



Propriétés d'adhésion de levures sur le verre, sondées par pince optique. Influence de paramètres environnementaux

Mickaël Castelain, Frédéric Pignon, Jean-Michel Piau, Albert Magnin

► To cite this version:

Mickaël Castelain, Frédéric Pignon, Jean-Michel Piau, Albert Magnin. Propriétés d'adhésion de levures sur le verre, sondées par pince optique. Influence de paramètres environnementaux. *Rhéologie*, 2007, 12, pp.37-44. hal-02658427

HAL Id: hal-02658427

<https://hal.inrae.fr/hal-02658427v1>

Submitted on 30 May 2020

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.

Propriétés d'adhésion de levures sur le verre, sondées par pince optique. Influence de paramètres environnementaux.

M. Castelain, F. Pignon, J.-M. Piau et A. Magnin

Laboratoire de Rhéologie, Université Joseph Fourier Grenoble I, Institut National Polytechnique de Grenoble, CNRS, UMR 5520, B.P. 53, 38041 Grenoble Cedex 9

Reçu le 16 novembre 2007 - Version finale acceptée le 14 décembre 2007

Résumé : Nous avons utilisé la pince optique pour manipuler et détacher des levures *Saccharomyces cerevisiae* initialement adhérentes sur une lamelle de verre. Des mesures de forces aux échelles locales du micron ont été effectuées et ont permis de mettre en évidence l'impact de paramètres environnementaux sur l'adhésion de la levure *S. cerevisiae* sur le verre, qui sont la nature de l'ion, la force ionique et la température (15-37°C). Les résultats démontrent que le calcium est un promoteur d'adhésion et que l'augmentation de la température facilite le détachement.

Mots-clés : Adhésion, *Saccharomyces cerevisiae*, Micro-rhéologie, Calcium, Température, Pince optique.

[Abridged English version on last page]

1. Introduction

L'adhésion cellulaire joue un rôle majeur dans de nombreux aspects du domaine vivant et est un processus complexe et fascinant. Ce processus est contrôlé par une combinaison subtile de différentes forces, à savoir les forces dites spécifiques et non-spécifiques génériques. Les forces spécifiques sont gouvernées par le principe "clé-serrure" et possèdent un niveau de force de rupture de l'ordre de 100 pN, estimés expérimentalement avec la microscopie à force atomique (AFM) [1, 2], la chambre à écoulement [3] et la pince optique [4]. Les forces dites non-spécifiques génériques sont décrites par (i) la théorie Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), incluant les interactions de van der Waals et électrostatiques, et (ii) l'approche thermodynamique, considérant l'équilibre de l'énergie libre interfaciale des différents constituants.

Les facteurs physiques, chimiques et biologiques, gouvernant les étapes critiques de l'adhésion irréversible de communautés dans des milieux aqueux, ont été étudiés intensivement et sont attribués principalement aux interactions hydrophobes [5], à la rugosité du substrat [6], aux conditions de croissance [7], à la physico-chimie du milieu suspensif [8], aux caractéristiques de charge de surface [9] et aux macromolécules présentes en surface [10].

L'effet de la physico-chimie du milieu ambiant présente un intérêt particulier pour comprendre l'adhésion cellulaire. Des travaux antérieurs [11] montrent que la force ionique du milieu suspensif influence le comportement adhésif des levures sur le verre. L'augmentation de la force ionique conduit à la réduction de l'épaisseur des double-couches électrostatiques. En conséquence, le micro-organisme peut s'approcher suffisamment près de la surface, l'attraction de van der Waals devient dominante par rapport à la barrière d'énergie répulsive, et permet au micro-organisme d'adhérer. Cependant, malgré la réduction des répulsions électrostatiques par la force ionique, l'implication de forces dites "non-DLVO", qui sont en général les interactions polaires, peut être prise en compte pour expliquer certains phénomènes d'attraction hydrophobe [5] ou de répulsion stérique [12].

La valence du cation dans la solution saline est un autre paramètre pouvant influencer la déposition des micro-organismes dans les milieux aqueux. Chen et Walker [8] concluent que les ions divalents augmentent de manière significative l'adhésion de bactéries sur les surfaces par rapport aux ions monovalents. Il est reconnu que le calcium est un flocculant favorisant l'adhésion inter-cellule chez la levure [13-16].

La température est également considérée comme un facteur environnemental important [17, 18]. Jusqu'à présent, peu de travaux ont pris en considération l'importance de la température dans le processus d'adhésion. Pour sonder l'échelle locale du micro-organisme, une instrumentation de pince optique permet de manipuler des objets micrométriques, vivants ou inertes, et de quantifier des forces de détachement [4, 11]. Cette instrumentation, mise en œuvre dans ce travail, a été améliorée par la mise au point d'une cellule de mesure et de régulation de la température dans la gamme 15-37°C. Le but de cet article est de mettre en évidence, par une quantification et une statistique des forces de détachement, l'influence du type d'ion (calcium ou sodium), de la force ionique et de la température sur l'adhésion de la levure *S. cerevisiae* sur le verre.

2. Matériaux et méthodes

2.1 Suspension de levures

Une pré-culture de *S. cerevisiae* (Saf Instant, Lesaffre, Marcq en Barœul, France) est préparée en plaçant quelques paillettes de levures sèches dans 100 mL de milieu riche YEPD stérile (1% d'extrait de levure (Fluka Chemika), 1% de bactopeptone (Sigma-Aldrich) et 2% de glucose anhydre (Fluka Chemika)). L'ensemble est mis à incuber toute une nuit à 30°C sous agitation (environ 600 tr/mn). Un volume déterminé de pré-culture est ensuite utilisé pour ensemer 200 mL de milieu riche YEPD stérile. Cette culture est incubée dans les mêmes conditions que précédemment durant 48 h, jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance (concentration finale d'environ 7,5 g/L). Les cellules sont récoltées par centrifugation, lavées deux fois, remises en suspension dans une solution saline (CaCl_2 50, 80, 100, 150, 200 et 330 mM et NaCl 150, 200 et 330 mM) et diluées jusqu'à $4 \cdot 10^6$ cellules/mL avant les essais. Le pH final est de 5,9 à $T = 23,0 \pm 0,1$ °C.

2.2 Surface de verre

La surface de verre utilisée est une lamelle de microscope Marienfeld Superior 18x24 mm et 0,15 mm d'épaisseur. Cette surface est nettoyée avec un mélange sulfochromique ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (2,7 M)/ H_2SO_4 (4% v/v), Chimie Plus Laboratoires) pendant 1h et rincée trois fois avec de l'eau filtrée à 0,2 μm . A chaque essai, une lamelle neuve et nettoyée est utilisée.

2.3 Pince optique

La pince optique [11, 19], développée au Laboratoire de Rhéologie [20], utilise un faisceau laser de

800 nm, émis par une diode Nd:YVO₄ (Millenia V, Spectraphysics, Mountain View, CA). Deux techniques différentes permettent de déplacer arbitrairement la position du piège par rapport au milieu suspendant suivant les trois directions de l'espace, soit par manipulation du point focal, soit par manipulation du milieu lui-même à l'aide d'une micro-presse piézoélectrique (Tritor 3D 101SG, Piezosystem Jena GmbH, Jena, Allemagne). La force du piège est déterminée selon l'équilibre de Stokes [11, 21] avec :

$$F_{\text{trap}} = 6 \pi \eta r v \quad (1)$$

où η est la viscosité du fluide suspendant, r le rayon moyen de la particule et v la vitesse du fluide.

2.4 Préparation de l'échantillon

Pour créer une cellule d'analyse, un volume de 25 μL de suspension de levure ($4 \cdot 10^6$ cellules/mL) est injecté dans la chambre formée par la lame et le joint autocollant (GeneFrame, AbGene, Royaume-Uni) fixé sur celle-ci. La lamelle est ensuite déposée sur le joint, formant ainsi une cavité hermétique dans laquelle se trouve la suspension de levure.

2.5 Température

La température est mesurée (Fig. 1) (i) dans l'échantillon au moyen d'une sonde thermocouple de type K de 0,25 mm de diamètre, (ii) dans la pièce métallique de la cellule thermo-régulée par une sonde thermocouple de type T, (iii) dans la salle par une sonde thermocouple de type K. La température de l'échantillon est contrôlée par la pièce métallique dans la gamme 15-26°C, et par de l'air soufflé et chauffé dans la gamme 26-37°C. Ce dernier système est asservi par un système de régulation par sonde Pt100.

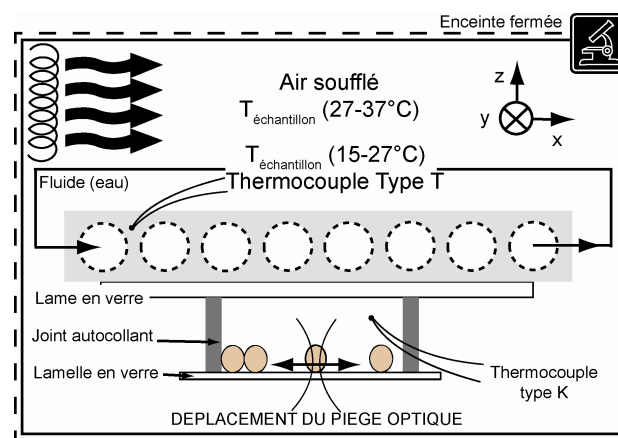


Figure 1. Dispositif expérimental. Le faisceau laser piège une levure adhérente et se déplace selon x afin de détacher la cellule vivante. Notez que le schéma n'est pas à l'échelle.

2.6 Adhésion et essais de détachement

Lorsqu'une cellule d'analyse a été préparée comme décrit ci-dessus, elle est ensuite retournée afin que la lamelle soit en dessous de la lame. Cet ensemble est positionné sur la platine piézoélectrique, lamelle vers le bas, face à l'objectif. A cet instant, la température est imposée de la manière décrite au paragraphe suivant et durant tout l'essai. Pendant 20 minutes, la suspension de levures est laissée dans cette position afin de permettre aux levures de sédimenter et de venir se déposer sur la lamelle. Après ce temps de sédimentation et une heure de contact, une trentaine de levures différentes sont analysées en approchant le faisceau laser au centre de la levure. A puissance laser donnée, on tente de détacher l'une après l'autre les levures, en exerçant un mouvement du faisceau laser parallèlement à la paroi en verre (Fig. 1). Un déplacement horizontal suivant l'axe x d'une amplitude d'environ $10\ \mu\text{m}$ est imposé par le laser sur la levure. Pour chacune d'elles, la puissance du laser est initialement fixée à son niveau le plus faible (27 mW), puis est progressivement augmentée jusqu'à sa valeur maximale de 125 W. Si la levure est détachée, une mesure de la force exercée par le laser à cette puissance de détachement est effectuée comme indiqué dans des travaux antérieurs [11].

3. Résultats

3.1 Statistique d'adhésion : effet du cation et de la température

A une température de $25,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, les levures adhérentes, c'est-à-dire qui n'ont pas été détachées par la pince à la plus faible force ($\approx 0,2\ \text{pN}$), sont répertoriées en pourcentage sur la Figure 2. Cette figure montre l'augmentation de levures adhérentes avec la force ionique. A $1,5\ \text{mM}$ (NaCl et CaCl_2), l'adhésion est très faible, puisque la quasi-totalité de la population est encore libre. A $330\ \text{mM}$, toute la population est adhérente dans le cas du NaCl et $85,8\ \%$ dans le cas du CaCl_2 .

On remarque cependant que l'adhésion est plus marquée avec le calcium puisqu'à même force ionique, par exemple $150\ \text{mM}$, $41,4\%$ de la population est adhérente avec le sodium contre $84,1\%$ avec le calcium. Cette tendance se retrouve jusqu'à $200\ \text{mM}$. Au-delà de cette force ionique, le comportement change. En effet, la totalité de la population est adhérente à $330\ \text{mM}$ en NaCl , contre seulement $85,8\%$ à $330\ \text{mM}$ en CaCl_2 (augmentation de $1,6\%$ de $200\ \text{mM}$ à $330\ \text{mM}$).

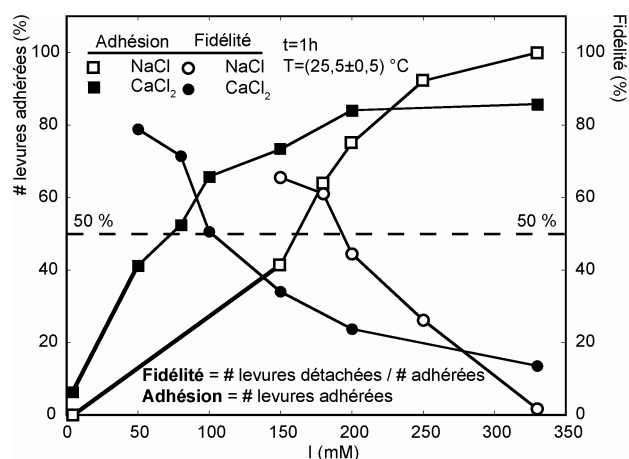


Figure 2. Fidélité (%) de la mesure et population de levures adhérentes (%) en fonction de la force ionique I (mM) en NaCl et en CaCl_2 , à 1h de temps de contact. Les données en NaCl à $25,5^\circ\text{C}$ proviennent de travaux antérieurs [11].

Dans cet article, la fidélité de la mesure a été estimée et correspond au nombre de détachements rapporté au nombre de levures adhérentes (et non au nombre de levures total). Lorsque le nombre de détachements est trop faible, rapporté à la population adhérente (détachée ou non), la détermination de la force d'adhésion de la population étudiée ne permet pas d'être déduite. En conséquence, ceci permet d'apprécier l'efficacité de la méthode utilisant la pince optique et donc de se rapprocher au plus près de la valeur moyenne de détachement d'une population. Sur la Figure 2, lorsque la proportion de levures adhérentes augmente jusqu'à $85,8\%$ à $330\ \text{mM}$ en CaCl_2 , le nombre de levures détachées est largement inférieur à 50% . Nous considérons pour ce cas particulier que le niveau de force d'adhésion moyen est supérieur à celui offert par la pince. Les quelques particules détachées ne sont pas représentatives de la population examinée.

La proportion de levures adhérentes a été analysée pour différentes températures, de 15 à 37°C , et à différentes forces ioniques en CaCl_2 et NaCl (Fig. 3). De manière générale, les levures sont moins adhérentes avec l'augmentation de la température. L'adhésion présente un degré similaire à 15°C et à $25,5^\circ\text{C}$. Dans le cas du calcium, l'adhésion décroît d'environ 20% jusqu'à 37°C (voir Tableau 1). Dans le cas du sodium, les effets de décroissance sont plus marqués. En effet, à partir de 27°C , l'adhésion chute de manière continue avec une décroissance d'environ 40% (Tableau 1). Sur la Figure 3, il peut être observé que le calcium favorise l'adhésion par rapport au sodium et cet effet est accentué à température croissante. A même pourcentage d'adhésion dans la gamme 15 - $25,5^\circ\text{C}$, prenons par

exemple les couples $\text{CaCl}_2/\text{NaCl}$: 50 mM/150 mM et 150 mM/200 mM à environ 40% et 75%, respectivement. Jusqu'à 37°C, une décroissance est observée.

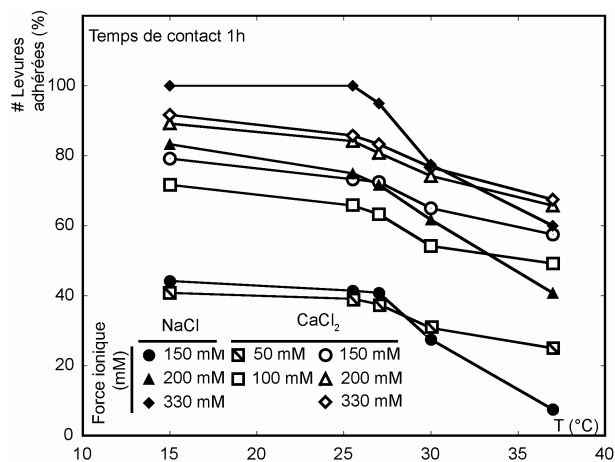


Figure 3. Population de levures adhérentes (%) en fonction de la température, pour différentes forces ioniques en NaCl et en CaCl_2 , à 1h de contact sur la lamelle. Les données en NaCl à 25,5°C proviennent de travaux antérieurs [11].

Cation	I (mM)	Variation (%)
Na^+	150	-36,7
	200	-52,5
	330	-40
Ca^{2+}	50	-15,8
	150	-21,7
	330	-24,2

Tableau 1 : Variation de la proportion de levures adhérentes (%) de 15°C à 37°C pour les différentes conditions environnementales explicitées en Figure 3.

3.2 Mesure de force de détachement

Après une heure de contact sur la lamelle, le niveau de force appliqué par la pince pour détacher les levures est représenté sur la Figure 4 en nombre d'occurrence pour différentes forces ioniques en CaCl_2 . Comme il a déjà été remarqué précédemment avec le NaCl [11], les détachements sont répartis autour d'une zone étalée, centrée sur un pic d'occurrence pour chaque force ionique. Ces pics sont déplacés vers les niveaux de force croissants avec l'augmentation de la force ionique. La courbe de fidélité nous permet de définir deux zones. D'après la Figure 2, le coefficient de fidélité est supérieur à 50% pour 50 mM, 80 mM et 100 mM, et donc les niveaux de force associés sont bien représentatifs de la population.

A partir de données issues de travaux précédents [11] avec le NaCl , nous avons pu comparer les effets

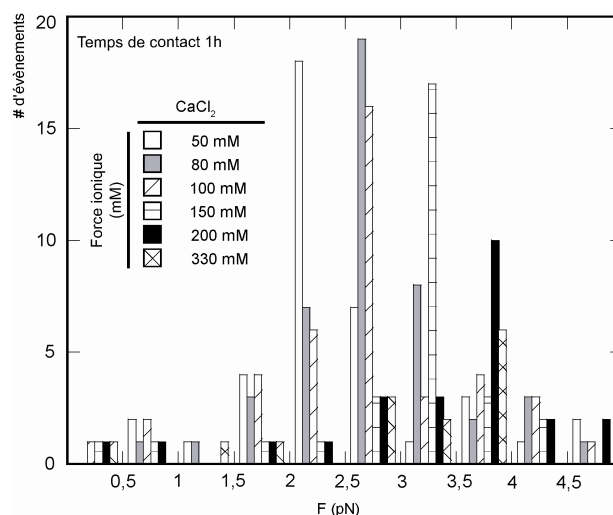


Figure 4. Nombre d'événements de détachements en fonction du niveau de force appliqué (pN) pour différentes forces ioniques (mM) en CaCl_2 à 1h de contact avec la lamelle, pour une température $T = 25,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

des deux sels. Deux couples de forces ioniques exhibent un coefficient de fidélité supérieur à 50% (Figure 2) et correspondant à un même pourcentage de levures adhérentes (Figure 3) : 50 mM/100 mM et 100 mM/180 mM pour le calcium et le sodium, respectivement. D'après la Figure 5, à 50 mM/100 mM ($\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$), les niveaux de force présentent deux pics bien distincts. Le premier (Na^+) est situé vers les faibles forces (0,75 pN), tandis que le second (Ca^{2+}) se trouve vers les niveaux plus élevés (2,25 pN). A force ionique plus élevée, pour le couple 100 mM/180 mM ($\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$), les niveaux de force sont similaires et se situent autour de 2,75 pN.

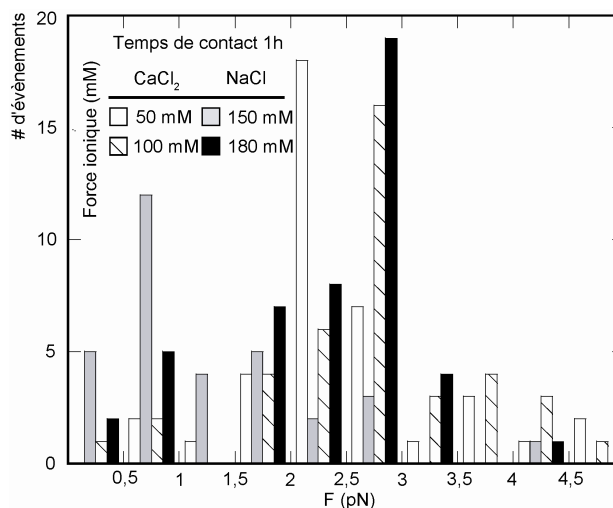


Figure 5. Nombre d'événements de détachements en fonction du niveau de force appliqué (pN) pour différentes forces ioniques (mM) $\text{NaCl}/\text{CaCl}_2$; $t = 1\text{h}$; $T = 25,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Les données en CaCl_2 proviennent de la Figure 4 et les données en NaCl proviennent de travaux antérieurs [11].

4. Discussion

4.1 Quels types d'interactions sont à l'origine de l'adhésion de la levure sur le verre ?

Il a pu être démontré que l'adhésion de la levure est plus forte avec l'augmentation de la force ionique (Figure 2). Indépendamment des matériaux utilisés, différents auteurs ont mis à jour l'influence de la contribution électrostatique sur le procédé d'adhésion de la levure. Par exemple, en s'intéressant à l'adhésion des espèces *Candida* sur du polystyrène, chargé négativement comme le verre [22], Gallardo-Moreno et al. [23] concluent que l'augmentation de la force ionique conduit à une élévation du pourcentage de cellules adhérentes.

Des travaux antérieurs [11] ont également montré que l'augmentation du nombre de levures était liée aux temps de contact, soulignant le caractère dynamique de l'adhésion. Dans ces travaux, les niveaux de forces mesurés pour détacher certaines levures ont révélé un aspect discret des pics de détachement qui augmente avec la force ionique dans la gamme 0,75-4,75 pN pour du NaCl 150-250 mM. Ici, le niveau de force de détachement augmente raisonnablement avec la force ionique (Fig. 4) en CaCl_2 (50-330mM). Cependant, les pics rencontrés avec le calcium sont regroupés autour de 2,5-3 pN, avec un léger effet de déplacement vers les niveaux de force croissant, comme décrit précédemment. Quelques données estiment les interactions non-spécifiques de l'ordre de 1-10 nN [9] sur de l'acier inoxydable [6, 24] et du polystyrène [25], tandis que les interactions spécifiques sont de l'ordre de 100-200 pN avec le substrat [1, 26] ou également avec une autre levure par floculation [2]. Dans le cas présent, les liaisons établies entre la levure et le substrat seraient plutôt de type hydrogène ou ionique, compte tenu de l'ordre de grandeur de la force exercée (≈ 4 pN). En corrélation avec le coefficient de fidélité (Figure 2), les niveaux de force déterminés au-delà de 50% de détachement suggèrent une valeur moyenne de 2,5 pN à 50-100 mM CaCl_2 et 150-180 mM NaCl (Figure 5). On peut supposer que les liaisons entre la levure et le verre soient de type hydrogène ou ionique, principalement dues à la solvation. Ainsi, lorsque la force ionique est augmentée, le nombre de liaisons augmente et le niveau de force s'accroît.

4.2 Quel est l'effet du calcium ou de sa valence dans le processus d'adhésion ?

La promotion de l'adhésion par le calcium est quasi-universelle car elle touche un grand nombre de micro-organismes retrouvés dans l'agroalimentaire

avec *Lactobacillus* et *E. coli* [27], dans les eaux souterraines et marines avec *Burkholderia cepacia* et *Halomonas pacifica*, respectivement [8]. Il est reconnu que le calcium est un flocculant favorisant l'adhésion inter-cellule chez la levure [13]. En effet, Verstrepen et Klis [13] décrivent les travaux effectués par différents auteurs sur la sécrétion de glycoprotéines, essentiellement responsables de l'adhésion cellule-cellule et fortement stabilisées par la présence de calcium dans le milieu extracellulaire. Par ailleurs, Weiss [28] a souligné l'importance de l'influence des ions calcium pour améliorer à un degré élevé l'adhésion de cellules au verre. Le rôle du Ca^{2+} peut être d'une grande importance dans la liaison entre deux entités hydrophiles chargées négativement, comme c'est le cas pour cette souche de levure [29, 30] et pour le cas du verre [31]. Par ailleurs, indépendamment des matériaux utilisés, de nombreux auteurs remarquent que la présence du calcium accroît le comportement adhésif du matériau biologique. Gingell et Vince [32] déterminent la distance de séparation entre le verre et l'amibe *Dictyostelium* par interférométrie. Ils montrent que cette distance diminue avec la force ionique et qu'elle est d'autant plus faible avec la plurivalence du cation (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} et La^{3+}).

Les résultats présentés en Figure 3 permettent de comparer l'effet du calcium et celui du sodium en fonction de la température. La présence du calcium renforce l'adhésion des levures et atténue l'effet de la température. En effet, à partir d'un même pourcentage d'adhésion à température ambiante, l'écart s'accroît jusqu'à 20% entre le CaCl_2 et le NaCl. Le paragraphe suivant montre que ce paramètre est un facteur environnemental significatif dans le processus d'adhésion.

4.3 Quel est l'effet de la température, lors des expériences, sur l'adhésion ?

Selon la Figure 3, le nombre de levures adhérentes décroît avec l'augmentation de la température. Très peu de travaux ont été effectués à ce sujet. Gallardo-Moreno et al. [17, 23] démontrent que la température de mise en culture et celle de mesure ont une influence sur le taux initial d'adhésion de deux souches hydrophobes *Candida parapsilosis* sur le verre. Contrairement à nos résultats, les auteurs montrent que, quelle que soit la température de la culture (22°C ou 37°C), le taux d'adhésion est plus élevé à 37°C qu'à 22°C, alors que McEldowney et Fletcher [33] déterminent une décroissance de l'adhésion de bactéries avec la température jusqu'à 30°C. La température lors des expériences a donc un impact certain sur les propriétés d'adhésion, influant

sur les propriétés physico-chimiques de surface. Dans notre cas, la levure *S. cerevisiae* est plutôt hydrophile [29] et les interactions sont également perturbées par l'effet de la température. Il semblerait que les interactions faibles, de type pontages électrostatiques, soient écrantées par l'agitation thermique des contre-ions, réduisant probablement la durée et/ou la probabilité de pontage ainsi que l'agitation thermique plus globale, à l'échelle du micro-organisme. Lo et al. [18] remarquent que la température affecte les interactions spécifiques de type biotine-avidine. En effet, dans la gamme 13-37°C, la force de rupture de liaisons non-covalentes décroît d'un rapport 5 dans cette gamme de température. Ils expliquent ce phénomène par une approche thermodynamique et cinétique. En effet, ils considèrent que l'adhésion est discrétisée par une multitude de liens élastiques, comme le décrivent également Décavé et al. [24]. Ils extraient la relation de force de rupture individuelle $F_i \propto T$ et la corrélient parfaitement avec leur expérience. Cette approche peut expliquer la décroissance du nombre de levures adhérentes, en supposant que les liens élastiques sont ici gouvernés par l'attraction apolaire et les liaisons électrostatiques qui diminuent d'efficacité avec l'augmentation de la température. Une autre hypothèse peut être mise en exergue : une variation de l'hydrophobicité de la paroi cellulaire avec la température, comme montré sur d'autres espèces de levures [17]. En ce sens, les propriétés d'adhésion varient de manière notable avec ce paramètre comme cela a été observé en Figure 3.

5. Conclusion

La pince optique s'est révélée être un outil remarquable dans l'approche locale de l'adhésion de micro-organismes sur des surfaces. L'ensemble de nos observations et calculs de forces d'interaction tendent à montrer :

- que l'augmentation du nombre de levures adhérentes avec l'augmentation de la force ionique concorde avec la théorie de la double couche électrostatique.

- que le calcium renforce l'adhésion, avec cependant un niveau de force de détachement du même ordre de grandeur qu'avec le sodium, suggérant un aspect discret des faibles forces d'interactions, telles que le pontage électrostatique.

- que la température durant les expériences est un paramètre à prendre en compte dans le phénomène d'adhésion car elle réduit l'adhésion au delà de 27°C. En conséquence, il ressort de l'ensemble de ces résultats que le calcium est un

promoteur d'adhésion indépendamment de la température sur un domaine de 15°C à 37°C et que la température est un paramètre significatif modifiant les propriétés d'adhésion de *S. cerevisiae* sur le verre.

Remerciements

Les auteurs remercient Gaëlle Guillemot, Muriel Mercier-Bonin et Philippe Schmitz du Laboratoire d'Ingénieries des Systèmes Biologiques et des Procédés de Toulouse (UMR CNRS 5504, UMR INRA 792, INSA) pour leur aide apportée dans la définition des systèmes biologiques et des supports d'adhésion.

6. References

- [1] Touhami, A., B. Hoffmann, A. Vasella, F.A. Denis, Y.F. Dufrêne. Probing specific lectin-carbohydrate interactions using atomic force microscopy imaging and force measurements. *Langmuir*, 19, 1745-1751 (2003).
- [2] Touhami, A., B. Hoffmann, A. Vasella, F.A. Denis, Y.F. Dufrêne. Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin-carbohydrate interactions. *Microbiol.*, 149, 2873-2878 (2003).
- [3] Lorthois, S., P. Schmitz, E. Anglés-Cano. Experimental study of Fibrin/Fibrin-specific molecular interactions using a sphere/plane adhesion model. *J. Colloid Interf. Sci.*, 241, 52-62 (2001).
- [4] Simpson, H.K., G. Bowden, M. Höök, B. Anvari. Measurement of adhesive forces between individual *Staphylococcus aureus* MSCRAMMs and protein-coated surfaces by use of optical tweezers. *J. Bacteriol.*, 185, 2031-2035 (2003).
- [5] Kang, S., H. Choi. Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S. cerevisiae* onto modified surfaces by poly(styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. *Colloids Surf. B*, 46, 70-77 (2005).
- [6] Demilly, M., Y. Bréchet, F. Bruckert, L. Boulangé. Kinetics of yeast detachment from controlled stainless steel surfaces. *Colloids Surf. B*, 51, 71-79 (2006).
- [7] Gallardo-Moreno, A.M., M.L. González-Martin, C. Pérez-Giraldo, E. Garduño, J.M. Bruque, A.C. Gómez-García. Serum as a factor influencing adhesion of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *Appl. Environ. Microb.*, 68, 5784-5787 (2002).
- [8] Chen, G., S.L. Walker. Role of solution chemistry and ion valence on the adhesion kinetics of groundwater and marine bacteria. *Langmuir*, 23, 7162-7169 (2007).
- [9] Ahimou, F., F.A. Denis, A. Touhami, Y.F. Dufrêne. Probing microbial cell surface charges by atomic force microscopy. *Langmuir*, 18, 9937-9941 (2002).

- [10] Kuznar, Z.A., M. Elimelech. Role of surface proteins in the deposition kinetics of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Langmuir*, 21, 710-716 (2005).
- [11] Castelain, M., F. Pignon, J.-M. Piau, A. Magnin, M. Mercier-Bonin, P. Schmitz. Removal forces and adhesion properties of *Saccharomyces cerevisiae* on glass probed by optical tweezer. *J. Chem. Phys.*, 127, 135104 (2007).
- [12] Rijnaarts, H.H.M., W. Norde, J. Lyklema, A.J.B. Zehnder. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids Surf. B*, 14, 179-195 (1999).
- [13] Verstrepen, K.J., F.M. Klis. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol. Microbiol.*, 60(1), 5-15 (2006).
- [14] Dengis, P.B., L.R. Nélissen, P.G. Rouxhet. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2), 718-728 (1995).
- [15] Bester, M.C., I.S. Pretorius, F.F. Bauer. The regulation of *Saccharomyces cerevisiae* FLO gene expression and Ca²⁺ dependant flocculation by Flo8p and Mss11p. *Curr. Genet.*, 49, 375-383 (2006).
- [16] Moradas-Ferreira, P., P.A. Fernandes, M.J. Costa. Yeast flocculation - the role of cell wall proteins. *Colloids Surf. B*, 2, 159-164 (1994).
- [17] Gallardo-Moreno, A.M., M.L. González-Martín, C. Pérez-Giraldo, J.M. Bruque, A.C. Gómez-García. The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. *J. Colloid Interf. Sci.*, 271, 351-358 (2004).
- [18] Lo, Y.-S., J. Simons, T.P. Beebe Jr. Temperature dependence of the biotin-avidin bond-rupture force studied by atomic force microscopy. *J. Phys. Chem. B*, 106, 9847-9852 (2002).
- [19] Fällman, E., O. Axner. Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. *Appl. Opt.*, 36, 2107-2113 (1997).
- [20] Piau, J.-M. Carbopol gels as elastoviscoplastic and slippery glasses made of individual swollen sponges. Meso and macroscopic properties, constitutive equations and scaling laws. *J. Non-Newt. Fluid Mech.*, 44, 1-29 (2007).
- [21] Neuman, K.C., S.M. Block. Optical trapping. *Rev. Sci. Instrum.*, 75, 2787-2809 (2004).
- [22] Klotz, S.A., D.J. Drutz, J.E. Zajic. Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect. Immun.*, 50, 97-101 (1985).
- [23] Gallardo-Moreno, A.M., M.L. González-Martín, C. Pérez-Giraldo, E. Gardño, J.M. Bruque, A.C. Gómez-García. Thermodynamic analysis of growth temperature dependance in the adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2610-2613 (2002).
- [24] Décavé, E., M. Demilly, B. Fourcade, F. Bruckert, L. Boulangé, Y. Brechet. Biological cell detachment kinetics from an inert substrate. *Phil. Mag.*, 85, 3173-3189 (2005).
- [25] Guillemot, G., S. Lorthois, P. Schmitz, M. Mercier-Bonin. Evaluating the adhesion force between *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells and polystyrene from shear-low induced detachment experiments. *Chem. Eng. Res. Des.*, 85, 800-807 (2006).
- [26] Gad, M., I. Arimichi, A. Ikai. Mapping cell wall polysaccharides of living microbial cells using atomic force microscopy. *Cell Biol. Int.*, 21, 697-706 (1997).
- [27] Larsen, N., P. Nissen, W.G.T. Willats. The effects of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* spp and *E. coli* O138. *Int. J. Food Microbiol.*, 114, 113-119 (2007).
- [28] Weiss, L. The adhesion of cells. *Int. Rev. Cytol.* 9, 187-225 (1960).
- [29] Mercier-Bonin, M., K. Ouazzani, P. Schmitz, S. Lorthois. Study of bioadhesion on a flat plate with a yeast/glass model system. *J. Colloid Interf. Sci.*, 271, 342-350 (2004).
- [30] Guillemot, G., G. Vaca-Medina, H. Martin-Yken, A. Verhnet, P. Schmitz, M. Mercier-Bonin. Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: Influence of yeast and solid surface properties. *Colloids Surf. B*, 49, 126-135 (2006).
- [31] Azeredo J., J. Visser, R. Oliveira. Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories. *Colloids Surf. B*, 14, 141-148 (1999).
- [32] Gingell, D., S. Vince. Cell-glass separation depends on salt concentration and valency: measurement on *Dictyostelium* amoebae by finite aperture interferometry. *J. Cell. Sci.*, 54, 299-310 (1982).
- [33] McEldwney, S., M. Fletcher. Effect of pH, temperature, and growth conditions on the adhesion of a gliding bacterium and three nongliding bacteria to polystyrene. *Microb. Ecol.*, 16, 183-195 (1988).

[Abridged English version]**Adhesion properties of yeast on glass substrates probed by optical tweezer.****Effects of environmental factors.**

Cell adhesion plays a major role throughout living field and is a complex and fascinating process. It is controlled by a subtle interplay between specific and generic non-specific forces. Specific forces are governed by the “key-lock” system and exhibit a breakage force level in the order of 100 pN. They were experimentally determined by AFM [1, 2, 9, 18], flow chamber [3] and optical tweezer [4]. Non-specific forces such as van der Waals attraction were estimated to be 1-10 nN [9] from stainless steel [6] and polystyrene [25].

In the current study, we used optical tweezer as to micromanipulate *S. cerevisiae* yeast cells, initially tethered to glass substrate. Force measurements have been carried out and so highlight effect of environmental parameters on yeast adhesion to glass which are cation valency, ionic strength and measurement temperature (15-37°C). Our observations and force calculations lead to demonstrate that (i) increase of adhering yeast number with increase of ionic strength is in good agreement with electric double-layer theory (Figure 2); (ii) calcium strengthens adhesion but with force levels in the same orders of magnitude (NaCl vs. CaCl₂), suggesting a discrete behaviour through quantized peaks of weak detachment forces, namely hydrogen bonds or electrostatic ionic bridges (Figure 4 and Figure 5); (iii) measurement temperature is a key parameter to take into account in adhesion processes because increase of temperature weakens adhesion at $T > 27^{\circ}\text{C}$ (Figure 3). As a consequence, we point out that calcium promotes adhesion independently of the temperature, ranging from 15°C to 37°C and measurement temperature is a significant parameter modifying adhesion properties of *S. Cerevisiae* to glass.