion pili. *Soft Matter*, 14(9).
- [De Gennes, 2004] De Gennes, P.-G. (2004). Chemotaxis: the role of internal delays. European Biophysics Journal, 33(8):691–693.
- [Dervaux et al., 2015] Dervaux, J., Mejean, A., and Brunet, P. (2015). Irreversible collective migration of cyanobacteria in eutrophic conditions. *PLoS ONE*, 10(3):1–16.
- [Di et al., 2014] Di, N.-g., Guan, J., Wang, B., and Granick, S. (2014). Even Hard-Sphere Colloidal. (4):3331–3336.
- [Dieterich et al., 2008] Dieterich, P., Klages, R., Preuss, R., and Schwab, A. (2008). Anomalous dynamics of cell migration. *Pnas*, 105(2):459–463.
- [Dismukes et al., 2008] Dismukes, G. C., Carrieri, D., Bennette, N., Ananyev, G. M., and Posewitz, M. C. (2008). Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3):235–240.
- [Dombrowski et al., 2004] Dombrowski, C., Cisneros, L., Chatkaew, S., Goldstein, R. E., and Kessler, J. O. (2004). Self-concentration and large-scale coherence in bacterial dynamics. *Phys. Rev. Lett.*, 93:098103.
- [Ducat et al., 2011] Ducat, D. C., Way, J. C., and Silver, P. A. (2011). Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends in Biotechnology*, 29(2):95–103.
- [Dufrêne, 2015] Dufrêne, Y. F. (2015). Sticky microbes: Forces in microbial cell adhesion. Trends in Microbiology, 23(6):376–382.
- [Edwards et al., 2007] Edwards, A. M., Phillips, R. A., Watkins, N. W., Freeman, M. P., Murphy, E. J., Afanasyev, V., Buldyrev, S. V., Da Luz, M. G., Raposo, E. P., Stanley, H. E., and Viswanathan, G. M. (2007). Revisiting Lévy flight search patterns of wandering albatrosses, bumblebees and deer. *Nature*, 449(7165):1044–1048.
- [Eiha et al., 2002] Eiha, N., Komoto, A., Maenosono, S., Yuichiro Wakano, J., Yamamoto, K., and Yamaguchi, Y. (2002). The mode transition of the bacterial colony. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 313(3-4):609–624.
- [Einstein, 1905] Einstein, A. (1905). On the Motion of Small Particles Suspended in a Stationary Liquid, as Required by the Molecular Kinetic Theory of Heat. *Annalen der Physik*, 322:549–560.

[Ellison and Brun, 2015] Ellison, C. and Brun, Y. V. (2015). Mechanosensing: A Regulation Sensation. *Current Biology*, 25(3).

- [Fanning and Mitchell, 2012] Fanning, S. and Mitchell, A. P. (2012). Fungal biofilms. *PLoS pathogens*, 8(4):1–4.
- [Gachelin et al., 2014] Gachelin, J., Rousselet, A., Lindner, A., and Clement, E. (2014). Collective motion in an active suspension of Escherichia coli bacteria. *New Journal of Physics*, 16.
- [Garcia et al., 2010] Garcia, M., Berti, S., Peyla, P., and Rafaï, S. (2010). The random walk of a low-Reynolds-number swimmer. *Time*, pages 1–4.
- [Ginelli et al., 2015] Ginelli, F., Peruani, F., Pillot, M.-H., Chaté, H., Theraulaz, G., and Bon, R. (2015). Intermittent collective dynamics emerge from conflicting imperatives in sheep herds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(41):12729–12734.
- [Glaser and Higgins, 1989] Glaser, D. and Higgins, M. (1989). Buoyant density, growth rate, and the cell cycle in Streptococcus faecium. *Journal of Bacteriology*, 171(2):669–673.
- [Guégan et al., 2014] Guégan, C., Garderes, J., Le Pennec, G., Gaillard, F., Fay, F., Linossier, I., Herry, J. M., Fontaine, M. N., and Réhel, K. V. (2014). Alteration of bacterial adhesion induced by the substrate stiffness. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114:193–200.
- [Harapanahalli et al., 2015] Harapanahalli, A. K., Younes, J. A., Allan, E., van der Mei, H. C., and Busscher, H. J. (2015). Chemical Signals and Mechanosensing in Bacterial Responses to Their Environment. *PLoS Pathogens*, 11(8):1–6.
- [Haus and Kehr, 1987] Haus, J. W. and Kehr, K. W. (1987). Diffusion in regular and disordered lattices. *Physics Reports*, 150(5-6):263–406.
- [Hu et al., 2016] Hu, W., Gibiansky, M. L., Wang, J., Wang, C., Lux, R., Li, Y., Wong, G. C. L., and Shi, W. (2016). Interplay between type IV pili activity and exopoly-saccharides secretion controls motility patterns in single cells of Myxococcus xanthus. Scientific Reports, 6(1):17790.
- [Jittawuttipoka et al., 2013] Jittawuttipoka, T., Planchon, M., Spalla, O., Benzerara, K., Guyot, F., Cassier-Chauvat, C., and Chauvat, F. (2013). Multidisciplinary Evidences that Synechocystis PCC6803 Exopolysaccharides Operate in Cell Sedimentation and Protection against Salt and Metal Stresses. *PLoS ONE*, 8(2).
- [Johnson et al., 1971] Johnson, K. L., Kendall, K., and Roberts, A. D. (1971). Surface Energy and the Contact of Elastic Solids. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 324(1558):301–313.
- [Kaneko et al., 1996] Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C. S., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M., and Tabata, S.

(1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium synechocystis sp. strain pcc6803. ii. sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 3 3:109–36.

- [Kasting, 2011] Kasting, J. F. (2011). Life and the Evolution of Earth 's Atmosphere. 1066(2002).
- [Klafter et al., 1996] Klafter, J., Shlesinger, M. F., and Zumofen, G. (1996). Beyond brownian motion. *Physics Today*, 49(2):33–39.
- [Klafter and Sokolov, 2011] Klafter, J. and Sokolov, I. (2011). Firts steps in random walks. Oxford University Press.
- [Kolewe et al., 2015] Kolewe, K., Peyton, S., and Schiffman, J. (2015). Fewer Bacteria Adhere to Softer Hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces*, 35(7).
- [Kurtuldu et al., 2011] Kurtuldu, H., Guasto, J. S., Johnson, K. A., and Gollub, J. P. (2011). Enhancement of biomixing by swimming algal cells in two-dimensional films. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(26):10391–10395.
- [Larralde et al., 1992] Larralde, H., Trunfio, P., Havlin, S., Stanley, H. E., and Weiss, G. H. (1992). Territory covered by N diffusing particles. *Nature*, 355(6359):423–426.
- [Lau et al., 2015] Lau, N. S., Matsui, M., and Abdullah, A. A. A. (2015). Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products. *BioMed Research International*, 2015.
- [Leadbeater and Callow, 1992] Leadbeater, B. S. C. and Callow, M. E. (1992). Formation, Composition and Physiology of Algal Biofilms, pages 149–162. Springer Netherlands, Dordrecht.
- [Leptos et al., 2009] Leptos, K. C., Guasto, J. S., Gollub, J. P., Pesci, A. I., and Goldstein, R. E. (2009). Dynamics of Enhanced Tracer Diffusion in Suspensions of Swimming Eukaryotic Microorganisms. *Physical Review Letters*, 103(19):1–4.
- [Lichter et al., 2008] Lichter, J. A., Thompson, M. T., Delgadillo, M., Nishikawa, T., Rubner, M. F., and Van Vliet, K. J. (2008). Substrata mechanical stiffness can regulate adhesion of viable bacteria. *Biomacromolecules*, 9(6):1571–1578.
- [Limoli et al., 2015] Limoli, D. H., Jones, C. J., Wozniak, D. J., and Cruz, S. (2015). Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function. *Microbiol Spectr.*, 3(3):1–30.
- [Lo et al., 2000] Lo, C. M., Wang, H. B., M. Dembo, M., and Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate, vol. 79, no. 1, pp. 144–152, 2000. *Biophysical Journal*, 79(1):144–152.
- [López et al., 2015] López, H. M., Gachelin, J., Douarche, C., Auradou, H., and Clément, E. (2015). Turning Bacteria Suspensions into Superfluids. *Physical Review Letters*, 115(2):1–5.

[Lu et al., 2015] Lu, S., Giuliani, M., Harvey, H., Burrows, L. L., Wickham, R. A., and Dutcher, J. R. (2015). Nanoscale Pulling of Type IV Pili Reveals Their Flexibility and Adhesion to Surfaces over Extended Lengths of the Pili. *Biophysical Journal*, 108(12):2865–2875.

- [Lyons et al., 2014] Lyons, T. W., Reinhard, C. T., and Planavsky, N. J. (2014). The rise of oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature*, 506(7488):307–315.
- [Ma et al., 2006] Ma, L., Jackson, K. D., Landry, R. M., Parsek, M. R., and Wozniak, D. J. (2006). Analysis of Pseudomonas aeruginosa conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. *Journal of Bacteriology*, 188(23):8213–8221.
- [Maier and Wong, 2015] Maier, B. and Wong, G. C. L. (2015). How Bacteria Use Type IV Pili Machinery on Surfaces. *Trends in Microbiology*, 23(12):775–788.
- [Mardia, 1975] Mardia, K. (1975). Statistics of Directional Data, volume 37.
- [Marshall et al., 1971] Marshall, K. C., Stout, R., and Mitchell, R. (1971). Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Journal of General Microbiology*, 68(3):337–348.
- [Mattick, 2002] Mattick, J. S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annual review of microbiology*, 56(June) :289–314.
- [Mazza, 2016] Mazza, M. G. (2016). The physics of biofilms—an introduction. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 49(20) :203001.
- [Merz et al., 2000] Merz, A. J., So, M., and Sheetz, M. P. (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 407(6800):98–102.
- [Metzler and Klafter, 2000] Metzler, R. and Klafter, J. (2000). The random walk's guide to anomalous diffusion: A fractional dynamics approach. *Physics Report*, 339(1):1–77.
- [Missirlis and Spatz, 2014] Missirlis, D. and Spatz, J. P. (2014). Combined effects of peg hydrogel elasticity and cell-adhesive coating on fibroblast adhesion and persistent migration. *Biomacromolecules*, 15(1):195–205. PMID: 24274760.
- [Montroll and Weiss, 1965] Montroll, E. W. and Weiss, G. H. (1965). Random walks on lattices. II. *Journal of Mathematical Physics*, 6(1965):167.
- [Mullineaux, 2001] Mullineaux, C. W. (2001). How do cyanobacteria sense and respond to light? *Molecular Microbiology*, 41(5):965–971.
- [Murrell et al., 2011] Murrell, M., Kamm, R., and Matsudaira, P. (2011). Substrate viscosity enhances correlation in epithelial sheet movement. *Biophysical Journal*, 101(2):297–306.
- [Nakane and Nishizaka, 2017] Nakane, D. and Nishizaka, T. (2017). Asymmetric distribution of type IV pili triggered by directional light in unicellular cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(25):6593–6598.
- [Nase et al., 2013] Nase, J., Ramos, O., Creton, C., and Lindner, A. (2013). Debonding energy of PDMS: A new analysis of a classic adhesion scenario. *European Physical Journal E*, 36(9).

[Novikova et al., 2017] Novikova, E. A., Raab, M., Discher, D. E., and Storm, C. (2017). Persistence-Driven Durotaxis: Generic, Directed Motility in Rigidity Gradients. *Physical Review Letters*, 118(7):1–5.

- [Nutman et al., 2016] Nutman, A. P., Bennett, V. C., Friend, C. R., Van Kranendonk, M. J., and Chivas, A. R. (2016). Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature*, 537(7621):535–538.
- [Panoff and Joset, 1989] Panoff, J. M. and Joset, F. (1989). Selection by Anion-Exchange Chromatography of Exopolysaccharide Mutants of the Cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(6):1452–1456.
- [Partensky et al., 1999] Partensky, F., Blanchot, J., and Vaulot, D. (1999). Differential distribution and ecology of Prochlorococcus and Synechococcus in oceanic waters: a review. *Bulletin de l'Institut océanographique*, 19(19):457–475.
- [Perrin, 1913] Perrin, J. (1913). Les Atomes. Nouveau monde editions edition.
- [Pierres et al., 2001] Pierres, A., Benoliel, A. M., Zhu, C., and Bongrand, P. (2001). Diffusion of microspheres in shear flow near a wall: Use to measure binding rates between attached molecules. *Biophysical Journal*, 81(1):25–42.
- [Pozos Vazquez et al., 2009] Pozos Vazquez, C., Boudou, T., Nicolas, C., Picart, C., Glinel, K., and Dulong, V. (2009). Article Variation of Polyelectrolyte Film Stiffness by Photo-Cross-Linking: A New Way To Control Cell Adhesion Variation of Polyelectrolyte Film Stiffness by Photo-Cross-Linking: A New Way To Control Cell Adhesion. Film, (22):3556–3563.
- [Proft and Baker, 2009] Proft, T. and Baker, E. N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria Structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(4):613–635.
- [Raab et al., 2012] Raab, M., Swift, J., Dingal, P. C. P., Shah, P., Shin, J. W., and Discher, D. E. (2012). Crawling from soft to stiff matrix polarizes the cytoskeleton and phosphoregulates myosin-II heavy chain. *Journal of Cell Biology*, 199(4):669–683.
- [Rafaï et al., 2010] Rafaï, S., Jibuti, L., and Peyla, P. (2010). Effective viscosity of microswimmer suspensions. *Physical Review Letters*, 104(9):1–4.
- [Raven and Allen, 2003] Raven, J. A. and Allen, J. F. (2003). Genomics and chloroplast evolution: What did cyanobacteria do for plants? *Genome Biology*, 4(3):1–5.
- [Saha et al., 2013] Saha, N., Monge, C., Dulong, V., Picart, C., and Glinel, K. (2013). Influence of polyelectrolyte film stiffness on bacterial growth. *Biomacromolecules*, 14(2):520–528.
- [Sarma, 2013] Sarma, T. A. (2013). Handbook of Handbook of of Handbook Cyanobacteria Cyanobacteria.
- [Schuergers et al., 2016] Schuergers, N., Lenn, T., Kampmann, R., Meissner, M. V., Esteves, T., Temerinac-Ott, M., Korvink, J. G., Lowe, A. R., Mullineaux, C. W., and Wilde, A. (2016). Cyanobacteria use micro-optics to sense light direction. *eLife*, 5(FE-BRUARY2016):1–16.

[Schuergers et al., 2017] Schuergers, N., Mullineaux, C. W., and Wilde, A. (2017). Cyanobacteria in motion. *Current Opinion in Plant Biology*, 37:109–115.

- [Schuergers et al., 2015] Schuergers, N., Nürnberg, D. J., Wallner, T., Mullineaux, C. W., and Wilde, A. (2015). PilB localization correlates with the direction of twitching motility in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Microbiology (Reading, England)*, 161(2015):960–966.
- [Schwarz and Safran, 2013] Schwarz, U. S. and Safran, S. A. (2013). Physics of adherent cells. Reviews of Modern Physics, 85(3):1327–1381.
- [Segall et al., 1986] Segall, J. E., Block, S. M., and Berg, H. C. (1986). Temporal comparisons in bacterial chemotaxis. *PNAS*, 83(December):8987–8991.
- [Simões et al., 2010] Simões, M., Simões, L. C., and Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT Food Science and Technology*, 43(4):573–583.
- [Solano et al., 2014] Solano, C., Echeverz, M., and Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1):96–104.
- [Song et al., 2017] Song, F., Brasch, M. E., Wang, H., Henderson, J. H., Sauer, K., and Ren, D. (2017). How Bacteria Respond to Material Stiffness during Attachment: A Role of Escherichia coli Flagellar Motility. ACS Applied Materials and Interfaces, 9(27):22176–22184.
- [Song et al., 2015] 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.
- [Song and Ren, 2014] Song, F. and Ren, D. (2014). Stiffness of cross-linked poly(dimethylsiloxane) affects bacterial adhesion and antibiotic susceptibility of attached cells. *Langmuir*, 30(34):10354–10362.
- [Song et al., 2018] Song, F., Wang, H., Sauer, K., and Ren, D. (2018). Cyclic-di-GMP and oprF are involved in the response of Pseudomonas aeruginosa to substrate material stiffness during attachment on polydimethylsiloxane (PDMS). Frontiers in Microbiology, 9(FEB):1–13.
- [Stanier et al., 1971] Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (Order Chroococcales). *Bacteriological reviews*, 35(2):171–205.
- [Straub et al., 2011] Straub, C., Quillardet, P., Vergalli, J., de Marsac, N. T., and Humbert, J. F. (2011). A day in the life of Microcystis aeruginosa strain PCC 7806 as revealed by a transcriptomic analysis. *PLoS ONE*, 6(1).
- [Taktikos et al., 2015] Taktikos, J., Lin, Y. T., Stark, H., Biais, N., and Zaburdaev, V. (2015). Pili-induced clustering of N. Gonorrhoeae Bacteria. *PLoS ONE*, 10(9):1–16.
- [Thurlow et al., 2011] Thurlow, L. R., Hanke, M. L., Fritz, T., Angle, A., Aldrich, A., Williams, S. H., Engebretsen, I. L., Bayles, K. W., Horswill, A. R., and Kielian, T.

(2011). Staphylococcus aureus Biofilms Prevent Macrophage Phagocytosis and Attenuate Inflammation In Vivo. *The Journal of Immunology*, 186(11):6585–6596.

- [Tjørve and Tjørve, 2017] Tjørve, K. M. and Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLoS ONE*, 12(6):1–17.
- [Touhami et al., 2006] Touhami, A., Jericho, M. H., Boyd, J. M., and Beveridge, T. J. (2006). Nanoscale Characterization and Determination of Adhesion Forces of Pseudomonas aeruginosa Pili by Using Atomic Force Microscopy Nanoscale Characterization and Determination of Adhesion Forces of Pseudomonas aeruginosa Pili by Using Atomic Force Microscopy. *Journal of . . .*, 188(2):370–377.
- [Ursell et al., 2013] Ursell, T., Chau, R. M. W., Wisen, S., Bhaya, D., and Huang, K. C. (2013). Motility Enhancement through Surface Modification Is Sufficient for Cyanobacterial Community Organization during Phototaxis. *PLoS Computational Biology*, 9(9).
- [Van Dellen et al., 2008] Van Dellen, K. L., Houot, L., and Watnick, P. I. (2008). Genetic analysis of Vibrio cholerae monolayer formation reveals a key role for $\Delta\Psi$ in the transition to permanent attachment. *Journal of Bacteriology*, 190(24):8185–8196.
- [Verhulst, 1938] Verhulst, P. F. (1938). Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. Correspondance Mathématique et Physique, 10(6):113–121.
- [Viswanathan et al., 1996] Viswanathan, G. M., Afanasyev, V., Buldyrev, S. V., Murphy, E. J., Prince, P. A., and Stanley, H. E. (1996). Lévy flight search patterns of wandering albatrosses.
- [von Smoluchowski, 1906] von Smoluchowski, M. (1906). Zur kinetischen theorie der brownschen molekularbewegung und der suspensionen. *Annalen der Physik*, 326(14):756–780.
- [Vourc'h et al., 2018] Vourc'h, T., Méjean, A., Léopold'es, J., Chauvat, F., Cassier-Chauvat, C., and Peerhossaini, H. (2018). Slowdown of the surface diffusion during early stages of bacterial colonization. *Physical Review E*, 97(3):17–20.
- [Wang et al., 2009] Wang, B., Anthony, S. M., Bae, S. C., and Granick, S. (2009). Anomalous yet Brownian. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36):15160–15164.
- [Wang et al., 2012] Wang, B., Kuo, J., Bae, S. C., and Granick, S. (2012). When Brownian diffusion is not Gaussian. *Nature Materials*, 11(6):481–485.
- [Wang et al., 2014] Wang, Z., Volinsky, A. A., and Gallant, N. D. (2014). Crosslinking effect on polydimethylsiloxane elastic modulus measured by custom-built compression instrument. *Journal of Applied Polymer Science*, 41050:1–4.
- [Weber and Osteryoung, 2010] Weber, A. P. M. and Osteryoung, K. W. (2010). From Endosymbiosis to Synthetic Photosynthetic Life. *Plant Physiology*, 154(2):593–597.

[Weber et al., 2015] Weber, C. A., Lin, Y. T., Biais, N., and Zaburdaev, V. (2015). Formation and dissolution of bacterial colonies. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 92(3).

- [Weeks et al., 2000] Weeks, E. R., Crocker, J.-C., Levitt, A. C., Schofield, A., and Weitz, D. A. (2000). Three-Dimensional Direct Imaging of Structural Relaxation Near the Colloidal Glass TransitionThree-Dimensional Direct Imaging of Structural Three-dimensional direct imaging of structural relaxation near the colloidal glass transition. Science, 287(January):627.
- [Wilde and Mullineaux, 2017] Wilde, A. and Mullineaux, C. W. (2017). Light-controlled motility in prokaryotes and the problem of directional light perception. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6):900–922.
- [Wolgemuth et al., 2002] Wolgemuth, C., Hoiczyk, E., Kaiser, D., and Oster, G. (2002). How myxobacteria glide. *Current Biology*, 12(5):369–377.
- [Wong et al., 2004] Wong, I. Y., Gardel, M. L., Reichman, D. R., Weeks, E. R., Valentine, M. T., Bausch, A. R., and Weitz, D. A. (2004). Anomalous diffusion probes microstructure dynamics of entangled f-actin networks. *Phys. Rev. Lett.*, 92:178101.
- [Wu and Libchaber, 2000] Wu, X. L. and Libchaber, A. (2000). Particle diffusion in a quasi-two-dimensional bacterial bath. *Physical Review Letters*, 84(13):3017–3020.
- [Yoshihara and Ikeuchi, 2004] Yoshihara, S. and Ikeuchi, M. (2004). Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Photochem Photobiol Sci*, 3:512–518.
- [Zaburdaev et al., 2014] Zaburdaev, V., Biais, N., Schmiedeberg, M., Eriksson, J., Jonsson, A. B., Sheetz, M. P., and Weitz, D. A. (2014). Uncovering the mechanism of trapping and cell orientation during Neisseria gonorrhoeae twitching motility. *Biophysical Journal*, 107(7):1523–1531.
- [Zhang et al., 2014] Zhang, R., Ni, L., Jin, Z., Li, J., and Jin, F. (2014). Bacteria slingshot more on soft surfaces. *Nature communications*, 5(May):5541.
- [Zhao et al., 2013] Zhao, K., Tseng, B. S., Beckerman, B., Jin, F., Gibiansky, M. L., Harrison, J. J., Luijten, E., Parsek, M. R., and Wong, G. C. L. (2013). Psl trails guide exploration and microcolony formation in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Nature*, 497(7449):388–391.
- [Zweitering, 1990] Zweitering, M. H. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. Applied and Environmental Microbiology, 56(6):1875–1881.