



HAL
open science

Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces : de l'adhésion au biofilm mature

Thibaut Saur

► To cite this version:

Thibaut Saur. Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces : de l'adhésion au biofilm mature. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques), 2014. Français. NNT: . tel-02801909

HAL Id: tel-02801909

<https://hal.inrae.fr/tel-02801909>

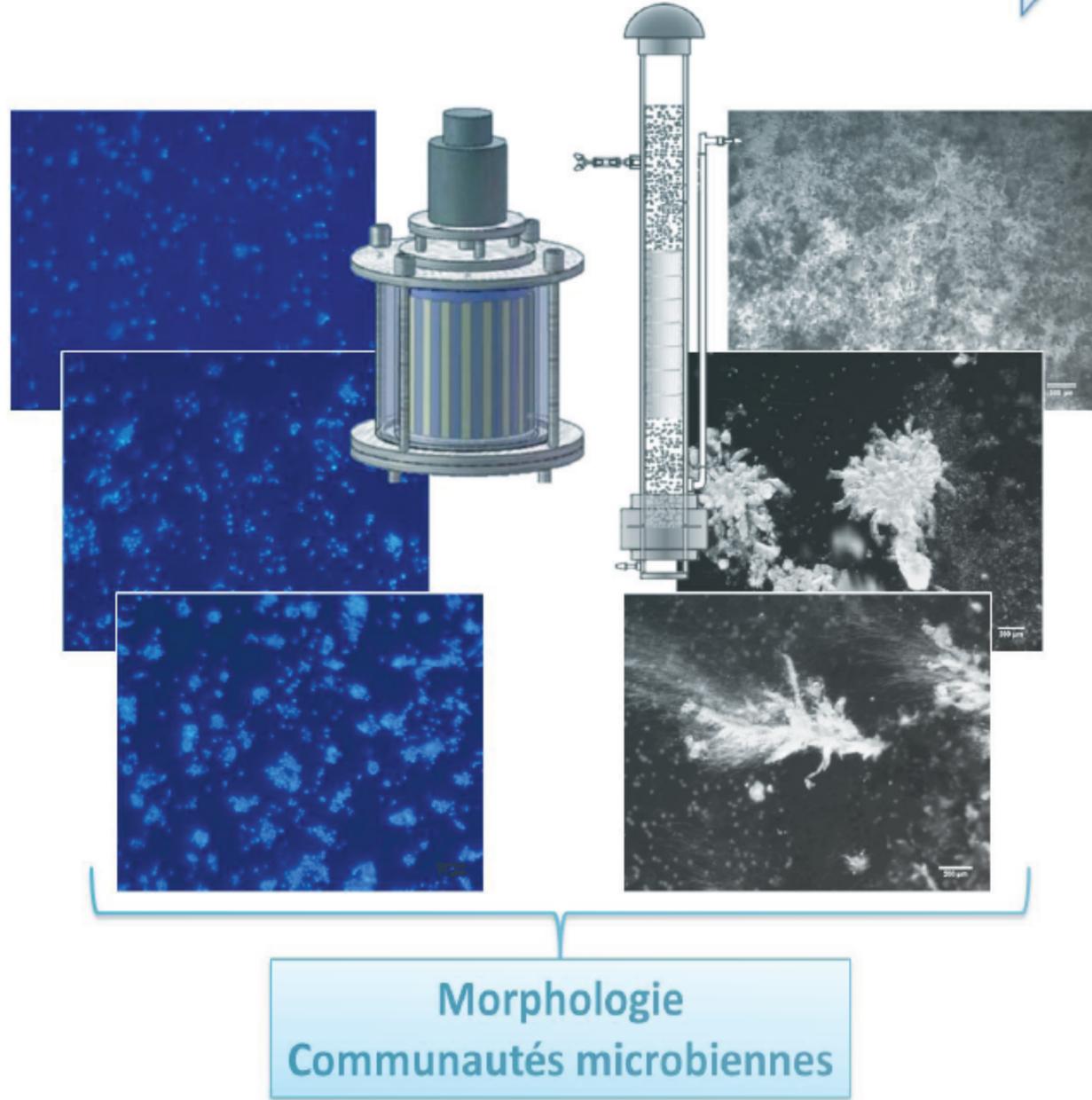
Submitted on 5 Jun 2020

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.



PhD thesis 2014



STRUCTURATION MORPHOLOGIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DES BIOFILMS MULTI-ESPÈCES : DE L'ADHÉSION AU BIOFILM MATURE

MORPHOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL STRUCTURING OF MULTI-SPECIES BIOFILMS: FROM ADHESION TO MATURE BIOFILMS

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER 2**

**Préparée au sein de l'école doctorale
Sciences des Procédés – Sciences des Aliments
Et de l'unité de recherche
Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement**

Spécialité : Génie des Procédés

Présentée par Thibaut SAUR

**Structuration morphologique et
microbiologique des biofilms multi-
espèces : de l'adhésion au biofilm mature**

Soutenue le 01/12/2014 devant le jury composé de

M. Stéphan BROSILLON , Professeur, Univ. Montpellier II	Président
M. Jean-Claude BLOCK , Professeur, Univ. Lorraine	Rapporteur
M. Etienne PAUL , Professeur, INSA Toulouse	Rapporteur
M. Kim HELLESHOJ SOERENSEN , Directeur technique, Wabag	Examineur
M. Jean-Marie HERRY , Ingénieur d'études, INRA Massy	Examineur
M. Kim MILFERSTEDT , Chargé de recherche, INRA Narbonne	Invité
M. Renaud ESCUDIE , Chargé de recherche, INRA Narbonne	Directeur de thèse

Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces : de l'adhésion au biofilm mature

Les biofilms constituent un mode de vie microbien extrêmement répandu, aussi bien en milieu naturel que dans les environnements anthropisés. Dans ce dernier cas, les structures morphologique et microbiologique du biofilm vont conditionner son impact sur le système, que cet impact lui soit bénéfique ou préjudiciable. L'objectif de cette thèse est d'approfondir notre connaissance des phénomènes de structuration du biofilm afin, à terme, d'optimiser les performances de procédé. Afin de représenter au mieux les conditions industrielles, des régimes d'écoulement turbulents et des consortia microbiens complexes ont été utilisés. Une première partie se focalise sur l'impact des forces de cisaillement sur l'adhésion microbienne. Les résultats démontrent un changement progressif de la flore bactérienne fixée et de sa distribution spatiale. Dans un second temps, le projet s'est intéressé aux étapes de développement du biofilm et ont permis d'identifier un effet mémoire du biofilm mature. Il s'agit d'une conservation des structures morphologique et microbiologique au cours du temps en dépit d'un changement de régime hydrodynamique. Enfin la dernière partie a consisté en la mise au point d'une méthode de quantification des prédateurs mobiles dans les biofilms. Ces prédateurs participent à la structuration du biofilm et leur quantification peut s'avérer utile dans le contexte de l'épuration des eaux.

Morphological and microbiological structuring of multi-species biofilms: from adhesion to mature biofilms

Biofilms are a biological mode of life widely spread in both natural and engineered environments. In the last case, whether the biofilm is beneficial or detrimental for the process under consideration, both morphology and microbial community of the biofilm determine its impact. The objective of this thesis is to deepen our knowledge of biofilm structuring and, as a further goal, optimize a given process. Turbulent flows and multi-species consortia were used in order to better mimic industrial conditions. The first part of the project focused on the impact of shear stress on microbial adhesion. Results have demonstrated a gradual shift in bacterial communities with shear and a change in the spatial distribution of adhered microorganisms. Secondly, the work dealt with biofilm development. A memory effect, defined as the conservation of initial morphological and microbiological features despite a change in the environmental conditions, has been observed. Finally, a method for quantification of moving predators in mature biofilms has been developed. These predators actively shape the biofilm and their quantification is valuable, especially for wastewater treatment.

Discipline: Génie des procédés

Mots-clefs: Biofilm ; Adhésion ; Morphologie ; Communauté microbienne ; Hydrodynamique ; Traitement de l'eau

Keywords: Biofilm; Adhesion; Morphology; Microbial community; Hydrodynamics; Water treatment

Université de Montpellier 2 - Ecole doctorale : Sciences des Procédés – Sciences des Aliments

Institut National de la Recherche Agronomique,
UR0050 Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement,
Avenue des Etangs, 11100 Narbonne, France

Remerciements

Voilà la partie difficile à rédiger. Idéalement, au vu de ce qui se fait traditionnellement, il faut être drôle ou à défaut léger, sinon cette partie est une interminable et indigeste liste de noms, n'oublier personne, sans quoi on s'expose aux rancœurs de ses collègues et amis, et surtout se lâcher, autrement cette section est sans intérêt. Mes chers collaborateurs savent que se lâcher n'est pas franchement dans ma nature. Je ferai malgré tout de mon mieux.

Bien évidemment, je remercie tout d'abord **Renaud Escudié**, mon directeur de thèse pour la confiance qu'il m'a accordée, l'autonomie dont j'ai bénéficié, les conseils prodigués, sa grande disponibilité et son humour. Trois ans de collaboration qui se sont passés dans la bonne humeur et dans l'intérêt scientifique de la thèse. Je me considère donc comme chanceux car, à mon avis, rares sont les thésards ayant eu une hiérarchie aussi facile à supporter (j'avais imaginé la formule « un encadrant aussi facile à encadrer » mais c'est un peu familier).

J'associe à ces remerciements **Nicolas Bernet**, le grand sage de ma thèse, l'atout qu'avec Renaud on gardait en réserve et que l'on sortait au moment opportun quand on avait besoin de lumière sur la stratégie et la rigueur scientifique. Disponible pour chaque réunion et encourageant, il reçoit mes plus sincères remerciements.

Troisième responsable à qui j'envoie mes remerciements, l'irremplaçable **Frédéric Habouzit**. Au-delà de sa contribution scientifique, Fred c'est toujours un mot pour rire, pour féliciter, pour soutenir, aussi bien après une réunion que pendant les moments de labo. Pour tout ça donc, merci !

Und schließlich, **Kim Milferstedt** ou die deutsche Qualität. Là encore, pour sa disponibilité, pour les débats enflammés et interminables, pour les milliers de corrections, pour la rigueur scientifique et la bonne humeur, je remercie sincèrement Kim.

Avec un tel quatuor aux commandes, j'ai été bien supervisé. Mais en tant que bon doctorant, conciliant ses propres intérêts et ceux de sa hiérarchie, je tiens aussi à remercier **Jean-Philippe Steyer**, directeur de notre laboratoire. Cela a été un plaisir de travailler au LBE et il faut en remercier les grands chefs, présents et passés. Plus personnellement, Jean-Phi, je crois t'avoir plus parlé de mon après thèse que de ma thèse et pour cela, merci.

Pour leur participation active et précieuse dans mon projet de thèse, je tiens à remercier chaleureusement **Gaëlle Gévaudan** pour les innombrables SSCP et stats associés et **Emilie Morin**, « ma » stagiaire qui a tant fait (surtout lors du repas des stagiaires).

Mes remerciements s'adressent ensuite à tous les membres du LBE, administratifs, techniques, entretien, scientifiques... Ce cadre professionnel c'est aussi à eux qu'on le doit. Je citerai notamment **Michèle et Danièle** se sont occupés d'écoper le labo quand je m'échinai à l'inonder, **Pascal et Guillaume** pour la conception et réparation des réacteurs.

Ensuite pour leur contribution à faire de la thèse un bon moment, je remercie **Thierry Conte** dit Pépé Malin pour sa bonne humeur et ses débats politiques. Trois ans ensemble, dans le même bureau ; j'ai beau ne pas être le physique type de Thierry, ça finit par créer des liens ! Merci aussi à **Jean-Charles Motte**, là encore 3 ans de partage de bureau, ça forge des amitiés ! Merci aussi à mes « co-bureau x » **Alessandro, Mohana, Bruno** et surtout **Marie-Lou** (dit Loulou !) qui m'a beaucoup aidé (énorme dimanche soir à imprimer la thèse) ! Je n'oublie pas tous les autres, stagiaires, doctorants, post-doc, avec qui on n'a bien profité ! Il me faut nommer **Marine** (dit la poétesse), **Maximilien** (dit M. Ponctualité), **Caroline** (dit la Guyanaise), **Enguerrand** (dit Champion !), **Flo** (dit Champion !), **Roman** (dit Champion !), **Cyrille** (dit Champion !) et bien sûr **Pipine** (dit Julie). Je remercie aussi NS Restauration et Marie pour m'avoir sustenté durant 3 ans.

Enfin je souhaite remercier tous ceux que j'ai oubliés dans les remerciements précédents. Ne le prenez pas mal ni personnellement. C'est un oubli involontaire et votre contribution, j'en suis sûr, a été précieuse. Merci donc à vous, les anonymes !

Et finalement mes remerciements vont évidemment à mes amis et ma famille. **Anne-Gaëlle** qui a subi une partie de mes travaux et m'a soutenu, **Charles et Nico** pour leur présence à proximité qui m'a aidé à décompresser et tous les autres, proches ou lointains pour avoir été là dans les bons et les autres moments. Evidemment ma famille, **mes parents** en premier lieu qui m'ont toujours accordé leur confiance et ont tant fait. Merci aussi à **Thomas et Julien**, mes deux grands frères et modèles dont je n'avais qu'à suivre humblement le chemin.

A tous, un immense merci !

Liste des communications

Publications internationales

- **Saur, T., Milferstedt, K., Bernet, N., Escudié, R. (2014).** An automated method for the quantification of moving predators such as rotifers in biofilms by image analysis. *Journal of microbiological methods*, 103, 40-3. doi:10.1016/j.mimet.2014.05.009
- **Saur, T., Morin, E., Habouzit, F., Bernet, N., Escudié, R.** Impact of shear stress on initial bacterial adhesion in a Couette-Taylor reactor. En cours de soumission
- **Saur, T., Escudié, R., Santa-Catalina, G., Bernet, N., Milferstedt, K.** Growth history in biofilms and conservation of morphology and community structure. En cours de soumission

Communications orales

- **Saur, T., Milferstedt, K., Bernet, N., Escudié, R. (2013).** Impact of hydrodynamic perturbations on physical structure and microbiological composition of biofilm. Dans: *9th International Conference on Biofilm Reactors*, Paris, France
- **Saur, T., Milferstedt, K., Bernet, N., Steyer, JP., Escudié, R. (2013).** Quantification par analyse d'image de prédateurs mobiles dans des biofilms : application aux rotifères. Dans: *Biofilms : Remue-ménage aux interfaces*, Pau, France
- **Saur, T., Morin, E., Habouzit, F., Bernet, N., Escudié, R. (2014).** Impact of the shear stress on initial bacterial adhesion. Dans: *Biofilms 6*, Vienne, Autriche

Posters

- **Bellucci, M., Milferstedt, K., Escudié, R., Gévaudan, G., Saur, T., Bernet, N., Godon, JJ., Harmand, J. (2013).** Complex autochthonous biofilm community limits the invasion of a pure culture of *Aquabacterium* sp. at various concentrations. Dans: *9th International Conference on Biofilm Reactors*, Paris, France
- **Saur, T., Milferstedt, K., Santa-Catalina, G., Bernet, N., Escudié, R. (2014).** Memory effect on biofilm development: Biofilm history stronger than environmental conditions. Dans: *Biofilms 6*, Vienne, Autriche

Distinctions

- **Lauréat du « Young Investigator Award »** pour la meilleure présentation orale (2014). Dans: *Biofilms 6*, Vienne, Autriche. Titre : Impact of the shear stress on initial bacterial adhesion.
- **Lauréat du « Prix de l'école doctorale »** pour la seconde meilleure présentation orale (2014). Dans: *Journée de l'école doctorale*, Montpellier, France. Titre : Impact of the shear stress on initial bacterial adhesion

Table des matières

Table des matières	- 1 -
Liste des abréviations	- 6 -
Liste des figures	- 7 -
Liste des tableaux	- 10 -
Introduction	- 11 -
I. Synthèse bibliographique	- 15 -
I.1 Le biofilm : sa vie, son œuvre.....	- 17 -
I.1.1 Généralités sur les biofilms	- 17 -
I.1.1.1 Définition	- 17 -
I.1.1.2 Composition	- 18 -
I.1.1.3 Avantages du mode de vie biofilm.....	- 19 -
I.1.2 Les biofilms, un système biologique omniprésent	- 20 -
I.1.2.1 Les biofilms en milieu naturel.....	- 20 -
I.1.2.2 Les biofilms « négatifs »	- 21 -
I.1.2.3 Les biofilms « positifs »	- 22 -
I.1.3 Le cycle de vie du biofilm	- 23 -
I.1.4 Introduction aux diversités structurelles des biofilms	- 25 -
I.2 L'adhésion microbienne.....	- 29 -
I.2.1 La théorie de l'adhésion microbienne	- 29 -
I.2.1.1 L'accès au support.....	- 29 -
I.2.1.2 L'adsorption réversible	- 30 -
I.2.1.3 L'adhésion irréversible.....	- 36 -
I.2.2 Les paramètres clés de la structuration.....	- 37 -
I.2.2.1 Notions d'hydrodynamique.....	- 37 -

I.2.2.2	Les paramètres structurants en regard des conditions hydrodynamiques ...	40 -
I.2.3	Les techniques d'études de l'adhésion microbienne	50 -
I.2.3.1	Les dispositifs expérimentaux	50 -
I.2.3.2	La caractérisation chimique des surfaces	51 -
I.2.3.3	Les techniques d'observation	53 -
I.3	Le développement et le biofilm mature	55 -
I.3.1	Des microcolonies au biofilm mature.....	55 -
I.3.1.1	La formation de microcolonies	55 -
I.3.1.2	L'acquisition de structures différenciées : la maturation	58 -
I.3.1.3	Le biofilm mature	62 -
I.3.2	Les différents facteurs modifiant la structuration du biofilm	64 -
I.3.2.1	Les conditions hydrodynamiques.....	64 -
I.3.2.2	L'histoire du biofilm	68 -
I.3.2.3	Les phénomènes de prédation	69 -
I.3.3	Les techniques d'études adaptées	71 -
I.3.3.1	Les dispositifs expérimentaux	71 -
I.3.3.2	Les techniques d'observation	72 -
I.3.3.3	Les techniques d'investigation du biofilm	74 -
I.4	Les objectifs de l'étude	77 -
II.	Matériel et méthodes	81 -
II.1	Les dispositifs expérimentaux	82 -
II.1.1	L'adhésion : réacteur de Couette-Taylor	82 -
II.1.1.1	Présentation du réacteur	82 -
II.1.1.2	Les paramètres hydrodynamiques dans le CTR.....	83 -
II.1.2	Le développement et les biofilms matures : colonne à bulles	85 -
II.1.2.1	Présentation du réacteur	85 -

II.1.2.2	Description du régime hydrodynamique.....	- 86 -
II.2	La conduite des réacteurs	- 88 -
II.2.1	Le déroulement d'un essai d'adhésion.....	- 88 -
II.2.1.1	Les différentes contraintes appliquées	- 88 -
II.2.1.2	L'inoculum.....	- 88 -
II.2.1.3	Le protocole d'adhésion.....	- 89 -
II.2.2	L'opération des colonnes à bulles.....	- 90 -
II.2.2.1	Les deux types de conditions hydrodynamiques testés.....	- 90 -
II.2.2.2	L'inoculation des réacteurs	- 90 -
II.2.2.3	La conduite continue	- 91 -
II.2.3	Les caractérisations physico-chimiques.....	- 92 -
II.3	La caractérisation morphologique	- 94 -
II.3.1	Les techniques d'observation.....	- 94 -
II.3.1.1	La microscopie à épifluorescence	- 94 -
II.3.1.2	La stéréomicroscopie	- 94 -
II.3.2	L'analyse d'image.....	- 95 -
II.3.2.1	La caractérisation des images d'adhésion.....	- 95 -
II.3.2.2	La structuration des images de biofilm en développement.....	- 98 -
II.3.2.3	La quantification des prédateurs	- 99 -
II.4	La caractérisation microbiologique	- 101 -
II.4.1	L'extraction d'ADN.....	- 101 -
II.4.1.1	Le décrochage des cellules et extraction d'ADN pour l'adhésion... -	101 -
II.4.1.2	La récupération du biofilm en développement et extraction d'ADN-	101 -
II.4.2	L'amplification PCR et l'analyse CE-SSCP.....	- 102 -
II.5	Le traitement de données et analyses statistiques	- 104 -
II.5.1	Le traitement des données.....	- 104 -
II.5.1.1	Les boîtes à moustaches des travaux d'adhésion	- 104 -

II.5.1.2	Les matrices de distances des travaux sur le développement	- 104 -
II.5.2	Les analyses statistiques	- 105 -
II.5.2.1	Les analyses de variances	- 105 -
II.5.2.2	Les Analyses en Composantes Principales	- 105 -
II.5.2.3	La régression linéaire des travaux sur la prédation.....	- 106 -
III.	Résultats	- 107 -
III.1	Impact du cisaillement sur les phénomènes d'adhésion.....	- 108 -
III.1.1	Avant-propos.....	- 108 -
III.1.2	Impact of shear stress on initial bacterial adhesion in a Couette-Taylor reactor	- 111 -
III.1.2.1	Abstract.....	- 111 -
III.1.2.2	Introduction	- 112 -
III.1.2.3	Materials and methods.....	- 114 -
III.1.2.4	Results	- 120 -
III.1.2.5	Discussion.....	- 129 -
III.1.2.6	Conclusions	- 133 -
III.1.3	Discussion	- 134 -
III.2	Impact de l'histoire du biofilm sur son développement.....	- 136 -
III.2.1	Avant-propos.....	- 136 -
III.2.2	Memory effect in mature biofilms: growth history and conservation of morphology and community structure	- 139 -
III.2.2.1	Abstract.....	- 139 -
III.2.2.2	Introduction	- 140 -
III.2.2.3	Materials and methods.....	- 141 -
III.2.2.4	Results	- 146 -
III.2.2.5	Discussion.....	- 155 -
III.2.2.6	Conclusion.....	- 158 -

III.2.2.7	Supplementary materials	- 160 -
III.2.3	Discussion	- 164 -
III.3	Quantification des prédateurs mobiles dans les biofilms matures	- 166 -
III.3.1	Avant-propos.....	- 166 -
III.3.2	An automated method for the quantification of moving predators such as rotifers in biofilms by image analysis	- 168 -
III.3.2.1	Abstract.....	- 168 -
III.3.2.2	Introduction	- 169 -
III.3.2.3	Methods	- 169 -
III.3.2.4	Results and discussion	- 172 -
III.3.2.5	Conclusion	- 177 -
III.3.3	Discussion	- 178 -
III.4	Discussion générale et perspectives	- 180 -
IV.	Conclusion.....	- 187 -
	Références bibliographiques	- 191 -
	Annexes.....	- 207 -
	Annexe 1 : Modification sur le réacteur de Couette-Taylor.....	- 208 -
	Annexe 2 : Test sur l'inoculum des essais d'adhésion.....	- 210 -
	Annexe 3 : Les différents descripteurs associés à la méthode SGLDM	- 212 -
	Annexe 4 : Clichés de stéréomicroscopie obtenus lors des différents travaux	- 215 -

Liste des abréviations

ACP : Analyse en composantes principales

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analyse de variance

CE-SSCP : Electrophorèse capillaire – Polymorphisme de conformation des simples brins

CLSM : Microscopie confocale à balayage laser

CTR : Réacteur de Couette-Taylor

COD : Demande chimique en oxygène

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DCO : Demande chimique en oxygène

EPS : substances polymériques extracellulaires

FISH : hybridation in situ en fluorescence

MES : Matières en suspension

MRI : Microscopie à résonance magnétique

MSA : Matières sèches attachées

MVA : Matières volatiles attachées

MVS : Demande chimique en oxygène

OCT : Tomographie a cohérence optique

OP : Opérateur de position

PC : Composante principal

PCA : Analyse en composantes principales

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PP : Polypropylène

PVC : Polychlorure de vinyle

rpm : Rotation par minute

SEM : Microscopie électronique à balayage

SGLDM : Matrice de dépendance (ou comparaison) spatiale des niveaux de gris (Spatial gray level dependence matrix)

VSS : Demande chimique en oxygène

Liste des figures

Figure I-1: Les cinq compartiments du système biofilm _____	- 17 -
Figure I-2: Exemple de la diversité des milieux naturels colonisés par les biofilms _____	- 20 -
Figure I-3: Système de biofiltration "Biostyr" commercialisé par Veolia Water _____	- 23 -
Figure I-4: Les six étapes du cycle de vie du biofilm _____	- 23 -
Figure I-5: Exemple de la diversité morphologique d'un biofilm _____	- 26 -
Figure I-6: Les cinq processus de transport des microorganismes vers le support _____	- 29 -
Figure I-7: Modèle de l'adhésion microbienne en deux phases, l'une dite réversible, l'autre dite irréversible _____	- 33 -
Figure I-8 : Comparaison des résultats annoncés par la XDLVO (en abscisse) avec ceux obtenus expérimentalement (en ordonnée) _____	- 34 -
Figure I-9 : Les appendices bactériens permettent d'établir des contacts plus facilement avec le support _____	- 35 -
Figure I-10: Schéma illustrant la déformation d'une colonne fluide sous l'effet d'une contrainte de cisaillement _____	- 39 -
Figure I-11: Représentation du profil de vitesse et de concentration en régime laminaire _____	- 41 -
Figure I-12: Mise en évidence d'une structuration microbiologique dépendante du matériau du support. _____	- 44 -
Figure I-13: Corrélation entre l'hydrophobicité du support et l'abondance de l'adhésion _____	- 45 -
Figure I-14: Sélection et adaptation de la conformation de la cellule face au cisaillement. _____	- 46 -
Figure I-15: Changement de conformation d'une adhésion responsable de l'adhésion cisaillement-dépendante _____	- 47 -
Figure I-16: Exemple de co-adhésion à faible cisaillement (10 mPa). _____	- 49 -
Figure I-17: Design classique d'une chambre d'écoulement à lames parallèles _____	- 51 -
Figure I-18: Technique de mesure des angles de contact (ϑ) au point triple entre le liquide (L), le support (S) et la vapeur (V). _____	- 52 -
Figure I-19: Le biofilm vu comme un système biologique organisé et dynamique _____	- 56 -
Figure I-20: Illustration des phénomènes de convection et de diffusion au sein du biofilm. _____	- 59 -
Figure I-21: Stratification au sein d'un biofilm méthanogène _____	- 60 -
Figure I-22: Les différents mécanismes de décrochement du biofilm _____	- 62 -
Figure I-23: Impact du cisaillement sur la densité et l'épaisseur du biofilm. _____	- 65 -
Figure I-24: Modèle simulant l'évolution de la structure du biofilm en fonction de l'accès au substrat et de la croissance microbienne _____	- 66 -
Figure I-25 : Interconnexions entre hydrodynamique – substrat – structure du biofilm _____	- 69 -
Figure I-26 : Impact de la prédation sur la structure de biofilms membranaires. _____	- 70 -
Figure I-27 : Les différents outils d'observations des biofilms en fonction de l'échelle considérée _____	- 73 -
Figure I-28 : Objectifs et stratégie du projet de thèse _____	- 78 -
Figure II-1 : Réacteur de Couette-Taylor et caractéristiques du dispositif utilisé. _____	- 82 -
Figure II-2 : Les principaux régimes hydrodynamiques en réacteur de Couette-Taylor. _____	- 84 -
Figure II-3 : Schéma et caractéristiques des colonnes à bulles utilisées _____	- 86 -
Figure II-4 : Régimes hydrodynamiques dans les colonnes à bulles _____	- 87 -

<i>Figure II-5 : Mise en œuvre du fonctionnement continu.</i>	- 91 -
<i>Figure II-6 : Description du traitement d'image des travaux d'adhésion</i>	- 96 -
<i>Figure II-7 : Concept de la méthode SGLDM</i>	- 98 -
<i>Figure II-8 : Traitement des descripteurs issus des matrices de comparaisons.</i>	- 99 -
<i>Figure II-9 : Analyse d'image pour la quantification des organismes mobiles.</i>	- 100 -
<i>Figure II-10 : Exemple d'un profil SSCP.</i>	- 103 -
<i>Figure III-1 : Mise en évidence de la problématique des conditions hydrodynamiques sur l'adhésion microbienne-</i>	<i>108 -</i>
<i>Figure III-2: Originalité de la démarche des travaux d'adhésion</i>	- 109 -
<i>Figure III-3: SSCP profiles corresponding to the different tested conditions</i>	- 122 -
<i>Figure III-4: Variation of the three morphological parameters with shear</i>	- 123 -
<i>Figure III-5: Epifluorescence microscopic pictures.</i>	- 124 -
<i>Figure III-6: Attached bacterial communities on PP slides with shear stress for Shear 1 (A) and Shear 2 (B) experiment.</i>	- 126 -
<i>Figure III-7: Bar plots representing the surface coverage (A), the average size of particles in μm^2 (B) and the number of particles mm^2 (C)</i>	- 128 -
<i>Figure III-8: Principal Component plot performed on the bacterial communities harvested on slides</i>	- 129 -
<i>Figure III-9: Mise en évidence de la problématique de structuration des biofilms lors d'un changement dans les conditions environnementales</i>	- 136 -
<i>Figure III-10: Originalité des travaux concernant l'impact de l'histoire du biofilm</i>	- 137 -
<i>Figure III-11 : Experimental setup and operation</i>	- 143 -
<i>Figure III-12 : PC plot of both controls – constant and variable shear – for both Short Time and Long Time experiments</i>	- 147 -
<i>Figure III-13: Differences in morphology between switched biofilms and either the biofilm in the initial reactor or the receiving reactor</i>	- 150 -
<i>Figure III-14: Differences in morphology between switched biofilms and their respective initial reactor.</i>	- 152 -
<i>Figure III-15 : Differences in bacterial community between switched biofilms and either the biofilm in the initial reactor or the receiving reactor</i>	- 153 -
<i>Figure III-16 : Differences in bacterial community between switched biofilms and their respective initial reactor.</i>	- 155 -
<i>Figure III-17 : Linear correlation between gray level obtained on acquired images and dry matter harvested on slides.</i>	- 160 -
<i>Figure III-18 : PC plots of controls – constant and variable shear – and switched biofilms.</i>	- 161 -
<i>Figure III-19 : Theoretical behaviors of biofilms acquiring memory effect depending on the age of the biofilm at moment of the switch.</i>	- 162 -
<i>Figure III-20 : Mise en évidence de la problématique de la prédation dans les biofilms</i>	- 166 -
<i>Figure III-21 : Originalité de l'étude de la prédation dans les biofilms matures</i>	- 167 -

<i>Figure III-22 : Method of sampling, image acquisition and processing.</i>	_____	- 171 -
<i>Figure III-23 : Comparison of the global displacement responses in both reactors.</i>	_____	- 173 -
<i>Figure III-24 : Comparison of manually and automated methods of quantification..</i>	_____	- 174 -
<i>Figure III-25 : Impact of the filtering step of the correlations</i>	_____	- 176 -
<i>Figure III-26 : L'évolution des phénomènes de structuration du biofilm au cours de son cycle de vie</i>	_____	- 182 -
<i>Figure A-1 : Mise en évidence de l'effet du rayon externe sur le cisaillement.</i>	_____	- 208 -
<i>Figure A-2 : Description des essais réalisés sur la décantation et l'alimentation des boues activées servant d'inoculum.</i>	_____	- 210 -
<i>Figure A-3 : Résultats des essais d'enrichissement de l'inoculum sur la microscopie à épifluorescence.</i>	_____	- 211 -
<i>Figure A-4 : Images acquises par stéréomicroscopie lors des travaux sur les biofilms matures et la prédation.</i>	_____	- 215 -
<i>Figure A-5 : Images acquises par stéréomicroscopie lors des travaux sur l'histoire des biofilms.</i>	_____	- 215 -
<i>Figure A-6 : Quelques photographies de stéréomicroscopie (en fond clair pour A et B ou fond noir pour C,D,E) représentatives des biofilms obtenus au cours des différents travaux.</i>	_____	- 217 -

Liste des tableaux

<i>Tableau I-1: Composition typique d'un biofilm bactérien.</i>	- 19 -
<i>Tableau I-2: Les quatre types de comportements sociaux au sein des biofilms.</i>	- 27 -
<i>Tableau I-3: Nombre de Reynolds et écoulements associés pour deux systèmes hydrauliques.</i>	- 38 -
<i>Tableau I-4: Quelques exemples de contraintes de cisaillement</i>	- 43 -
<i>Tableau II-1: Bilan de l'étude bibliographique sur les CTR</i>	- 84 -
<i>Tableau II-2 : Synthèse des paramètres hydrodynamiques opérés</i>	- 88 -
<i>Tableau III-1: Characterization of the two materials used as substrata.</i>	- 114 -
<i>Tableau III-2: Description of the different experiments carried out.</i>	- 119 -
<i>Tableau III-3: Coefficients of variation based on four slides of each material (PP and PVC) per condition (i.e. shear stress).</i>	- 121 -
<i>Tableau III-4 : Results, as p-values, of variance analysis of bacterial communities between the two controls – constant and variable shear</i>	- 148 -

INTRODUCTION

Dans la nature, les microorganismes peuvent se retrouver sous deux formes : planctonique ou fixée. Dans le cas de microorganismes planctoniques, ceux-ci sont libres et en suspension dans un milieu liquide. Le second mode de vie correspond à une forme fixée des microorganismes qui sont alors adhérents à un support et plus ou moins intégrés dans une matrice de substances extracellulaires. Cette seconde forme, appelée biofilm, représente le mode de vie microbien majoritaire dans la plupart des écosystèmes aquatiques. Cette tendance prédominante à vivre sous forme fixée et organisée en biofilm témoigne de l'intérêt crucial que ces microorganismes y trouvent. Ce mode de vie confère une meilleure résistance face aux agressions de l'environnement, par exemple des agressions chimiques par des acides, bases ou des antibiotiques ou encore des agressions biotiques, tels que des virus. Ce faisant, il permet de coloniser un milieu de manière plus durable. De plus, grâce à sa structuration spatiale, différents habitats peuvent se créer au sein même de cette organisation biologique qu'est le biofilm. Cette diversité de conditions environnementales peut également permettre de pérenniser le temps de résidence dans le milieu considéré.

Comme pour décrire un paysage, un biofilm peut être caractérisé par sa topologie, que l'on appellera alors morphologie, et par les populations qui le composent, ici sa composition microbiologique. De nombreux paramètres, plus ou moins en interaction, vont participer à la structuration du biofilm, et ce depuis la première étape, l'adhésion microbienne, jusqu'au biofilm mature. Les conditions hydrodynamiques vont, par exemple, influencer l'accès au support par les microorganismes ou encore exercer des contraintes plus ou moins fortes sur le biofilm se traduisant par des phénomènes de détachement. Ces mêmes paramètres d'écoulement vont aussi influencer sur la distribution du substrat au sein du biofilm, ceci se traduisant par des structures architecturales variées et des phénomènes de compétition entre les populations microbiennes. D'autres facteurs comme la prédation et l'histoire même du biofilm jouent aussi un rôle primordial dans sa structuration morphologique et microbiologique, notamment lors de son développement et de sa maturation.

Dans les milieux anthropisés, deux types de biofilms sont distingués selon que leur action est néfaste ou bénéfique. Les biofilms sont dits négatifs lorsque leur apparition est indésirable et leur impact préjudiciable. Ils sont retrouvés notamment dans les domaines de la santé où ils sont responsables de maladies infectieuses, ou dans diverses industries (ex : agro-alimentaires, papetières) où ils sont responsables de risques sanitaires et pertes économiques. Cependant, dans certains cas, l'homme a mis les biofilms à son service et a su en faire un outil précieux :

on parle alors de biofilms positifs. Ils sont par exemple bénéfiques dans certains domaines de l'environnement où ils peuvent être utilisés pour traiter l'eau, les déchets ou encore dépolluer les sols. Une meilleure compréhension de ce système biologique peut ainsi permettre à la fois, dans le cas de biofilms négatifs, de prévenir son développement et limiter ses conséquences mais aussi d'améliorer les performances de procédés et d'optimiser le fonctionnement des biofilms positifs.

Les deux types de structures, morphologique et microbiologique, ont toutes deux une importance capitale quant à l'activité du biofilm, qu'il soit positif ou négatif. Dans le domaine médical, la présence d'un biofilm constitue déjà un problème en soi mais sa composition microbiologique, si par exemple il s'agit de bactéries pathogènes et infectieuses, est une question essentielle. La même problématique vaut pour les industries agro-alimentaires. Dans le cas de biofilms positifs, la composition microbiologique est tout aussi importante. Les capacités épuratoires pour une pollution donnée ne sont pas les mêmes d'une population bactérienne à l'autre. D'autre part, la maîtrise de la structure morphologique est déterminante. Par exemple dans des procédés de type échangeur thermique ou filtration membranaire, un biofilm que l'on arrive à maintenir fin et peu étendu sera moins problématique, les risques de colmatage étant maîtrisés.

C'est donc dans ce contexte que ce projet de thèse trouve son sens. L'objectif général de ces travaux est d'approfondir la connaissance des phénomènes régissant la structuration des biofilms. Une meilleure compréhension de ces mécanismes doit permettre d'appréhender le système biofilm avec plus de pertinence. La morphologie et la composition microbiologique sont deux descripteurs essentiels pour le contrôle et la gestion de l'activité des biofilms. Ces structures sont la résultante de divers événements qui entrent en action dès les phénomènes d'adhésion des microorganismes sur le support et le resteront tout au long de la vie du biofilm. Cette problématique s'avère pertinente aussi bien pour les biofilms néfastes que pour les biofilms bénéfiques. La logique de cette étude vise à s'intéresser à la structure des biofilms aux différentes étapes de son cycle de vie que sont l'adhésion, le développement et la maturation. Pour chaque cas, le travail s'est concentré sur un paramètre clé de la structuration du biofilm.

Pour répondre à ce questionnement, le manuscrit s'articule en plusieurs chapitres. Tout d'abord une synthèse bibliographique permet de faire un état de l'art sur les phénomènes de

structuration des biofilms. Les différentes étapes du cycle de vie du biofilm sont passées en revue. A la lumière de cette synthèse, les objectifs de cette thèse sont précisés. S'en suit un chapitre détaillant le matériel utilisé et les méthodologies adoptées pour réaliser cette étude. Une section présentant les résultats y fait suite. Celle-ci se divise en trois sous chapitres, chacun ayant un objectif lié à une étape du cycle de vie du biofilm et un paramètre structurant :

- déterminer l'impact des conditions hydrodynamiques et de la contrainte de cisaillement sur les phénomènes d'adhésion,
- analyser l'influence de l'histoire du biofilm sur l'évolution et le développement de ses structures morphologique et microbiologique,
- être capable de quantifier les prédateurs mobiles responsables de la structuration des biofilms matures.

Ces résultats sont présentés sous forme d'articles scientifiques, chacune de ces trois parties étant composée d'un article. Afin d'améliorer la cohérence du manuscrit et d'en rendre sa lecture plus agréable, chaque article est précédé d'un avant-propos et suivi par une discussion en français. Enfin pour clore l'ouvrage, une conclusion générale est donnée et des perspectives de recherche sont proposées.

Ces travaux de recherche ont été effectués au sein du Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRA de Narbonne. L'étude s'insère essentiellement dans les thématiques de recherche de l'Objet Thématique « Biofilms mixtes en réacteur » avec néanmoins une forte collaboration avec l'Objet Thématique « Ecologie Microbienne et Biodiversité ». Le financement de cette thèse a été assuré par l'Université de Montpellier II sous forme d'un contrat doctoral et sous la tutelle de l'école doctorale Sciences des Procédés – Sciences des Aliments.

I.SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Cette section vise à replacer le travail de thèse dans l'ensemble des connaissances déjà accessibles et dans un contexte plus large. Dans une première partie, les généralités concernant les biofilms, leur composition, leur cycle de vie et leur structuration sont présentées. Tous les outils de compréhension et connaissances basiques permettant la bonne lecture du sujet sont livrés dans ces paragraphes.

La seconde partie se concentre sur la problématique de l'adhésion microbienne. Cette étape constitue le point de départ de la formation du biofilm et a focalisé une partie importante des travaux présentés. La théorie régissant les mécanismes d'adhésion ainsi que les techniques d'étude sont donc explicitées. Les facteurs clés influençant les structures morphologique et microbiologique sont détaillés, notamment les conditions hydrodynamiques, facteur privilégié dans notre étude.

La troisième partie se concentre sur le développement et la maturation du biofilm. Construite sur la même logique que la partie précédente, les paramètres cruciaux de structuration et leur mode d'action sont détaillés. Les approches expérimentales rencontrées dans la littérature scientifique y sont aussi évoquées.

Enfin la dernière partie est un rappel des objectifs de ce projet de thèse. Les enjeux et intérêts de ces travaux sont donc mis en relief et replacés dans l'état de l'art global de la problématique de structuration des biofilms.

I.1 Le biofilm : sa vie, son œuvre

I.1.1 Généralités sur les biofilms

I.1.1.1 Définition

Tel que défini par Characklis and Marshall (1990), un biofilm est constitué de cellules immobilisées sur un support et généralement ancrées dans une matrice de polymères organiques d'origine microbienne. Ce terme de « biofilm » apparaît pour la première fois dans un article scientifique en 1975 dans la revue *Microbial Ecology* (Mack et al., 1975). Si le terme existe depuis une quarantaine d'années seulement, les biofilms quant à eux représentent un mode de vie bactérien bien plus ancien, retrouvé notamment dans des fossiles vieux de plus de 3,3 milliards d'années (Hall-Stoodley et al., 2004). Ainsi, à la différence des bactéries dites planctoniques, c'est-à-dire libres et en suspension dans un milieu liquide, un biofilm est un regroupement plus ou moins dense et organisé d'individus sur un support solide. Avec plus de 99% des espèces bactériennes capables de s'organiser sous forme de biofilm, ce mode de vie est omniprésent au sein des procaryotes (Costerton et al., 1987). Preuve de l'avantage stratégique que ce mode de vie confère, la majorité des bactéries dans les milieux naturels se retrouve sous forme de biofilms (Costerton et al., 1978).

De manière simplifiée, cinq compartiments définissent et interagissent avec le biofilm : le support, le biofilm basal, le biofilm de surface, la phase liquide dans laquelle le biofilm est immergé, la phase gazeuse (Characklis and Marshall, 1990). Ils sont représentés sur la Figure I-1.

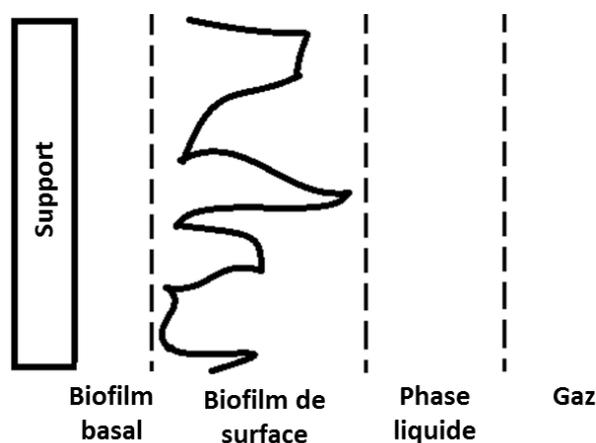


Figure I-1: Les cinq compartiments du système biofilm (Characklis and Marshall, 1990)

Le support constitue la phase solide sur laquelle les microorganismes vont s'adhérer. Il peut être lui-même mobile ou fixe. Dans certains cas, ce support est fait de matières inertes issues de la dégradation et minéralisation de microorganismes : il s'agit d'un biofilm autoporté communément appelé granule (Liu and Tay, 2002). Le biofilm basal est une couche de faible épaisseur, celle la plus proche du support. Ces propriétés en termes de composition microbiologique, composition des polymères de la matrice, cohésion, densité sont généralement sensiblement différentes à celles du biofilm pris dans son ensemble (Besemer et al., 2009a; Derlon et al., 2008; Ras et al., 2013; Rochex et al., 2009). Le biofilm de surface quant à lui peut présenter des architectures diverses : des microcolonies séparées par des canaux, des streamers, des bouquets de protozoaires... (Böhme et al., 2009; Rusconi et al., 2011; Stewart, 2012). Il est beaucoup plus sujet aux agressions que le biofilm basal, notamment la prédation, le détachement, l'érosion ou l'action de produits chimiques. La phase liquide est en contact direct avec le biofilm. Grâce aux phénomènes de convection et de diffusion, elle permet aux microorganismes d'accéder à des substances solubles indispensables à leur croissance. De la même manière, elle est aussi le vecteur des produits chimiques et antibiotiques s'attaquant aux biofilms. La phase liquide permet en outre d'alimenter le biofilm en gaz dissous issus du dernier compartiment, la phase gaz. Les échanges gazeux se font en effet généralement par l'intermédiaire de la phase liquide. Ces échanges vont dans les deux sens, par exemple pour un biofilm phototrophe, l'oxygène est apporté et le dioxyde de carbone évacué.

1.1.1.2 Composition

Concernant plus précisément les compartiments purement biologiques (biofilm basal et de surface), un biofilm est principalement constitué de microorganismes pris dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (EPS) secrétées par les dits microorganismes. Sa composition globale est détaillée dans le Tableau I-1.

Les biofilms sont essentiellement constitués d'eau. Les microorganismes, qu'ils soient procaryotes, protozoaires ou métazoaires, et la matrice d'EPS ne représentent que quelques pourcents de la masse totale. Néanmoins, la matrice seule peut représenter jusqu'à 50 à 90% du carbone organique total du biofilm (Bakke et al., 1984). Les EPS qui composent la matrice sont déterminantes pour l'acquisition de la structure morphologique. Elles confèrent notamment aux biofilms leur densité et leur force de cohésion interne et donc leur résistance

aux phénomènes de détachement. Leur composition est très variable, puisqu'elle dépend des microorganismes qui les produisent mais aussi de signaux environnementaux qui vont générer des métabolismes et des communications intercellulaires qui influencent leur synthèse (Liu and Tay, 2002; Stoodley et al., 2002).

Composés		Fraction	
Eau		87 à 99%	
Bactéries		1 à 2%	
EPS	Polysaccharides	2 à 5%	40 à 95%
	Protéines		<1 à 60%
	Acides nucléiques		<1 à 10%
	Lipides		<1 à 40%

Tableau I-1: Composition typique d'un biofilm bactérien. (Characklis and Marshall, 1990; Flemming and Wingender, 2001)

I.1.1.3 Avantages du mode de vie biofilm

L'organisation sous forme de biofilm présente des avantages significatifs par rapport aux bactéries planctoniques. Comme rapporté par Hall-Stoodley et al. (2004), le développement sur un support solide permet d'apporter une certaine stabilité dans les paramètres environnementaux, facilitant ainsi la croissance bactérienne. De plus, cette organisation permet de se prémunir contre divers dangers environnementaux tels que l'exposition aux UV, la présence d'éléments toxiques (métaux, acides, antibiotiques...), la salinité, la déshydratation ou encore la phagocytose et la présence de virus. En effet la matrice joue le rôle de barrières chimique et physique, limitant l'accès de potentielles agressions à l'ensemble de la population. Cependant, il est à noter que ces mêmes propriétés peuvent être responsables d'une limitation de l'accès aux substrats au sein des couches inférieures du biofilm. En outre, plusieurs états physiologiques des cellules peuvent être trouvés au sein d'un même biofilm. Chaque état pouvant avoir une sensibilité différente à l'agression donnée (notamment certaines cellules dites dormantes peuvent présenter une résistance accrue aux antibiotiques), cette diversité garantit la pérennité de la colonisation microbienne (Walters et al., 2003). Au-delà de cette diversité physiologique, on trouve dans les biofilms matures une diversité de micro-habitats permettant la recrudescence d'une large variété de métabolismes et/ou d'espèces (Battin et al., 2007; Ohashi et al., 1995; Rochex et al., 2008; Stoodley et al., 2002). Là encore, par ses différents degrés d'organisation et de variabilité, le biofilm assure une colonisation durable et robuste de son milieu. Enfin les différents phénomènes de dispersion,

qu'ils soient actifs via la motilité microbienne ou passifs via les forces exercées par le fluide, permettent aux microorganismes de coloniser de nouveaux milieux (Hall-Stoodley et al., 2004). Ainsi ces arguments expliquent l'avantage stratégique d'une organisation en biofilm par rapport à une configuration planctonique et donc l'ubiquité de ce mode de vie.

1.1.2 Les biofilms, un système biologique omniprésent

1.1.2.1 Les biofilms en milieu naturel

Les biofilms sont en effet omniprésents dans les environnements naturels. Bactériens, fongiques, algaux ou en communauté mixte, les biofilms sont retrouvés dans une très grande variabilité de milieux et sont des acteurs à part entière de l'écosystème auquel ils appartiennent (Besemer et al., 2007; Stoodley et al., 2002). La Figure I-2 témoigne de la capacité des biofilms à s'installer dans des milieux aux conditions environnementales très diverses. Que cela soit en termes de pression, de température ou de substrat, les biofilms ont su coloniser durablement des milieux même a priori peu enclins au développement d'un écosystème.

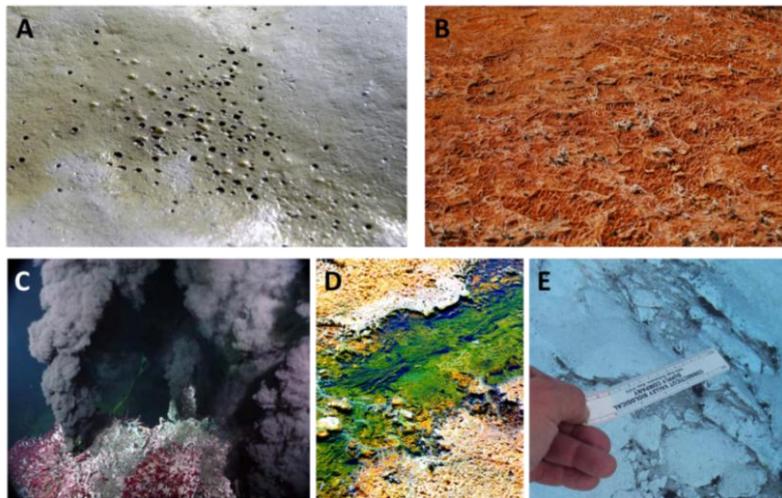


Figure I-2: Exemple de la diversité des milieux naturels colonisés par les biofilms.

Biofilm anaérobie structuré par des bulles de méthane sur une vase. (B) Biofilm constitué de bactéries thermophiles dans des sources chaudes (C) Mont hydrothermal océanique sur lesquelles des biofilms se forment. (D) Biofilm algal de rivière. (E) Biofilm de ruisseau dans un glacier

Lorsqu'ils sont trouvés dans un environnement anthropisé, ils sont dits négatifs ou positifs selon que leurs impacts soient respectivement néfastes ou bénéfiques.

I.1.2.2 Les biofilms « négatifs »

Un biofilm peut être dit négatif pour différentes raisons. Tout d'abord dans le milieu médical, les biofilms peuvent être responsables de maladies infectieuses (Costerton et al., 1987). Ils peuvent se développer sur les équipements médicaux tels que des lentilles de contact (Andrews et al., 2001), des prothèses et implants (Yu et al., 2012), des outils chirurgicaux (Busscher and van der Mei, 2006; Hall-Stoodley et al., 2004). Ils sont ainsi à l'origine de la plupart des maladies nosocomiales et leurs conséquences peuvent être fatales pour les patients touchés. Ils se retrouvent aussi directement sur certains organes comme les poumons ou la bouche (Bos et al., 1995; Ojima et al., 1998; Park et al., 2011). L'étude des biofilms est donc fondamentale pour prévenir le développement de certaines maladies.

Dans les milieux industriels, les biofilms négatifs peuvent là encore être la source de problèmes sanitaires graves. Dans les secteurs agroalimentaires, un développement de biofilms pathogènes sur des produits destinés à la consommation est un risque majeur. Des maladies telles que la listériose ou la salmonelle sont dues aux développements bactériens sur des denrées alimentaires (Mangalappalli-Illathu et al., 2008; Meylheuc et al., 2006). De la même manière, les réseaux de distribution en eau potable peuvent être sujets à la croissance de biofilms (Gagnon and Slawson, 1999; Revetta et al., 2013).

Non seulement sanitaires, les conséquences de la présence de biofilms peuvent être économiques. Dans les milieux industriels, un développement de biofilm peut engendrer des pertes de performance de procédés. A titre d'exemple, un biofilm qui se développe dans un échangeur thermique, dans un procédé membranaire ou dans une conduite qu'il va corroder, peut perturber le bon fonctionnement du système (Brugnoni et al., 2011; Habimana et al., 2014). De nombreux travaux s'intéressent à la prévention de la formation de biofilms et au nettoyage d'installations industrielles colonisées (Brugnoni et al., 2012; Florjanič and Kristl, 2011; Lelièvre et al., 2002).

I.1.2.3 Les biofilms « positifs »

Les biofilms jouent aussi un rôle positif pour notre santé. La surface de notre peau est recouverte d'un biofilm dont la présence engendre une compétition microbienne rendant plus difficile la colonisation par des organismes pathogènes (Percival et al., 2012). Les biofilms gastro-intestinaux assurent également un rôle de protection et participent au processus de digestion (Macfarlane et al., 2011).

De plus, les biofilms peuvent s'avérer être des outils biotechnologiques d'un intérêt majeur. Leur usage est reconnu pour la restauration de sols pollués notamment par les hydrocarbures: on appelle cette technologie la bioremédiation. Ils sont aussi très couramment utilisés dans le traitement des eaux usées, que celui-ci se fasse en conditions aérobies, anoxiques ou encore dans le cadre d'un procédé de méthanisation (Derlon et al., 2012; Elenter et al., 2007; Habouzit et al., 2011; Martin and Nerenberg, 2012). De manière plus générale, les procédés à biofilms présentent de nombreux intérêts comparativement à des procédés de type boues activées (Lazarova and Manem, 1995; Nicolella et al., 2000). Leur résistance aux composés toxiques et leur capacité à résister à des fluctuations en ressources en font une technologie robuste. De plus, le fait que les microorganismes soient fixés à un support solide permet de grandement faciliter le traitement aval de séparation entre le liquide et la flore épuratoire. Pour cette même raison, une rétention de biomasse est possible, les concentrations en biomasse bactérienne peuvent être largement augmentées et les micro-organismes à faibles taux de croissance (ex : Archées dans les procédés de digestion anaérobie) peuvent être retenus. De plus, comme évoqué précédemment, l'organisation de biofilms multi-espèces en plusieurs microhabitats va permettre de traiter plus efficacement différentes pollutions au sein du même réacteur.

La Figure I-3 représente le fonctionnement d'une technologie d'assainissement à biofilm : la biofiltration ou Filtre Biologique Aéré (BAF). Cette technologie à lit fixe consiste à faire croître un biofilm sur un matériau filtrant. L'eau à traiter va passer en flux ascendant au travers de ce matériau. La dépollution soluble est donc concomitante à la dépollution particulaire.

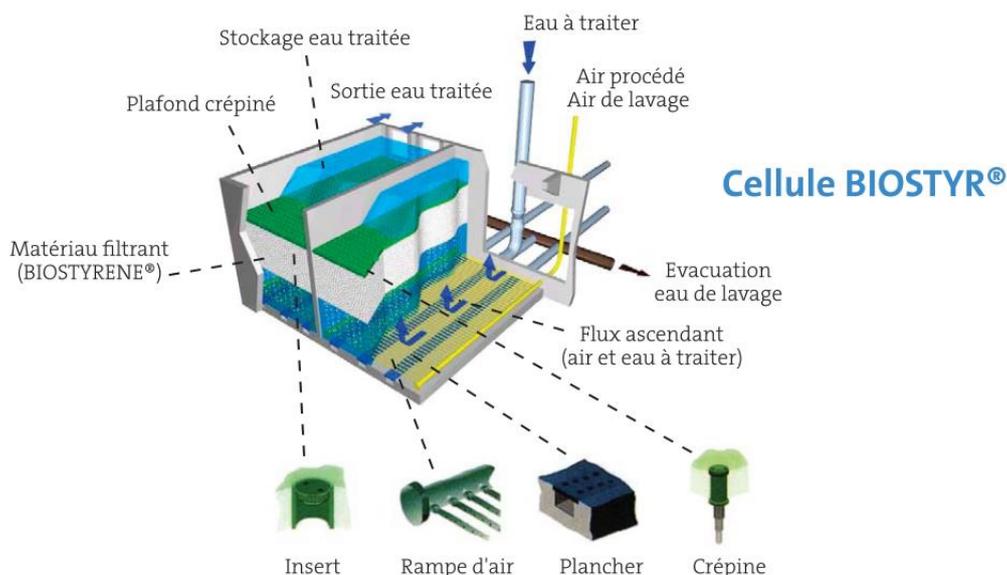


Figure I-3: Système de biofiltration "Biostyr" commercialisé par Veolia Water

Ainsi qu'ils soient acteurs à part entière d'un écosystème naturel, subis ou encore mis à profit par l'homme, les biofilms arborent une certaine ubiquité. L'omniprésence de ce système biologique s'explique par un cycle de développement organisé et différencié en étapes distinctes.

1.1.3 Le cycle de vie du biofilm

Le cycle de développement du biofilm peut se décomposer schématiquement en six étapes comme représenté sur la Figure I-4 (Characklis and Marshall, 1990; Liu and Tay, 2002). Cependant, si l'ensemble de ces étapes permet de mieux se représenter la formation d'un biofilm, dans les faits certaines sont concomitantes et peuvent intervenir à différents moments dans le cycle global de développement du biofilm.

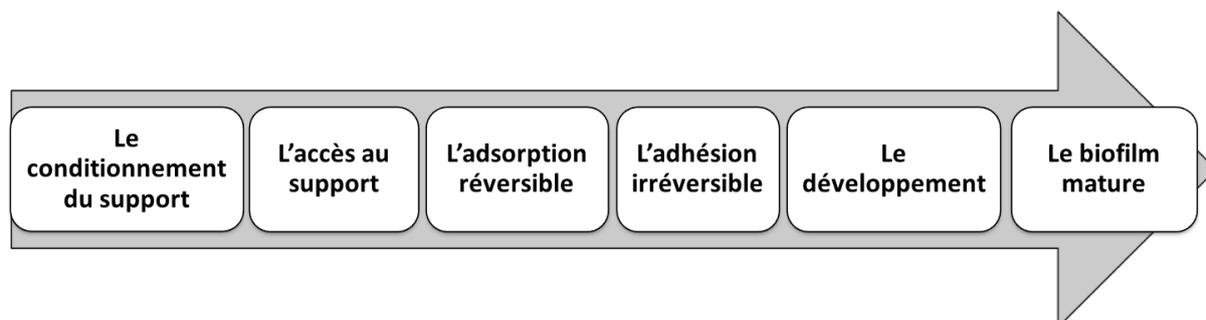


Figure I-4: Les six étapes du cycle de vie du biofilm

La première étape est le conditionnement du support. Elle n'implique pas directement les microorganismes mais va jouer un rôle essentiel pour les étapes suivantes d'adhésion. Il s'agit d'un phénomène physico-chimique quasi-instantané qui apparaît au moment où le support et la phase liquide entrent en contact. Des molécules, généralement des glycoprotéines et des polysaccharides, vont s'adsorber sur la surface de support pouvant modifier certaines de ces propriétés, notamment l'énergie de surface (Characklis and Marshall, 1990).

La seconde étape est l'accès au support. Pour qu'un biofilm se crée, il faut tout d'abord un contact préalable entre microorganisme et support. Le transport du microorganisme de la phase liquide vers la surface du support peut se faire par plusieurs moyens tels que les forces hydrodynamiques de convection, le transport diffusif, suivant la gravité, les mouvements Browniens ou encore la motilité propre de certains microorganismes (Liu and Tay, 2002). Une fois ce premier contact établi, l'adhésion à proprement parler peut avoir lieu.

L'adhésion microbienne peut se diviser en deux étapes distinctes : l'adsorption réversible et l'adhésion irréversible (Characklis and Marshall, 1990; Stoodley et al., 2002; Wang et al., 2011). L'adsorption réversible met en jeu des forces d'interaction différentes, notamment les forces de London-van der Waals, les interactions électrostatiques et les interactions de Lewis. L'ensemble est modélisé par la théorie dite XDLVO (van Oss, 1995; Wang et al., 2011). Suite à cette adsorption, deux évolutions sont possibles : soit le microorganisme est désorbé et retourne dans la phase liquide, soit il parvient à rester fixé et passe donc à l'étape d'adhésion irréversible.

L'adhésion irréversible se fait au moyen de deux mécanismes principaux. On observe d'une part la multiplication des liaisons faibles (type liaisons de van der Waals, liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes) dont le nombre compense le niveau d'énergie (Characklis and Marshall, 1990). D'autre part, il apparaît des ponts polymériques entre d'un côté les divers appendices, flagelles et pili et les EPS secrétées par la cellule, et de l'autre le support conditionné. Ainsi les microorganismes sont capables de se fixer de manière ferme et durable sur le support. Notons ici que les trois précédents processus, l'accès au support, l'adsorption réversible et l'adhésion irréversible seront détaillés dans la section I.2.

Intervient ensuite l'étape de développement du biofilm. Stoodley et al. (2002) rapporte qu'il existe trois mécanismes. Le premier est le regroupement via la motilité cellulaire de microorganismes déjà adhérents sur le support. Le second phénomène consiste en la division et

croissance de cellules déjà fixées. Le troisième processus évoqué est l'apport permanent de cellules venues de la phase liquide qui viennent s'adhérer sur le biofilm. Ces trois mécanismes, dont les contributions peuvent varier en fonction des espèces et des conditions environnementales, sont à la base du développement et de l'accumulation de microorganismes sur le support. Cette étape est aussi caractérisée par une production importante d'EPS qui va donner au biofilm sa matrice. Des changements métaboliques et des communications intercellulaires peuvent aussi se mettre en place et participent à la structuration du biofilm (Liu and Tay, 2002).

Enfin un biofilm mature est formé. Il a acquis une morphologie et une communauté microbienne matures. L'ensemble est cependant toujours dynamique. En effet l'état de maturité et stabilité macroscopique du biofilm est en réalité l'équilibre de plusieurs processus méso- et microscopiques. La mort cellulaire et les phénomènes de détachement sont contrebalancés par la croissance et les adhésions permanentes de nouveaux microorganismes. Les décrochements de biofilms vont par ailleurs permettre un réensemencement des milieux avoisinants. Diverses niches écologiques se forment au sein du biofilm. Les étapes de développement et de maturation du biofilms sont abordées de manière plus approfondie dans la section I.3.

Le cycle de développement du biofilm peut être simplifié en ces quelques étapes. La structuration morphologique et microbiologique des biofilms va être la résultante des divers phénomènes apparaissant lors de son développement.

1.1.4 Introduction aux diversités structurelles des biofilms

Cette partie a pour simple objectif de montrer au lecteur la complexité et la variété des structures morphologiques et microbiologiques d'un biofilm. Cette richesse explique à la fois l'intérêt mais aussi la difficulté de l'étude du système biofilm. Comme le propose Battin et al. (2007), le biofilm peut être considéré comme un paysage microbien. Sa description repose donc sur deux caractéristiques. La première est la topologie ou morphologie du biofilm. Il s'agit de son architecture, de son agencement spatial. Ces paramètres morphologiques sont aussi liés à des paramètres physiques comme la densité, l'épaisseur, la porosité ou la rugosité du biofilm. Le second paramètre pour décrire ce paysage microbien est la population qui l'habite, en d'autres termes, la composition de la communauté microbienne et sa distribution

spatiale. Différentes souches de bactéries, d'archées, de protozoaires, de métazoaires peuvent coexister au sein d'un biofilm. En regard de ces deux types de structures, le biofilm peut être décrit de manière complète et détaillée.

La Figure I-5 dénote la richesse morphologique des biofilms, des structures très différentes pouvant apparaître au sein d'un même biofilm.

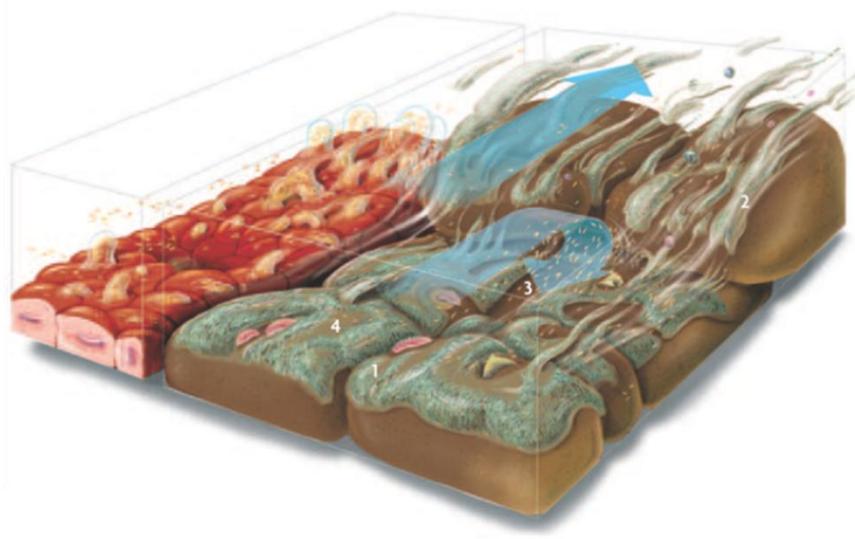


Figure I-5: Exemple de la diversité morphologique d'un biofilm (Battin et al., 2007)

A gauche un biofilm colonisant un épithélium pulmonaire, à droite un biofilm naturel en milieu sédimentaire. (1) Biofilms relativement homogènes. (2) Développement de structures filamenteuses appelées « streamers ». (3) Dispersion et adhésion de microorganismes influencées par la topologie même du biofilm. (4) Prédation de protozoaires responsables d'hétérogénéités morphologiques

Sur la gauche de la figure, on observe un biofilm globalement hétérogène constitué d'une succession d'agrégats en forme de doigt ou de champignon (structure dite « finger-like » ou « mushroom ») (Monds and O'Toole, 2009; Picioreanu et al., 1998; van Loosdrecht et al., 2002). Sur la droite de la figure, un biofilm naturel est représenté. Au premier plan, il s'agit d'un biofilm relativement homogène. Des protozoaires ou métazoaires mobiles se déplaçant dans le biofilm peuvent cependant venir y créer des canaux, séparant des microcolonies, augmentant sa porosité et sa rugosité (Böhme et al., 2009; Derlon et al., 2012). Des structures filamenteuses appelées streamers peuvent aussi apparaître (Rusconi et al., 2011; Stoodley et al., 1998). Leur forme particulière leur permet d'accéder à la zone convective de l'écoulement. Ces différentes structures vont aussi générer des conditions hydrodynamiques

locales variées, elles-mêmes influençant la morphologie du biofilm. Qu'elle soit temporelle ou spatiale, une diversité architecturale très riche existe au sein des biofilms.

De même, il peut exister des profils de communauté microbienne très variés. Tout d'abord, procaryotes, protozoaires, métazoaires peuvent tous être présents. Les métazoaires comme les rotifères et les nématodes peuvent en effet se maintenir dans la matrice extracellulaire où ils trouvent de quoi se nourrir. Un biofilm peut aussi être multi-espèce, c'est-à-dire être un consortium, une communauté microbienne faite d'espèces différentes, ou il peut être constitué d'une seule et unique souche, quitte à ce qu'elle présente des phénotypes et des métabolismes différents comme le soulignent Losick and Desplan (2008). Certaines règles d'écologie régissent les relations sociales au sein d'un biofilm et peuvent permettre d'expliquer les structures microbiennes constatées (Nadell et al., 2009). Le Tableau I-2 résume les quatre comportements fondamentaux. Il est distingué l'acteur, microorganisme à la base de l'échange sociale, et le destinataire, ensemble des bactéries environnantes. Selon que l'impact des échanges soit bénéfique ou nuisible à l'un et/ou l'autre, on identifie le mutualisme, l'égoïsme, l'altruisme et la malveillance. Si une bactérie produit une molécule, un substrat par exemple, qui profite à l'ensemble de la communauté alors il s'agit d'un comportement mutualiste. Si la synthèse de cette molécule diminue le taux de croissance de la souche qui la produit, il s'agit alors d'altruisme. Certaines bactéries ont aussi la capacité de synthétiser des molécules qui vont diminuer la capacité d'adhésion d'autres bactéries (Meylheuc et al., 2006) ou encore des molécules antimicrobiennes (West et al., 2007). Ce sont des exemples d'égoïsme et de malveillance. Ainsi en fonction des interactions entre l'ensemble des protagonistes, différentes structures peuvent émerger avec tantôt des diversités importantes ou au contraire des systèmes dominés par une ou deux espèces.

		Effet sur le destinataire	
		+	-
Effet sur l'acteur	+	Mutualisme	Egoïsme
	-	Altruisme	Malveillance
		Coopération	Compétition

Tableau I-2: Les quatre types de comportements sociaux au sein des biofilms. (Nadell et al., 2009)

Maintenant que les bases du développement du biofilm et les éléments de sa structuration morphologique et microbiologique sont posées, les parties suivantes vont s'intéresser plus précisément à certaines étapes de ce cycle de développement. Les processus impliqués dans les étapes d'adhésion et celles du développement et de la maturation sont évoqués de manière plus détaillée. Les aspects de structuration et les paramètres influents sont aussi approfondis.

I.2 L'adhésion microbienne

I.2.1 La théorie de l'adhésion microbienne

Comme mentionné précédemment, nous allons distinguer trois étapes dont le déroulement mène à la formation d'un biofilm : l'accès au support par le microorganisme, son adsorption réversible et en dernier lieu son adhésion irréversible.

I.2.1.1 L'accès au support

L'enjeu de cette étape n'est pas encore de créer un contact, un attachement avec le support mais simplement pour le microorganisme de se rapprocher du support et d'arriver à une proximité suffisante qui permettra, en second lieu, l'établissement de liaisons faibles. Les considérations de contact et de première adhésion apparaissent donc après cette phase d'approche.

Liu and Tay (2002) distinguent cinq moyens dont les microorganismes disposent pour accéder au support : les forces hydrodynamiques, les mécanismes de diffusion, les mouvements Browniens, la gravité (sédimentation), et enfin la motilité propre des cellules (Figure I-6).

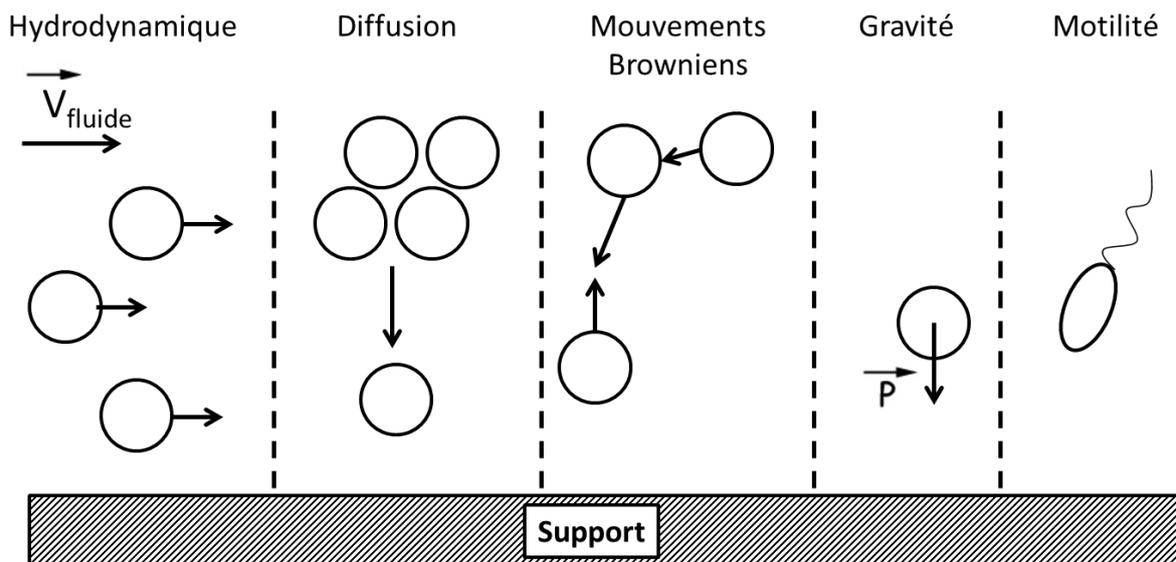


Figure I-6: Les cinq processus de transport des microorganismes vers le support

Les forces hydrodynamiques permettent le transport convectif des microorganismes en suspension dans le fluide. La vitesse du fluide va entraîner les particules et les mouvements de convection vont permettre un mélange efficace de cette phase. En fonction du régime d'écoulement, le transfert de masse est plus ou moins important. La diffusion est un processus majeur dans l'accession par les microorganismes au support. Régit par la loi de Fick, ce processus permet l'homogénéisation naturelle des concentrations en microorganismes au sein du milieu liquide. Ces forces sont prépondérantes à proximité du support où la convection n'est plus effective. Les mouvements Browniens sont les mouvements aléatoires que des microorganismes en suspension vont suivre suite aux collisions qu'ils vont subir. Les collisions entre les particules, libérant de l'énergie, vont les mettre en mouvement et l'accès au support sera rendu possible. Les forces gravitaires peuvent aussi intervenir. Dans le cas de milieux stagnants et non mélangés, les microorganismes dépourvus d'une motilité propre sédimentent et finissent ainsi par atteindre un support solide sur lequel se fixer. Enfin, la motilité peut jouer un rôle majeur dans l'accessibilité au support. Certains microorganismes sont pourvus de flagelles, pili ou autre appendices leur permettant de se déplacer.

Si l'ensemble des cinq processus décrits précédemment peut être effectif, ce sont essentiellement les conditions hydrodynamiques qui vont déterminer la contribution de chacun d'eux (Characklis and Marshall, 1990). Dans un régime rampant, où les interactions visqueuses sont supérieures aux forces d'inertie et où les forces convectives sont négligeables, les phénomènes de transport se font par sédimentation, collisions entre les particules (mouvements Browniens) et motilité des cellules le cas échéant. Pour les régimes laminaire et turbulent, ce sont la diffusion et les forces convectives qui vont assurer l'essentiel du transfert de masse. La contribution de chacun de ces deux processus va fluctuer. En régime laminaire, la force de diffusion occupe un rôle beaucoup plus important qu'en régime turbulent. A l'inverse un régime turbulent est caractérisé par des écoulements multidirectionnels assurant un meilleur mélange et un transport convectif prépondérant.

1.2.1.2 L'adsorption réversible

L'adsorption réversible est le premier contact entre le microorganisme et le support. La distance entre ces deux compartiments étant considérablement réduite grâce au transfert de masse, une première interaction va pouvoir être établie. Cette interaction est dans un premier temps de faible énergie et ne résulte pas toujours en un attachement ferme et définitif. Si la

cellule n'est pas désorbée et qu'elle dispose du temps et des moyens moléculaires nécessaires, alors elle pourra établir une liaison dite irréversible.

Deux théories, la DLVO et la XDLVO, vont permettre de décrire les phénomènes qui interviennent dans ce processus d'adsorption réversible. Toutes deux n'ont pas été initialement imaginées pour l'adhésion microbienne mais pour les interactions colloïdales et de surface. La première est appelée théorie DLVO en référence aux auteurs qui en sont à l'origine : Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek (Derjaguin and Landau, 1941; Verwey and Overbeek, 1948). Ce modèle repose sur deux types d'interactions moléculaires : la double couche électrique et les forces de van der Waals. L'interaction entre une surface plane et un microorganisme situés à une distance y l'un de l'autre peut être résumée par l'équation suivante :

$$\Delta G(y) = \Delta G^{LW}(y) + \Delta G^{EL}(y) \quad [1]$$

où ΔG^{LW} représente l'énergie d'interaction liée aux forces de van der Waals, ΔG^{EL} les interactions électrostatiques.

Les forces de van der Waals sont des interactions électriques de faibles intensités. Elles sont divisées en trois forces : l'interaction électrostatique de Keesom entre deux dipôles permanents, l'interaction attractive de Debye entre un dipôle permanent et un dipôle induit et enfin l'interaction attractive de London entre deux dipôles induits. Globalement, ces forces sont attractives et vont donc aider au processus d'adhésion microbienne.

Les interactions répulsives dues à la double couche électrique sont représentées par le terme ΔG^{EL} . Dans un milieu aqueux, les colloïdes et les surfaces conditionnées sont généralement chargés électriquement. Le gradient électrique qui existe depuis la surface du solide jusqu'à neutralisation de la charge est appelé double couche électrique. Un colloïde chargé négativement est partiellement neutralisé par une première couche constituée de cations adsorbés à sa surface. Cette couche est indissociable de la particule. Une seconde couche dite diffuse, moins fermement ancrée à la particule, apparaît. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne du colloïde, il existe un gradient électrique allant jusqu'à la neutralisation des charges. Cette double couche est responsable des répulsions électriques entre la surface et le microorganisme lors de l'adhésion microbienne.

Ce modèle DLVO a ensuite été complété par un terme, ΔG^{AB} , prenant en compte les interactions de type acide-base de Lewis (van Oss, 1995). Cette seconde théorie porte le nom de XDLVO de l'anglais « extended DLVO ». L'énergie d'interaction entre le microorganisme et le support devient alors :

$$\Delta G(y) = \Delta G^{LW}(y) + \Delta G^{EL}(y) + \Delta G^{AB}(y) \quad [2]$$

Les forces d'interactions acide/base de Lewis traduisent les phénomènes d'interactions et d'échanges électroniques. Un acide de Lewis est décrit comme une entité possédant une lacune électronique et donc il est susceptible d'accepter des électrons : on le dit électrophile. A l'inverse, une base de Lewis est nucléophile et est susceptible de mettre à disposition un doublet d'électrons non-engagé dans une liaison covalente.

Les interactions de van der Waals et acide/base de Lewis sont issues des caractéristiques d'hydrophobicité et d'énergie de surface (van Oss, 1995). Les forces de van der Waals traduisent les interactions apolaires alors que la composante polaire est représentée par les interactions acide-base de Lewis. L'énergie de surface γ est ainsi donnée par les équations suivantes :

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad [3]$$

$$\text{avec} \quad \gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-} \quad [4]$$

avec γ^{LW} la composante due aux interactions de van der Waals, γ^{AB} la composante due aux interactions acide/base de Lewis, γ^+ la composante accepteur d'électron, γ^- la composante donneur d'électron. Les composantes γ^{LW} , γ^+ et γ^- peuvent être mesurées expérimentalement (cf section I.2.3.).

Ainsi ce modèle de XDLVO divise en trois composantes l'énergie d'interaction qui va permettre, ou non, aux microorganismes de se fixer au support. L'affinité entre le microorganisme et le support, leur capacité à interagir et établir de liaisons va être déterminante. C'est aussi grâce à cette théorie que l'on peut dissocier l'adsorption réversible de l'adhésion irréversible. Comme le rapporte Wang et al. (2011), la résultante ΔG de ces forces d'attraction et de répulsion passe par deux minima permettant l'établissement d'un contact entre le microorganisme et le support. La Figure I-7 donne l'allure de l'énergie

d'interaction entre deux espèces du genre *Pseudomonas* (*aeruginosa* et *putida*) et *Escherichia coli*. avec un support en verre, conditionné (OTS) ou non.

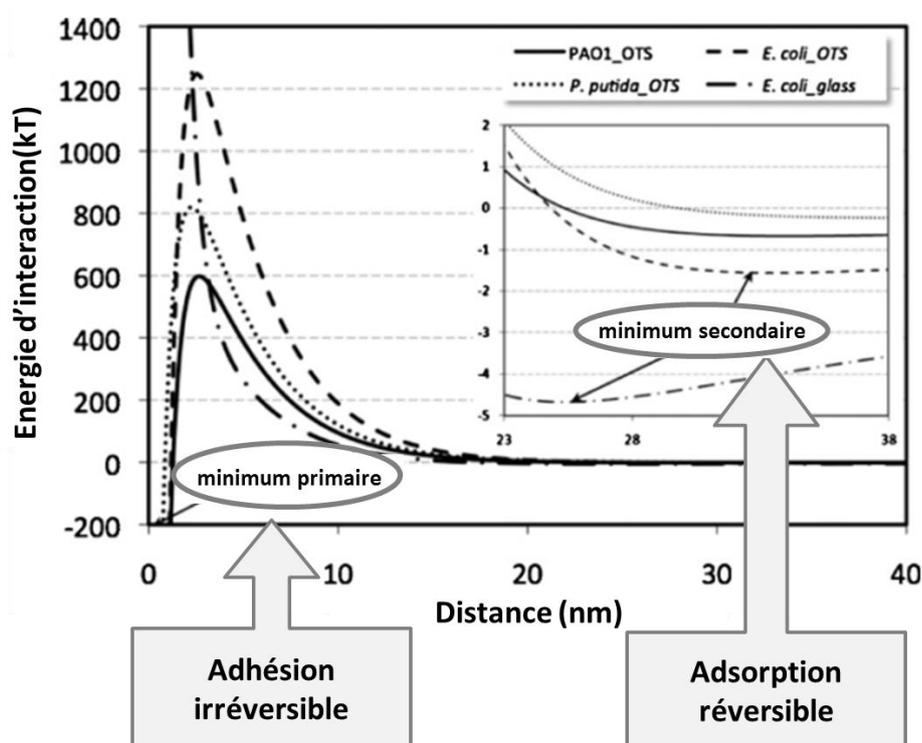


Figure I-7: Modèle de l'adhésion microbienne divisée en deux phases, l'une dite réversible, l'autre dite irréversible (adaptée Wang et al. (2011))

Les auteurs ont clairement identifié deux zones où ΔG devient négative et donc où l'interaction est favorable. Les zones nommées « minimum secondaire » correspondent à l'adsorption réversible avec des distances d'environ 30 nm entre le support et la bactérie. La seconde zone « minimum primaire », à des distances de l'ordre du nanomètre, correspond à l'adhésion ferme, irréversible du microorganisme. Entre ces deux zones de minima locaux, une barrière énergétique plus ou moins élevée existe. Le franchissement de cette barrière énergétique est nécessaire pour établir une adhésion irréversible. En effet, une fois le premier contact établi, l'adsorption réversible ayant été faite, les microorganismes ont deux évolutions possibles : franchir la frontière énergétique et procéder à une adhésion irréversible ou quitter le support, généralement en raison d'une contrainte hydrodynamique plus forte que l'énergie d'adsorption.

Ce concept de réversibilité de l'attachement et d'interaction à deux minima d'énergie est repris couramment dans les études sur l'adhésion microbienne et modélise bien les processus d'adsorption (Meinders et al., 1995). Cependant, dans certains cas, ce modèle ne suffit pas à expliquer les résultats d'adhésion obtenus expérimentalement. Toujours dans la même étude, pour six combinaisons bactérie/support, Wang et al. (2011) ont quantifié l'adhésion et l'ont comparée aux résultats prédits par la XDLVO (Figure I-8). Si quatre combinaisons répondent bien à la théorie en présentant un ordre relatif similaire à celui annoncé par la XDLVO, deux d'entre elles (PAO1_OTS et *P.putida*_OTS) présentent des résultats qui en vont à l'encontre.

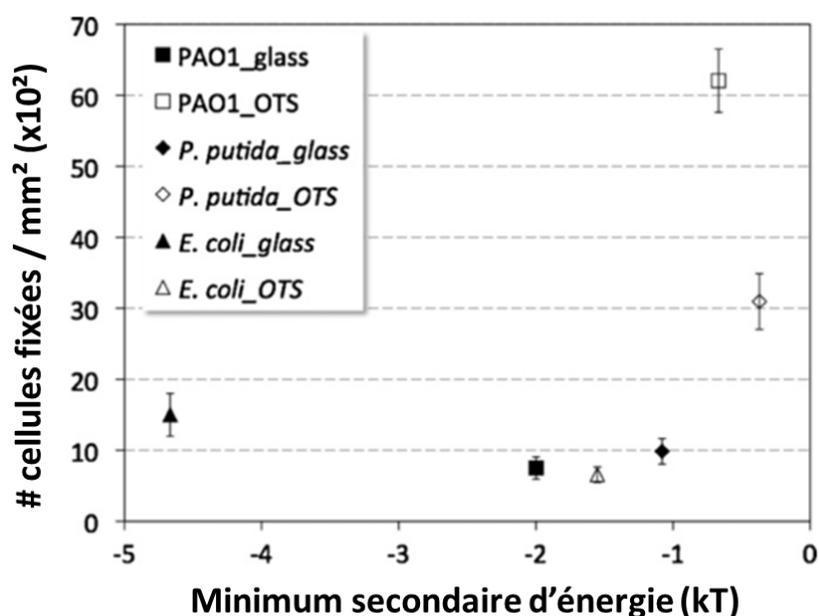


Figure I-8 : Comparaison des résultats annoncés par la XDLVO (en abscisse) avec ceux obtenus expérimentalement (en ordonnée) (adaptée de Wang et al. (2011))

Ce manquement de la théorie est expliqué par les auteurs par deux principaux mécanismes qui ne sont pas pris en compte dans la XDLVO : la présence d'appendices bactériens dont PAO1 est doté et la présence d'EPS qui recouvrent la cellule de *Pseudomonas putida*. Il faut rappeler que la théorie XDLVO a été initialement imaginée pour des colloïdes inertes en suspension. Le fait de transposer cette théorie aux microorganismes, possédant des propriétés sensiblement différentes, implique que certaines hypothèses deviennent erronées. L'application de la théorie XDLVO aux phénomènes d'adhésion microbienne nécessite des aménagements spécifiques, encore absents pour le moment, ce qui explique son incapacité à prévoir certains résultats expérimentaux (Azeredo et al., 1999; Hermansson, 1999).

La présence d'appendices dont sont dotés certains microorganismes va rendre caduque l'hypothèse d'une particule parfaitement sphérique sur laquelle repose la XDLVO (Feldner et al., 1983). De plus, comme le dépeint la Figure I-9, ils facilitent l'accès au support. Il existe une distance minimale L d'environ 5 nm entre le microorganisme et le support (Young, 2006). Les répulsions électriques mutuelles maintiennent cette distance L . Néanmoins la particule B est dotée d'appendices dont le faible diamètre leur permet de s'immiscer dans ce champ de répulsion. Les flagelles et les pili peuvent avoir des longueurs 15-20 μm et 1-2 μm respectivement, pour des diamètres de 5 à 25nm. Ces structures sont donc capables d'accéder au support et d'initier une adsorption réversible.

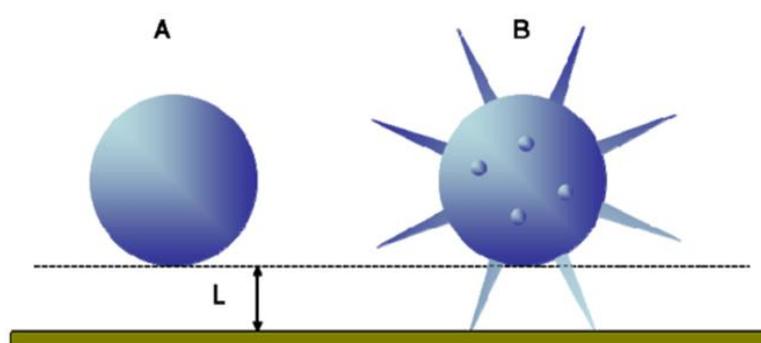


Figure I-9 : Les appendices bactériens permettent d'établir des contacts plus facilement avec le support (adapté de (van Oss, 1995)). Particules sphériques représentant une bactérie dépourvue d'appendice (A) ou dotée d'appendices (B). La distance L est la distance minimale que les répulsions mutuelles autorisent.

Les EPS sont le second facteur explicatif de l'échec de la XDLVO à expliquer les phénomènes d'adhésion. Leur présence à la surface du microorganisme engendre des interactions avec le support conditionné, des liaisons de type pont polymérique, qui ne sont pas prises en compte dans ce modèle (Azeredo et al., 1999). On retrouve le même type de ponts polymériques dans les processus de floculation biologique. Ces EPS peuvent être des longues chaînes carbonées qui vont permettre d'établir un contact avec le support à des distances plus grandes, de la même manière que les appendices. Chez *Pseudomonas aeruginosa* par exemple, le rôle de l'alginate dans l'adhésion est décrit (Davies et al., 1993; Stoodley et al., 2002). Cependant, les EPS ne jouent pas un rôle clé seulement dans l'absorption réversible. Ils permettent le franchissement de la barrière énergétique et l'établissement d'une adhésion irréversible.

I.2.1.3 L'adhésion irréversible

L'adhésion irréversible intervient lorsque la barrière énergétique est franchie. Une fixation forte entre le microorganisme et le support est alors possible. Cette adhésion à haut niveau d'énergie ne peut intervenir que si la cinétique d'interaction le permet. Le microorganisme est en effet soumis à certaines contraintes, notamment hydrodynamiques, qui vont entraîner sa désorption du support si sa fixation n'est pas assez forte. Il faut donc que les différents mécanismes menant à l'adhésion irréversible aient des temps caractéristiques suffisamment courts, sans quoi le microorganisme retournera à la phase liquide.

Le franchissement de la barrière énergétique et l'installation d'une adhésion irréversible s'expliquent tout d'abord par la multiplication d'interactions moléculaires de faible énergie (Characklis and Marshall, 1990). Les interactions de Keesom, Debye, ion-dipôle, les liaisons hydrogènes, hydrophobes sont plus nombreuses et vont permettre un ancrage plus ferme du microorganisme sur la surface.

En outre, les EPS vont jouer un rôle capital dans l'élaboration de l'adhésion irréversible (Azeredo et al., 1999; Characklis and Marshall, 1990; Stoodley et al., 2002). Elles vont établir des ponts polymériques avec les glycoprotéines et polysaccharides qui conditionnent le support. Ces substances secrétées par les microorganismes sont elles aussi essentiellement des polysaccharides et des protéines. La création de multiples liaisons polymériques va permettre une fixation ferme. Si certains microorganismes synthétisent et arborent de manière continue des EPS, il a par ailleurs été démontré que leur production pouvait être stimulée après un premier contact avec le substrat (Davies and Geesey, 1995). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, le gène codant pour l'expression de l'alginate – et donc la quantité d'alginate détectée – montre une augmentation de son expression dans les minutes qui suivent le contact avec le support (Davies et al., 1993). Il est aussi mis en évidence la diminution des événements de détachement suite à cette surproduction d'alginate. La synthèse de cette EPS est donc influencée par ce phénomène d'adsorption et assure des forces d'adhésion plus importantes.

Le regroupement des cellules et la formation de clusters permet aux microorganismes de s'ancrer plus fermement au support. C'est aussi dans cet objectif que la production et l'excrétion d'EPS est cruciale. Non seulement, elles améliorent l'adhésion au support via les ponts polymériques mais elles sont également un moyen de former des agrégats dont la force

d'adhésion globale augmente (Gerke et al., 1998). Ces clusters peuvent se former grâce des phénomènes de co-adhésion ou co-agrégation. La co-adhésion se définit comme l'adhésion d'un microorganisme sur un premier qui est lui-même déjà fixé à un support ; la co-agrégation est le regroupement de plusieurs microorganismes dans la phase liquide qui vont alors se fixer ensemble sur le support (Bos et al., 1994). L'intérêt de ces phénomènes dans la problématique de l'adhésion microbienne a notamment été démontré par Bos et al. (1995). Cet intérêt est double. D'abord un agrégat possédant une emprise sur la surface du support plus importante se forme permettant l'établissement d'une adhésion irréversible. Deuxièmement, ces phénomènes de co-adhésion permettent aux microorganismes de la phase liquide d'accéder au support. La cellule déjà fixée sert de point d'ancrage et ses EPS et/ou appendices sont autant d'opportunités pour la cellule planctonique d'établir une liaison sans souffrir des répulsions électriques de la double couche.

Ainsi de nombreux phénomènes régissent les différentes étapes de l'adhésion microbienne, du transport du microorganisme vers le support jusqu'à son premier contact et l'établissement d'une adhésion ferme et dite irréversible. De nombreux paramètres, notamment les forces hydrodynamiques, vont influencer ces étapes donnant lieu à l'obtention de différents types de structures morphologiques et microbiologiques.

1.2.2 Les paramètres clés de la structuration

Dans cette partie, les différents paramètres participant à la structuration morphologique et microbiologique des étapes d'adhésion initiale sont décrits. Une place privilégiée est accordée aux conditions hydrodynamiques car c'est ce paramètre de structuration qui a été choisi pour nos travaux sur l'adhésion. Après avoir abordé succinctement quelques notions d'hydrodynamique, l'impact de ce facteur sur l'adhésion microbienne est développé puis complété en regard des autres paramètres influents.

1.2.2.1 Notions d'hydrodynamique

Les conditions hydrodynamiques correspondent aux comportements dynamiques qu'un fluide va adopter, ici la phase liquide dans laquelle les microorganismes sont en suspension. D'elles dépendent l'efficacité du mélange de la phase liquide, la pression de compression exercée sur le biofilm ou encore les forces de cisaillement qui s'appliquent sur lui.

Un des paramètres fondamentaux est le **type d'écoulement** dans le système. Celui-ci est donné par un nombre adimensionnel appelé nombre de Reynolds (Re):

$$Re = UD_h / \nu \quad [5]$$

avec U la vitesse d'écoulement (LT^{-1}), D_h le diamètre hydraulique qui caractérise la géométrie du système (L) et ν la viscosité cinématique ($L^2.T^{-1}$). Ce nombre de Reynolds donne le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses, ou rapport du transfert de quantité de mouvement effectué par convection par le transfert effectué par diffusion. En se basant sur ce nombre adimensionnel, on définit généralement quatre types d'écoulement : rampant (ou de Stokes), laminaire, transitoire, turbulent (Coufort, 2004). Cette formule, ainsi que les valeurs de Re servant de transition d'un écoulement à l'autre, doivent être adaptées d'un système hydraulique à l'autre comme le montre le Tableau I-3 qui compare un écoulement en conduite avec une cuve agitée mécaniquement.

Un écoulement caractérisé par un très faible nombre de Reynolds (très inférieur à 1) est dit rampant. Les forces visqueuses, c'est-à-dire les interactions d'une couche fluide à l'autre, sont largement prédominantes par rapport aux forces d'inertie. Cet écoulement est généralement évoqué pour caractériser le comportement du fluide autour d'un objet de très petite taille. Les régimes laminaires sont généralement retrouvés dans des systèmes à faible vitesse d'écoulement et/ou faible taille où la diffusion moléculaire est importante. On définit le régime laminaire par un écoulement où deux particules voisines à un instant donné le sont toujours au moment suivant. Le régime turbulent quant à lui démontre une prédominance forte des transferts par convection. Ces écoulements sont instables, des tourbillons et vortex pouvant apparaître de manière aléatoire. Des systèmes de grande taille avec des vitesses importantes et des viscosités faibles sont requis pour obtenir des écoulements turbulents (Coufort, 2004).

Type d'écoulement	Conduite	Cuve agitée
Laminaire	$Re < 2000$	$Re < 10$
Transitoire	$2000 < Re < 4000$	$10 < Re < 10^4$
Turbulent	$Re > 4000$	$Re > 10^4$

Tableau I-3: Nombre de Reynolds et écoulements associés pour deux systèmes hydrauliques. (d'après Coufort (2004))

L'autre paramètre d'intérêt est le cisaillement. Il se définit comme une contrainte tangentielle à la surface sur laquelle il s'applique. La définition de la contrainte de cisaillement τ est la suivante :

$$\tau = F/A \quad [6]$$

avec F la force tangentielle appliquée ($M.L.T^{-2}$), A la surface d'application (L^2). La contrainte τ s'exprime donc comme une pression, en Pascal (Pa). La contrainte de cisaillement peut aussi s'exprimer en fonction de la viscosité dynamique μ ($Pa.s$ ou $M.L^{-1}.T^{-1}$) et du taux de cisaillement σ (T^{-1}) :

$$\tau = \mu * \sigma \quad [7]$$

avec $\sigma = dV/dH \quad [8]$

où V ($L.T^{-1}$) la vitesse de déplacement et H la hauteur ou profondeur du point considéré. La Figure I-10 permet de se représenter l'impact du cisaillement sur une colonne de fluide. Une force F est appliquée au sommet de la colonne sur la surface A . L'ensemble de la colonne va alors se déformer sous l'effet de cette contrainte. Cette déformation va se transmettre depuis la surface tout au long de la colonne suivant l'axe H . On appelle le taux de cisaillement le gradient de la vitesse de déformation le long de la colonne, perpendiculairement à la force F appliquée.

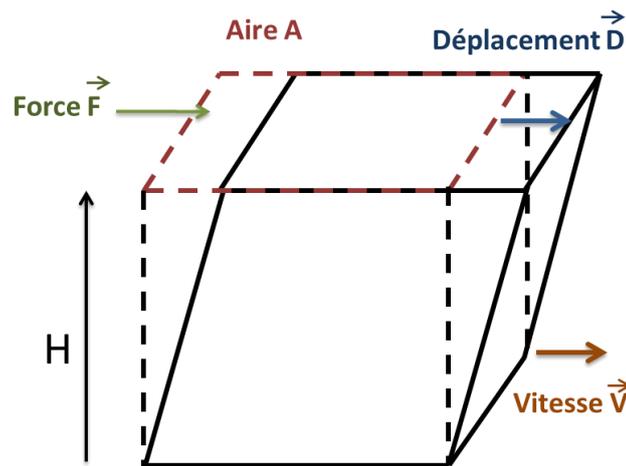


Figure I-10: Schéma illustrant la déformation d'une colonne fluide sous l'effet d'une contrainte de cisaillement

Ces deux paramètres, le régime d'écoulement et le cisaillement, sont des facteurs cruciaux dans les études de l'adhésion microbienne. Le premier est corrélé à l'efficacité du mélange de la phase liquide, aux phénomènes de transfert convectif et à la vitesse du fluide. C'est donc directement l'accès au support par le microorganisme qui est influencé par cet écoulement. Concernant le cisaillement, plus il est élevé, plus les risques de désorption des microorganismes ayant établi un premier contact avec le support sont grands. La quantité de microorganismes, leur répartition spatiale sur la surface et la composition microbiologique de ce biofilm monocouche va donc dépendre de ces paramètres hydrodynamiques.

1.2.2.2 Les paramètres structurants en regard des conditions hydrodynamiques

Les conditions hydrodynamiques peuvent affecter, négativement ou positivement, la formation du biofilm dès les étapes d'adhésion microbienne. Comme le soulignent Busscher et van der Mei (2006), ce paramètre a des effets antagonistes sur l'adhésion. L'augmentation du nombre de Reynolds et de la turbulence va favoriser l'accès au support. La probabilité qu'un microorganisme planctonique rencontre le support est alors plus grande. Cependant, avec la turbulence de la phase liquide, le cisaillement augmente. Les microorganismes n'ayant pas une force d'adhésion suffisante vont donc être désorbés. Deux impacts opposés existent donc, le transfert de masse d'un côté et les forces de détachement de l'autre. Park et al. (2011) donnent un exemple de cette ambiguïté sur des cultures pures de *Pseudomonas aeruginosa*. Des tests d'adhésion à différentes vitesses d'écoulement (et donc nombres de Reynolds et cisaillements) sont réalisés dans des réacteurs microfluidiques. Parmi les cinq conditions testées, c'est la vitesse intermédiaire (et donc le cisaillement intermédiaire) qui a donné l'adhésion la plus abondante. A forte vitesse, les événements de détachement sont plus nombreux mais, à faible vitesse, les événements d'adsorption sont moins nombreux.

1.2.2.2.1 Le transfert de masse

Comme le soulignent Bakker et al. (2003), le mélange de la phase liquide et la probabilité de rencontre entre un microorganisme et une surface colonisable sont largement dépendants de l'écoulement. Dans certains milieux peu ou pas mélangés, comme des eaux stagnantes ou encore la cavité buccale, les phénomènes de diffusion prédominent sur les phénomènes de convection quasiment absents. A l'inverse, dans des rivières ou dans des réacteurs biologiques où les mélanges sont importants, l'accès au support est largement favorisé. La Figure I-11

schématise l'impact sur la concentration en microorganismes du passage d'un mélange convectif à une zone où la diffusion prédomine.

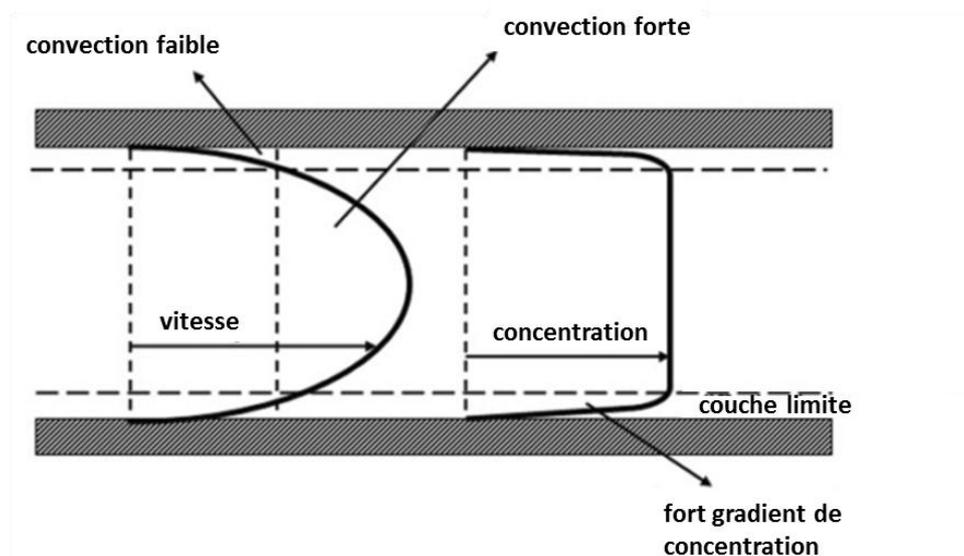


Figure I-11: Représentation du profil de vitesse et de concentration en régime laminaire (adaptée de Busscher et van der Mei (2006))

Dans la partie centrale de la conduite, les phénomènes de convection sont prépondérants. Le mélange de ce compartiment est efficace et une distribution homogène de la concentration en particules est obtenue. Au fur et à mesure que l'on approche de la paroi, la vitesse du fluide diminue jusqu'à devenir nulle. Le mélange de la phase liquide n'est plus assuré de manière aussi performante et les concentrations chutent elles aussi. Dans cette zone, appelée couche limite, les forces de diffusion deviennent majoritaires et assurent le transport des microorganismes vers le support. Ceci signifie que plus l'épaisseur de cette couche limite est importante, plus la distance à parcourir par diffusion est grande et plus l'accès au support est difficile.

Néanmoins, l'épaisseur de cette couche limite peut être réduite grâce à des vitesses de fluide plus importantes et des cisaillements croissants (Lathrop et al., 1992). L'accès au support peut donc être amélioré, la zone de convection et de concentration maximale en microorganismes étant de moins en moins éloignée du support.

Afin d'optimiser ces phénomènes, la géométrie du support est un paramètre très étudié car elle peut permettre, en fonction de l'objectif voulu, la prévention ou la facilitation de la formation du biofilm (Bakker et al., 2003; Elimelech, 1994; Ochoa et al., 2007). En maîtrisant

la phase liquide, on peut influencer sur la quantité de microorganismes susceptibles d'accéder à une surface et de former un biofilm. Bakker et al. (2002) comparent par exemple l'adhésion de différentes espèces bactériennes dans deux types de chambres d'écoulement. Dans la première, à lames parallèles, l'écoulement est tangentiel à la surface colonisable et l'accès au support se fait par diffusion à travers la couche limite. Dans la seconde chambre d'écoulement, à stagnation ponctuelle, l'écoulement est frontal et se heurte à la paroi, assurant un transport convectif des microorganismes au plus proche du support. Les auteurs montrent qu'il existe des différences significatives entre les deux chambres d'écoulement notamment en termes des nombres d'évènements d'adsorption et de décrochement avec des valeurs plus élevées dans la chambre d'écoulement à stagnation ponctuelle. Les cinétiques d'adhésion elles aussi sont clairement influencées, la convection améliorant les temps caractéristiques d'adhésion.

Les phénomènes de transfert de masse, notamment la convection et la diffusion, peuvent donc influencer les cinétiques et les abondances d'adhésion. Différentes structures morphologiques d'adhésion vont également apparaître en fonction de ces paramètres. Complétant ces considérations sur le type d'écoulement, le fait d'être doté d'appendices de motilité confère au microorganisme un avantage dans le processus d'accès au support. Pour traverser la couche limite et les zones où la diffusion est prépondérante, les espèces pourvues d'une motilité propre possèdent alors un avantage sélectif sur les autres (Lecuyer et al., 2011; Pratt and Kolter, 1998; Roosjen et al., 2005). En ce sens les conditions hydrodynamiques sont aussi un facteur de structuration microbiologique. Si les transports par convection sont importants, alors l'avantage de posséder une motilité propre devient partiellement obsolète et une structure microbiologique différente peut être obtenue.

1.2.2.2 La capacité d'adhésion

Au-delà des phénomènes de transport et de leur impact sur l'étape d'accès au support, les paramètres hydrodynamiques conditionnent aussi les processus d'adsorption réversible et d'adhésion irréversible. Ceux-ci sont intimement liés aux contraintes de cisaillement. Le Tableau I-4 donne quelques exemples de cisaillements rencontrés en milieu médical, naturel ou industriel.

Système considéré	Cisaillement (mPa)
Canaux au sein du biofilm	60-300
Clignement d'œil	0,35
Drainage biliaire	10
Mouvement salivaire de la cavité buccale	0,1 – 50
Cavité buccale en mordant une pomme	200
Cathéter urinaire	15
Bateau au port	50
Bateau en navigation	125 000
Module de filtration à fibres creuses	200 – 18 000

Tableau I-4: Quelques exemples de contraintes de cisaillement (Busscher and van der Mei, 2006; Kaya et al., 2014)

On constate qu'il existe des écarts très grands, y compris au sein d'un même système. Tout comme le fait de présenter une motilité propre, d'autres propriétés intrinsèques du microorganisme considéré vont le rendre plus ou moins sensible au détachement et plus ou moins apte à procéder à une adhésion forte et rapide. Son affinité et son aptitude à établir de liaisons avec le support vont conditionner sa capacité à résister aux forces de cisaillement.

Un des paramètres essentiels est **l'affinité entre la surface de la cellule et la surface du support**. De nombreuses études ont identifié ce facteur comme l'un des plus importants pour comprendre l'abondance plus ou moins grande de l'adhésion microbienne sur un support donné (Habouzit et al., 2011; Lackner et al., 2009; Meylheuc et al., 2006; Wang et al., 2011). Un support ne va pas permettre les mêmes abondances pour toutes les espèces microbiennes et une espèce donnée ne va pas adhérer équitablement sur toutes les surfaces. Ces affinités différentielles constituent par ailleurs un moyen de structuration microbiologique de choix dans les cas de populations mixtes de microorganismes. Par exemple, Habouzit et al. (2011) ont testé l'adhésion d'un même consortium méthanogène sur sept matériaux différents dans des conditions hydrodynamiques identiques (Figure I-12). En fonction du matériau, la proportion d'archées au sein de la communauté est passée de 17% dans l'inoculum à 32% sur le polycarbonate. Etant donné que l'activité des archées est souvent reconnue comme le principal facteur limitant dans le processus de méthanisation, le choix d'un matériau capable d'influer sur la structure microbiologique en favorisant leur adhésion représente un intérêt évident.

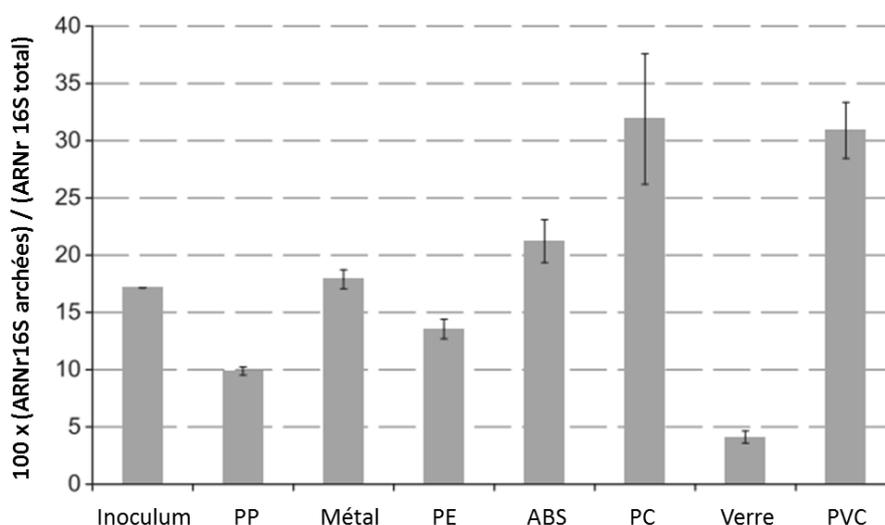


Figure I-12: Mise en évidence d'une structuration microbiologique dépendante du matériau du support. PP = polypropylène, PE = polyéthylène, ABS = acrylonitrile butadiène styrène, PC = polycarbonate, PVC = polychlorure de vinyle (Habouzit et al., 2011)

Il existe des conditions préférentielles d'adhésion, des affinités propres, notamment régies par l'hydrophobicité et la charge à la fois à la surface du support et à la surface de la cellule. Ces affinités vont être d'autant plus déterminantes que les contraintes de cisaillement sont intenses. Comme mentionnée précédemment, une multitude de liaisons faibles se crée entre le support et la cellule afin de franchir la barrière énergétique et établir une adhésion durable. L'affinité pour le support dépend de cette aptitude à établir ce type de liaisons. Concernant les charges surfaciques, les espèces microbiennes sont généralement chargées négativement et plus elles le sont, plus l'adhésion est compromise (Habimana et al., 2014). Néanmoins si le support est chargé positivement, alors l'adhésion est favorisée (Terada et al., 2005). Un autre moyen de promouvoir l'adhésion microbienne est de réduire les répulsions électrostatiques qui existent au sein de la double couche électrique. L'utilisation d'un milieu liquide avec une force ionique importante permet de neutraliser plus efficacement ces charges surfaciques et réduire les répulsions induites par la double couche (Hong and Brown, 2008). En ce qui concerne les considérations d'hydrophobicité, il est généralement admis que des cellules hydrophobes adhèrent mieux sur une surface hydrophobe et, à l'inverse, des cellules hydrophiles sont plus enclines à adhérer sur des surfaces hydrophiles (Van Loosdrecht et al., 1987). Le caractère hydrophobe du support est lui aussi essentiel. La Figure I-13 présente l'impact de l'hydrophobicité du matériau du support – mesurée par les angles de contact – sur le nombre de cellules adhérentes (Habimana et al., 2014). Il apparaît que des matériaux

hydrophiles sont plus résistants à l'adhésion microbienne. Tous ces paramètres de surface et d'affinité support-espèce sont à regarder avec d'autant plus d'attention que les forces de cisaillement sont grandes. Des contraintes élevées vont nécessiter des affinités encore plus grandes (si l'objectif est d'obtenir une adhésion microbienne abondante).

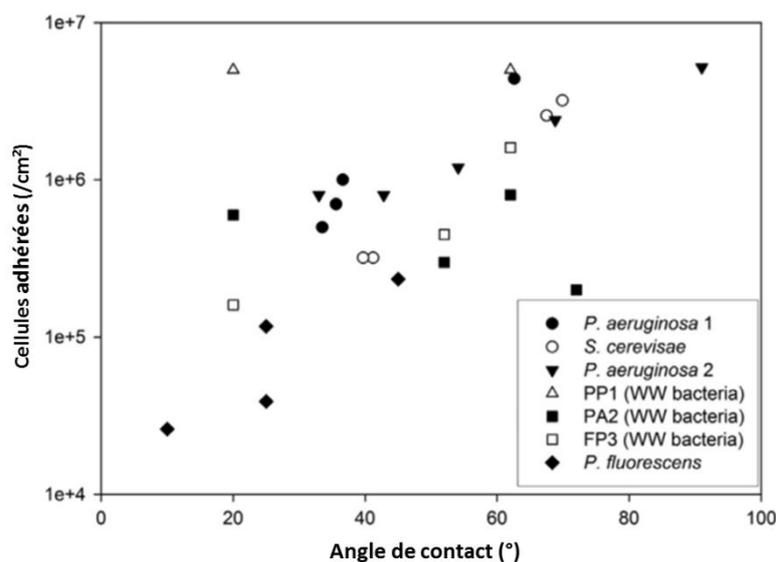


Figure I-13: Corrélation entre l'hydrophobicité du support et l'abondance de l'adhésion (adaptée d'Habimana et al., 2014). WW signifie bactéries issues d'eaux usées (wastewater)

L'importance de ces paramètres de charge électrique et d'énergie de surface ont fait du conditionnement du support une étape essentielle. Des conditionnements spécifiques et maîtrisés peuvent permettre de mieux contrôler les phénomènes d'adhésion. Ainsi en utilisant des biosurfactants appropriés pour conditionner des supports, Meylheuc et al. (2006) ont démontré une réduction de 99% de l'adhésion de l'espèce pathogène *Listeria*.

La forme de la cellule est un autre paramètre qui va être déterminant comme l'illustre la Figure I-14. La Figure I-14A représente l'avantage que possède une cellule allongée par rapport à une cellule sphérique. En effet, si l'on considère un diamètre égal, toutes deux ont la même exposition aux forces de cisaillement, cependant la cellule plus allongée bénéficie d'une surface de contact avec le support beaucoup plus importante. Ce faisant le nombre de liaisons et sa force d'adhésion sont supérieurs à ceux de la cellule sphérique. Certaines espèces sont capables de s'allonger et former des filaments, par exemple lorsque les concentrations en ressources sont insuffisantes (Slater and Schaechter, 1974). Young (2006)

souligne que ceci peut être interprété comme l'acquisition d'un phénotype plus approprié à la formation de biofilm. A défaut de présenter une élongation dans la phase planctonique, certaines espèces, comme *Escherichia coli* acquièrent ce phénotype une fois la cellule déjà fixée (Young, 2006). Cette élongation se fait dans le sens de l'écoulement et sans augmentation du diamètre de la cellule. Il y a donc une augmentation de l'emprise à la surface du support sans augmentation de l'exposition au cisaillement. Ces propriétés vont structurer aussi bien morphologiquement que microbiologiquement le biofilm monocouche en formation.

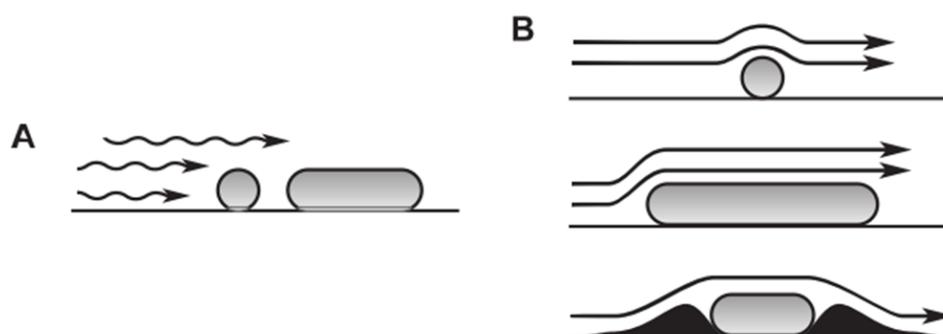


Figure I-14: Sélection et adaptation de la conformation de la cellule face au cisaillement. (Young, 2006)

En outre, une sélection peut avoir lieu en fonction de la rugosité du matériau comme le schématise le croquis inférieur de la Figure I-13B. Certaines cellules auront des formes ou des tailles adéquates pour s'immiscer dans les microcavités et autres irrégularités du matériau. Elles se protégeront ainsi de la contrainte de cisaillement. De nombreuses études ont corrélé la rugosité des matériaux aux processus d'adhésion (Myint et al., 2010; Terada et al., 2005). Il est généralement admis que plus le matériau est rugueux et présente des aspérités, plus il favorise l'adhésion. En effet au-delà d'offrir une protection face aux contraintes de cisaillement, une rugosité importante entraîne une augmentation de la surface colonisable via l'augmentation de la surface spécifique.

Tout comme l'élongation de la cellule pour mieux résister au décrochement, d'autres mécanismes d'adaptation au cisaillement sont reportés dans la littérature. Il a été notamment mis en évidence une adhésion cisaillement-dépendante (Lecuyer et al., 2011; Thomas et al., 2002). Certaines espèces seraient en effet dotées d'un mécanisme qui permet de s'adapter à des contraintes de cisaillement fortes en augmentant leur capacité d'adhésion. Lecuyer et al. (2011) ont démontré chez *Pseudomonas aeruginosa* des temps de résidence plus longs aux

forts cisaillements. Les temps caractéristiques d'adhésion évoluent de manière relativement linéaire avec le cisaillement et passent de quelques secondes pour des contraintes de l'ordre de 0,5 Pa à plus de 30 secondes pour 2 à 3 Pa. D'autre part, Thomas et al. (2002) ont identifié le même type de comportement chez *Escherichia coli*. Les auteurs ont identifié une molécule spécifique comme étant potentiellement le médiateur de ce mécanisme. On appelle ce genre de molécule « adhésine », bien qu'il ne s'agisse pas d'une famille moléculaire à proprement parler. Elles constituent un ensemble de molécules qu'une bactérie arbore à sa surface, fréquemment sur les appendices de type flagelle ou pili, et qui sont impliquées dans les phénomènes d'adhésion. Ici, cette molécule, l'adhésine FimH portée par le fimbria de type I, serait capable de modifier sa conformation et permettre de s'adapter aux forces de cisaillement (Figure I-15).

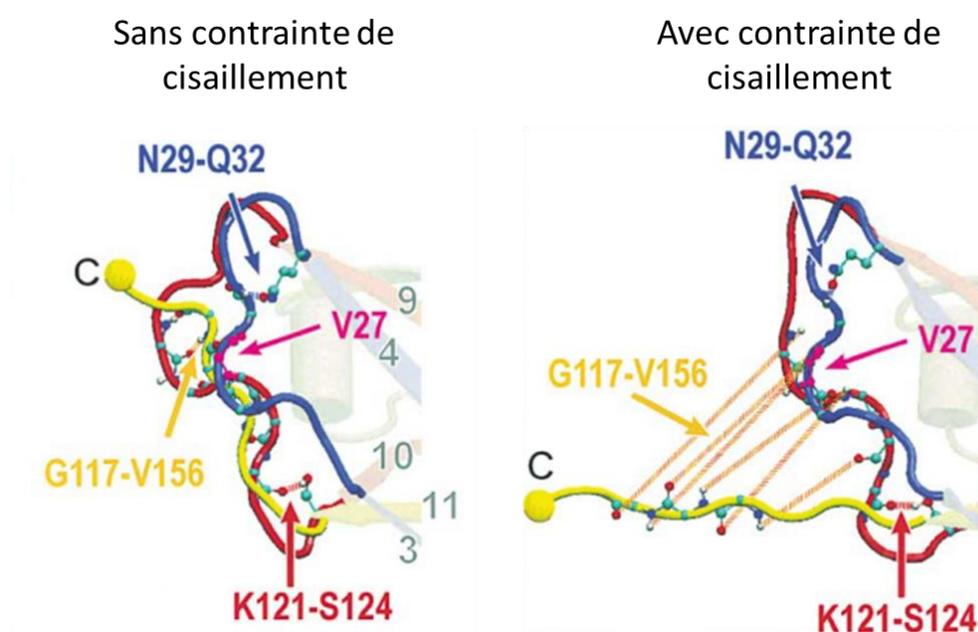


Figure I-15: Changement de conformation d'une adhésion responsable de l'adhésion cisaillement-dépendante (adaptée de Thomas et al., 2002). Résultats obtenus par simulation Steered Molecular Dynamics.

Elle agirait donc comme un capteur des forces de cisaillement. Une partie de la molécule (structure représentée en jaune sur la Figure I-15), est normalement contrainte dans sa structure tertiaire par des liaisons hydrogènes (représentées en orange). Mais si une force suffisante est appliquée, ces liaisons hydrogènes se rompent et un effet levier est actionné. Comme le souligne les auteurs, l'extension de la molécule sous l'effet du cisaillement permet

de faciliter l'adhésion en permettant d'atteindre le support plus facilement via une plus grande portée.

Ces différentes capacités d'adhésion d'une espèce à l'autre sont des mécanismes importants de la structuration microbiologique. Chacun de ces processus peut s'avérer être pertinent ou obsolète selon les conditions hydrodynamiques considérées. Par exemple, dans des conditions où la convection est importante, la motilité du microorganisme ne constitue pas nécessairement un avantage sélectif, alors qu'en milieu stagnant, c'est un atout majeur. A l'inverse, être pourvu de mécanismes permettant de renforcer son adhésion en cas de fortes contraintes de cisaillement s'avère moins utile dans un environnement à faibles forces hydrodynamiques. De la même manière, les diversités morphologiques et surfaciques des microorganismes impliquées dans l'adhésion vont participer à la structuration du biofilm (van Merode et al., 2006). Les interactions d'un individu à l'autre sont aussi un enjeu majeur puisqu'elles permettent une adhésion beaucoup plus forte et durable.

1.2.2.2.3 *L'agrégation face au détachement*

Un autre moyen de lutter contre les forces de détachement a été élaboré par les microorganismes adhérents. Il s'agit de se regrouper pour former des ensembles dont l'emprise sur la surface de support est plus large, les forces d'adhésion plus importantes sans pour autant augmenter drastiquement l'exposition au cisaillement. Ce mécanisme d'agrégation est essentiel dans la structuration morphologique du biofilm. Des clusters ou agrégats de cellules se dessinent progressivement à la surface du support. Les différentes capacités d'interactions d'une espèce à l'autre vont aussi permettre une structuration morphologique et microbiologique de ce biofilm.

Comme évoqué précédemment, ce processus d'agglomération peut se faire par différents biais. La production d'EPS permet aux microorganismes d'interagir physiquement entre eux. Des ponts polymériques vont apparaître et progressivement les deux cellules vont augmenter leur force d'adhésion (Stoodley et al., 2002). Comme cité précédemment, la synthèse de certaines EPS, comme l'alginate, permet non seulement d'établir des liaisons avec le support mais aussi entre microorganismes (Gerke et al., 1998). Par ce moyen, les microorganismes peuvent être capables de se regrouper sur une surface.

Un autre processus réside dans les processus de co-adhésion et de co-agrégation. Les mécanismes de la co-adhésion et co-agrégation sont principalement étudiés dans le contexte des biofilms de la cavité buccale (Beaussart et al., 2013; Bos et al., 1995; Guo et al., 2014). Les affinités d'une cellule à l'autre, en particulier si la synthèse d'EPS est importante, sont généralement supérieures aux affinités cellule-support. Une adhésion préférentielle sur une cellule préalablement fixée peut ainsi apparaître. Chacune des deux cellules impliquées y trouve un intérêt dans la mesure où la cellule planctonique parvient à accéder au support et la cellule déjà fixée va pouvoir, par le biais de l'agrégation, renforcer son adhésion. Comme rapporté par Bos et al. (1994) dans le contexte des biofilms dentaires, une véritable logistique se met en place avec des espèces qualifiées de « colonisateurs primaires », souvent des bactéries Gram positif, rejointes ensuite grâce à la co-adhésion par des bactéries Gram négatif. Dans cette étude, les auteurs mettent aussi en évidence l'impact de ces phénomènes sur la structuration microbiologique du biofilm (Figure I-16).

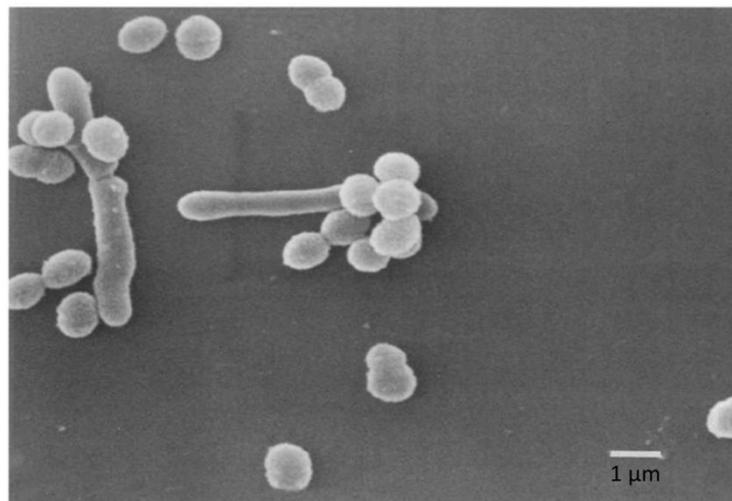


Figure I-16: Exemple de co-adhésion à faible cisaillement (10 mPa). Microscopie électronique à balayage de co-adhésion impliquant *Actinomyces naeslundii* (bâtonnets) et *Streptococcus oralis* (cellules sphériques). (Bos et al. (1994))

Toutes les espèces ne sont pas nécessairement aptes à co-adhérer ou se co-agréger entre elles, ils existent des combinaisons plus ou moins performantes. Ces différentes aptitudes vont aussi jouer sur la distribution microbienne à la surface du support. Les auteurs constatent en effet des répartitions spatiales différentes en fonction des espèces impliquées. Les structures morphologique et microbiologique du biofilm sont donc directement influencées par ces mécanismes.

Toutefois Bos et al. (1995) démontrent encore une fois l'effet ambigu des forces de cisaillement sur l'adhésion et les phénomènes de co-adhésion et co-agrégation. Aux forts cisaillements, le nombre de collisions entre particules en suspension augmentant, la co-agrégation est favorisée. De même, une augmentation du transfert de masse est obtenue, facilitant la co-adhésion. Mais ces mécanismes se heurtent à la cinétique de ces processus de co-adhésion qui ne permet pas de créer des liaisons assez fortes entre les deux bactéries.

Enfin, afin de se regrouper sur la surface du support, certaines espèces sont capables de se déplacer sur celle-ci. Cette motilité saccadée (ou twitching) constitue une motilité spécifique à l'état fixé (Monds and O'Toole, 2009; O'Toole and Kolter, 1998). Elle apparaît suite au contact avec le support. Un changement d'expression génétique permet le passage d'une motilité de type flagellé, dans la phase liquide, à une motilité se faisant au moyen du pilus de type IV. Par un cycle de rétraction-élongation, ce pilus propulse et fait glisser la bactérie sur le support (Monds and O'Toole, 2009; Stoodley et al., 2002). Elle peut être guidée par un chimiotactisme qui va permettre aux microorganismes de se déplacer dans une direction préférentielle (Miller et al., 2008; Pratt and Kolter, 1998). Cette direction est donnée par des gradients de concentration chimique, la concentration d'EPS par exemple. Cette motilité, à la frontière entre les étapes d'adhésion et de développement, s'ajoute donc aux phénomènes de co-adhésion et de synthèse d'EPS pour permettre la structuration morphologique et microbiologique du biofilm.

Il existe donc de nombreux facteurs permettant de structurer le biofilm dès les étapes d'adhésion. Les conditions hydrodynamiques en sont un essentiel, influençant à la fois les processus d'attachement et de détachement.

1.2.3 Les techniques d'études de l'adhésion microbienne

1.2.3.1 Les dispositifs expérimentaux

Le dispositif le plus courant pour l'étude de l'adhésion microbienne, et notamment concernant l'impact du cisaillement, est la chambre d'écoulement (Bakker et al., 2002; Bos et al., 1994; Lu et al., 2004; Park et al., 2011; Wang et al., 2011). Il en existe de trois sortes : à disque rotatif (« rotating disc ») (Dickinson and Cooper, 1995), à lames parallèles (« parallel plate ») ou à stagnation ponctuelle (« stagnation point ») (Bakker et al., 2002). La chambre

d'écoulement à lames parallèles est la plus répandue. La Figure I-17 en présente le design. Elle permet de modifier les contraintes de cisaillement simplement en jouant sur le débit d'entrée du fluide (Lu et al., 2004). De nombreux matériaux sont disponibles, l'utilisation et le montage de cet outil étant relativement simple (Bakker et al., 2003). La plupart de ces réacteurs sont autoclavables et réutilisables. Ce type de réacteur a aussi comme intérêt de pouvoir être placé sous un microscope et l'utilisateur peut ainsi suivre la cinétique d'adhésion microbienne. Les dimensions de cette installation sont en effet très réduites, de l'ordre 5 à 15 cm de long pour quelques centimètres de large.

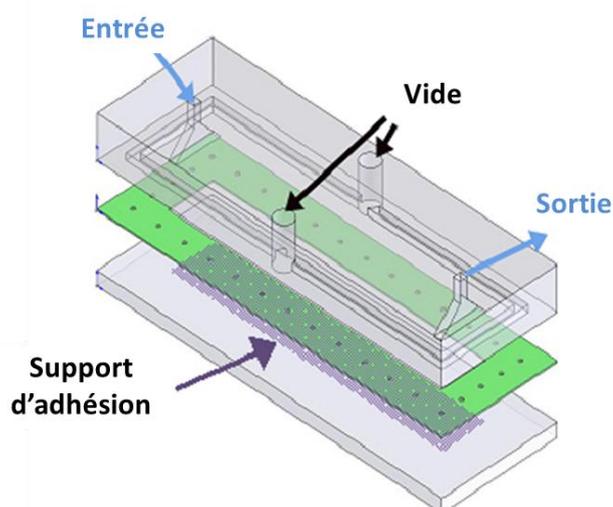


Figure I-17: Design classique d'une chambre d'écoulement à lames parallèles (extrait de nanotechweb.org)

Toutefois ce type de réacteur ne permet pas d'obtenir des nombres de Reynolds très importants et se cantonne à des régimes laminaires. L'utilisation d'autres réacteurs comme le réacteur de Couette-Taylor (CTR) ou réacteur annulaire rotatif peut alors s'avérer pertinente (Florjanič and Kristl, 2011; Habouzit et al., 2011) pour des études en régime turbulent. De plus amples détails concernant le CTR et les différents régimes d'écoulement dans ce type de réacteur sont apportés dans la section II.1.1.

1.2.3.2 La caractérisation chimique des surfaces

Comme présentées précédemment, les caractéristiques chimiques des surfaces, de la cellule et du support, sont déterminantes dans les processus d'adhésion. La mesure de l'hydrophobicité d'un matériau se fait généralement par la technique des angles de contact

(Figure I-18). Une goutte de liquide est déposée sur le matériau. La forme qu'elle adopte (plus ou moins étalée sur le matériau) témoigne du caractère hydrophobe du matériau. La procédure de mesure de la tension de surface est effectuée par un goniomètre.

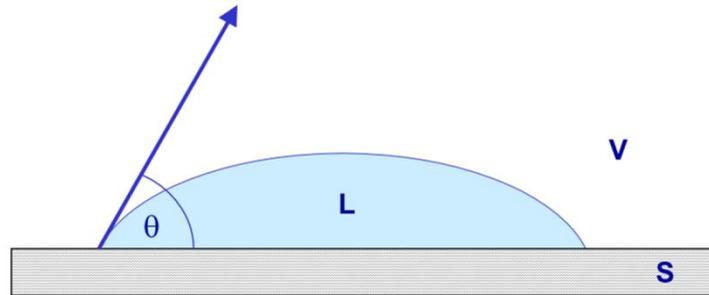


Figure I-18: Technique de mesure des angles de contact (θ) au point triple entre le liquide (L), le support (S) et la vapeur (V). (Habouzit, 2010)

La formule suivante est ensuite utilisée pour déterminer les propriétés du support (S) en fonction du liquide (L) :

$$\gamma_L(1 + \cos\theta) = 2 \left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \right) \quad [9]$$

Cette équation à trois inconnues (γ^{LW} , γ^+ , γ^-) sur le solide peut être résolue en utilisant trois liquides avec des énergies de surface γ_L connues (Van Oss et al., 1986; van Oss, 1995). De cette façon l'ensemble des propriétés liées à l'énergie de surface du matériau (γ , γ^{LW} , γ^+ , γ^- et γ^{AB}) peut être déterminé.

Pour caractériser l'hydrophobicité des cellules, deux solutions sont possibles. La première consiste à utiliser la méthode des angles de contact sur un matériau dont la surface a été tapissée de l'espèce microbienne à analyser. La seconde, appelée MATS pour « Microbial Adhesion To Solvents », consiste à caractériser l'affinité des microorganismes pour des solvants plus ou moins polaires et avec des caractères donneur/accepteur d'électrons plus ou moins marqués. Les cellules sont vigoureusement mélangées avec un solvant donné. Après séparation des deux phases (aqueuse et solvant), la répartition des cellules entre ces deux phases permet de caractériser leur hydrophobicité (Bellon-Fontaine et al., 1996; Meylheuc et al., 2006). Les solvants couramment utilisés sont le décane, hexadécane, chloroforme et l'acétate d'éthyl.

Les charges de surface sont quant à elle mesurées par le potentiel zêta ζ . En solution, les particules sont associées à un cortège d'ions qui se déplace avec elle. Le potentiel zêta n'est donc pas directement la charge au niveau de la cellule mais à l'interface entre cette couche ionique indissociable et le milieu liquide. Pour les cellules microbiennes, la détermination du potentiel zêta ζ est faite en les plaçant dans une solution d'électrolytes parcourue par un champ électrique. La mobilité électrophorétique des cellules va permettre de déterminer leurs propriétés électriques. Leur sens de migration dans le champ électrique donne le signe de la charge globale et leur vitesse est liée au potentiel zêta.

1.2.3.3 Les techniques d'observation

Il existe une multitude de méthodes d'observation microscopique utilisées pour l'étude de l'adhésion microbienne. La plus répandue et la plus accessible est la microscopie à épifluorescence (Brugnoni et al., 2011; Habouzit et al., 2011; Park et al., 2011). Cette technique consiste à utiliser la microscopie optique classique mais en mettant à profit les propriétés fluorescentes de certaines molécules. Ces molécules peuvent être électriquement excitées lorsqu'elles reçoivent des photons à une longueur d'onde donnée dite d'absorption. S'en suit alors une émission de leur part d'un photon d'une longueur d'onde dite d'émission. Dans le cas des molécules utilisées en microscopie, ces deux longueurs sont différentes afin de pouvoir découpler l'excitation de l'émission. Ces molécules, appelés fluorochromes, peuvent être déjà présents dans l'échantillon observé. La fluorescence de la chlorophylle par exemple est souvent utilisée, mais l'ajout de fluorochromes est très souvent nécessaire. Un des plus courants est le 4',6'-diamidino-2-phénylindole ou DAPI. Il a la propriété de se lier à l'ADN et va permettre ainsi de le faire fluorescer. Ainsi après avoir marqué des cellules au DAPI, une lumière de longueur d'onde à 372 nm est envoyée sur l'échantillon et va exciter le fluorochrome. Il va alors émettre des photons avec une longueur d'onde de 456 nm qui seront captés par la caméra ou l'œil de l'utilisateur. Il existe une très grande diversité de molécules de marquage. Le choix de la technique de marquage est essentiel car elle va permettre l'observation préférentielle d'une espèce ou d'une molécule spécifique (ADN, membrane, EPS...). Ce marquage peut donc apporter non seulement des informations sur la distribution spatiale des cellules adhérees (morphologie) mais aussi sur la structure microbiologique. Par exemple dans le cas d'adhésion mixte cyanobactéries-bactéries, l'acquisition peut se faire en deux temps : d'abord des images où seule la fluorescence de la chlorophylle est utilisée et

ensuite des images avec un marquage au DAPI. La comparaison des deux images donne à la fois l'abondance et la distribution spatiale de chacune des deux espèces.

L'utilisation de la microscopie à balayage électronique est fréquemment rencontrée dans la littérature (Bos et al., 1994; Gomes et al., 2013). Plus onéreuse que la microscopie optique, cette technologie est aussi beaucoup plus sophistiquée. L'intérêt majeur réside dans la haute résolution et l'observation de structures de plus petites dimensions qu'en microscopie optique. Ce ne sont plus des photons, ou de la lumière, qui sont envoyés sur l'échantillon mais des électrons via un canon à électrons. Des électrons de basse énergie sont alors émis par l'échantillon et sont guidés vers un amplificateur puis un capteur qui traduit le signal électrique en une topographie de l'échantillon. La Figure I-16 est un exemple de photographie obtenue par microscopie électronique à balayage.

La microscopie à force atomique est utilisée, non seulement pour l'adhésion mais aussi pour la caractérisation des supports (Meylheuc et al., 2006; Wang et al., 2011). Il s'agit d'une pointe nanométrique qui va balayer la surface à caractériser. Cette pointe est reliée à un micro-levier dont les flexions provoquées par la topographie de l'échantillon sont enregistrées. Au-delà des forces mécaniques dues à la rugosité du support, la pointe est capable de détecter des forces de liaisons chimiques grâce aux interactions entre les atomes de son apex et ceux de l'échantillon. La haute résolution de cet appareillage en fait un outil de choix pour la caractérisation fine de la topographie et de la rugosité des matériaux.

D'autres techniques de microscopie peuvent être utilisées dans le domaine de l'adhésion microbienne, notamment la microscopie confocale dont le principe est développé dans la section I.3.3.

1.3 Le développement et le biofilm mature

1.3.1 Des microcolonies au biofilm mature

Après que les premières cellules ont adhéré, les phénomènes d'accumulation et de développement prennent le relai. La phase de développement du biofilm peut se découper en deux étapes, la formation de microcolonies et la maturation. La première va principalement consister en la formation et l'accroissement de colonies microbiennes et l'élaboration d'une matrice extracellulaire d'EPS. Progressivement, ces structures vont s'agrandir et former un biofilm possédant diverses propriétés morphologiques et microbiologiques. Cette étape est celle de la maturation. L'acquisition de ces structures matures, ou différenciation, présente des temps caractéristiques de l'ordre de dix jours à plusieurs semaines (Lewandowski et al., 2004; Stoodley et al., 2002). Le biofilm mature constitue un système toujours dynamique mais démontre une certaine stabilité macroscopique. Différents phénomènes interviennent, se compensant plus ou moins, certains constituant un apport de biomasse, d'autres une perte. L'ensemble de ces étapes est résumé par la Figure I-19 et va être repris dans les paragraphes suivants en insistant sur les processus classiques qui structurent le biofilm. Seuls les points 1 et 2 correspondant aux phénomènes d'adhésion ne sont pas abordés.

1.3.1.1 La formation de microcolonies

Comme le montre le point 3 de la Figure I-19, les microorganismes commencent à former des microcolonies. C'est l'étape initiatrice du développement du biofilm et ces agrégats sont à la base de la structuration du biofilm. Il ne s'agit ici non plus d'un regroupement de quelques cellules, comme c'était le cas pour l'adhésion irréversible, mais de la formation de microcolonies de l'ordre d'une centaine de cellules au moins (Monds and O'Toole, 2009; Sauer and Camper, 2001). Stoodley et al. (2002) listent trois mécanismes expliquant leur formation : la croissance microbienne, la motilité des cellules sur la surface du support et l'apport de nouvelles cellules via la phase liquide.

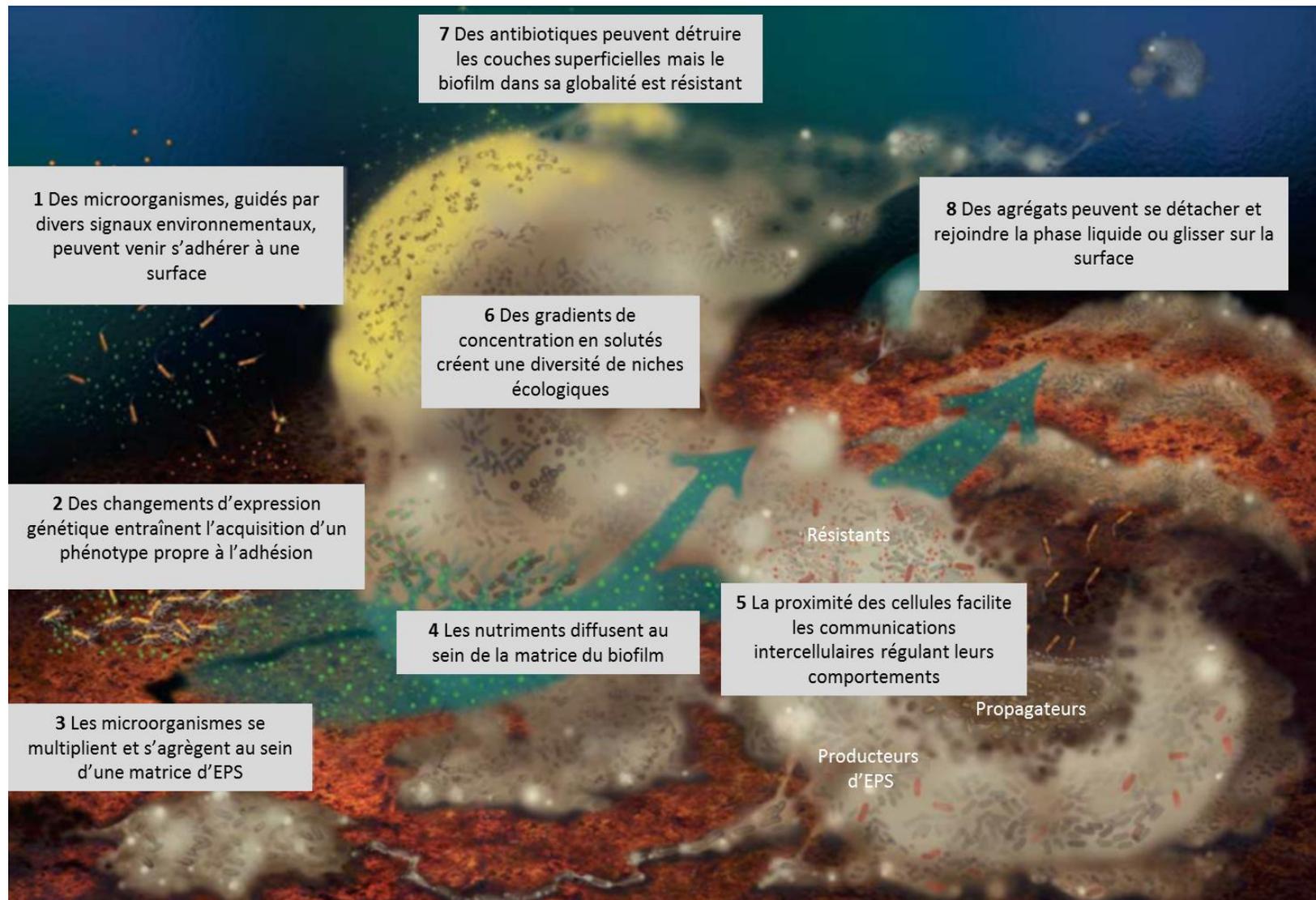


Figure I-19: Le biofilm vu comme un système biologique organisé et dynamique (adaptée de Hall-Stoodley et al., 2004).

Characklis and Marshall (1990) distinguent ce dernier phénomène de recrutement de cellules planctoniques des processus d'adhésion et de co-adhésion et le nomment attachement. Les cellules planctoniques vont en effet venir s'adhérer non plus à une cellule fixée mais à un amas de microorganismes déjà structurés au sein d'une matrice d'EPS. La motilité quant à elle est du même type que celle évoquée lors de l'adhésion irréversible ; il s'agit du twitching. Pouvant être guidé par un chimiotactisme, ce mode de locomotion spécifique à l'état adhérent permet aux microorganismes de se rassembler et de s'agréger (Miller et al., 2008; Monds and O'Toole, 2009; O'Toole and Kolter, 1998). Enfin la croissance et la division cellulaire vont permettre la formation de ces microcolonies et leur expansion.

La formation des microcolonies marque aussi une modification dans l'expression génétique des microorganismes. Par exemple, Davies and Geesey (1995) démontrent la surproduction d'EPS dans les quinze minutes suivant l'adhésion ; cette surexpression des gènes codant pour la synthèse d'EPS permet à la fois une adhésion plus forte et la formation des microcolonies. De même, Prigent-Combaret et al. (1999) et Sauer and Camper (2001) ont constaté, respectivement chez *Escherichia coli* et chez *Pseudomonas putida*, une importante modification de l'expression de certains gènes (aussi bien une surexpression qu'une diminution de l'expression) dans les heures qui suivent l'adhésion. Il a ainsi été constaté une surexpression des gènes permettant la synthèse d'EPS, la motilité par twitching, des facteurs de virulence et de défense contre certains antibiotiques, des transports membranaires et de communications intercellulaires. Il est à noter que Sauer et al. (2002) vont même plus loin en démontrant qu'il existe un différentiel d'expression génétique non seulement entre l'état fixé et l'état planctonique (avec plus de 800 protéines ayant une expression six fois supérieures ou plus à l'état fixé) mais aussi entre différentes étapes de la formation du biofilm (avec une variation moyenne de l'expression de 35% des protéines).

L'autre phénomène marquant de cette étape est l'augmentation drastique de la production d'EPS et l'apparition d'une véritable matrice extracellulaire. Ces substances constituent un des éléments clés de la structuration morphologique du biofilm et permettent aux cellules de se lier entre elles (Gerke et al., 1998; Stoodley et al., 2002). Elles forment une matrice, un ciment dans lequel les cellules se maintiennent. La matrice extracellulaire constitue le principal vecteur des échanges avec la phase liquide. En qualité de barrière physique et chimique, elle influence directement les interactions entre les cellules et le milieu liquide.

Cette matrice confère également au biofilm ses propriétés mécaniques. Elle est dynamique et évolue au gré des paramètres microbiologiques et environnementaux.

1.3.1.2 L'acquisition de structures différenciées : la maturation

Une véritable organisation marquée par un agencement spécifique se construit durant l'étape de maturation. Cette spécialisation structurelle, aussi appelée différenciation (Stoodley et al., 2002), constitue l'étape essentielle de la structuration du biofilm. Répondant à la fois à des paramètres environnementaux et à des phénomènes de régulation génétique et d'interactions microbiennes, la structuration peut être dite respectivement passive ou active (Hall-Stoodley et al., 2004). Des architectures spécifiques peuvent apparaître, avec un biofilm tantôt homogène et lisse ou extrêmement poreux avec des enchaînements de structures dites « en doigt » et des vallées. Des compositions microbiologiques plus ou moins variées émergent en différents endroits d'un même biofilm. Cette phase de différenciation des structures est résumée par les étapes 4 à 6 de la Figure I-19.

Tout d'abord, les nutriments du compartiment liquide diffusent dans la matrice permettant l'apport de substrat aux cellules pour leur croissance. Le biofilm présente une morphologie typique faite de microcolonies et de canaux qui les séparent. L'accès au substrat se fait par des phénomènes de convection et par diffusion (Stewart, 2012); la Figure I-20 met en évidence ces transferts. Les canaux irriguent l'ensemble du biofilm et assurent un apport en substrat par convection au plus près des clusters. Les substrats peuvent ensuite diffuser au sein des microcolonies au travers de la matrice et sont distribués aux cellules. Cependant, l'efficacité de ces phénomènes de diffusion peut être différente d'un substrat à l'autre, selon qu'il soit un gaz dissous ou un soluté par exemple. La concentration en composé dissous est dépendante de l'épaisseur du biofilm, (Figure I-20 gauche), et il existe des gradients de concentration et des différences de composition en ressources au sein d'un même biofilm. Cette hétérogénéité fait apparaître une multitude de microhabitats ou niches écologiques. Le biofilm va ainsi se structurer morphologiquement et microbiologiquement en réponse à cette diversité de substrats. Les différents taux de croissance, métabolismes, possibles coopérations d'une espèce à l'autre créent des zones, des localisations préférentielles pour chacune de ces espèces.

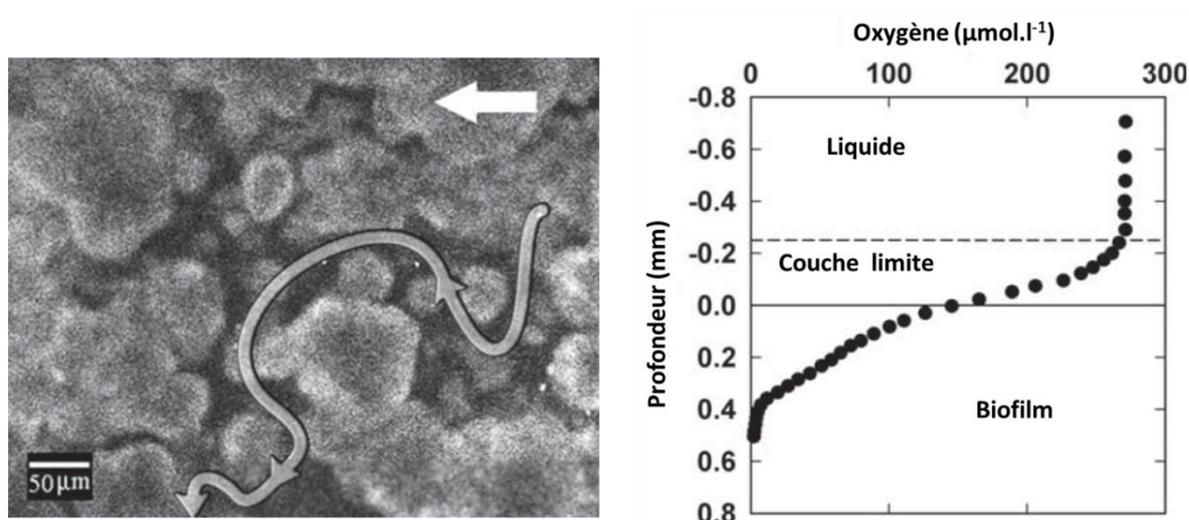


Figure I-20: Illustration des phénomènes de convection et de diffusion au sein du biofilm. A gauche : Vélométrie par suivi de particules démontrant le trajet de microbilles (flèche grise) entre les microcolonies du biofilm. La flèche blanche donne le sens de l'écoulement de la phase liquide. A droite : Evolution de la concentration en oxygène depuis la phase liquide jusque dans le biofilm mettant en évidence un transfert par diffusion au sein du biofilm. Profil obtenu par microélectrode (Stewart, 2012)

Un exemple illustrant la diversité de microhabitats est le concept de stratification des biofilms. Ras et al. (2013) ont démontré que la structure des communautés microbiennes trouvée dans les couches les plus basales du biofilm était sensiblement différente de celle constituant le biofilm pris dans sa globalité. Le même phénomène a été mis en évidence dans les biofilms mixtes de bactéries nitrifiantes – bactéries hétérotrophes (Ohashi et al., 1995; Okabe et al., 1996). Les espèces nitrifiantes et autotrophes ayant des faibles taux de croissance sont retrouvées dans les parties basales du biofilm alors les espèces hétérotrophes se retrouvent dans les couches plus superficielles. La stratification peut aussi être le résultat de la mise en place d'une chaîne trophique comme c'est le cas pour les biofilms et granules anaérobies (Batstone et al., 2006; Gupta et al., 1997). La Figure I-21 représente un biofilm méthanogène fixé sur un support-substrat ou support fermentescible. La stratification des communautés est corrélée à la succession des étapes du processus classique de la méthanisation : hydrolyse, acidogenèse et acétogenèse (retrouvées ici sous le terme de fermentation) et méthanogenèse.

Il faut noter ici que cette structuration via la formation de strates et de niches écologiques peut se faire non seulement de manière passive en réponse à la distribution en ressources,

mais aussi de manière active au moyen de la motilité cellulaire (Stoodley et al., 2002). Le twitching guidé par le chimiotactisme va permettre le regroupement de cellules et d'espèces ayant des substrats communs ou des rôles complémentaires au sein d'une même chaîne trophique, les produits d'une espèce étant les substrats d'une autre.

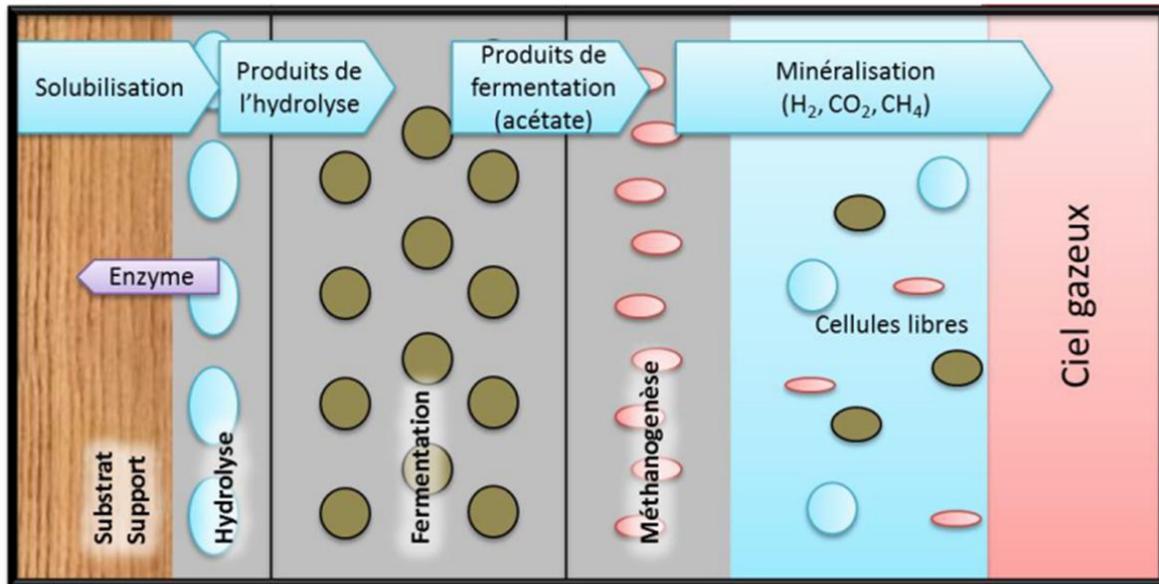


Figure I-21: Stratification au sein d'un biofilm méthanogène (Motte, 2013).

Cette stratification est non seulement microbiologique mais il existe des différences mécaniques (Derlon et al., 2008; Rochex et al., 2009). Derlon et al. (2008) ont soumis des biofilms à des tests d'érosion en leur appliquant des contraintes hydrodynamiques croissantes. Ils ont révélé une évolution des forces de cohésion au sein du biofilm en fonction de la profondeur de la couche considérée. Les couches inférieures ont présenté des résistances au détachement au-delà de 13 Pa alors que, sur ce même biofilm, les couches les plus superficielles se sont décrochées pour des contraintes inférieures à 0,3 Pa. Outre l'évolution des propriétés de cohésion avec la profondeur du biofilm, Ras et al. (2013) ont également identifié une stratification de sa densité. Les auteurs relient cette structuration à une composition en EPS différentes, notamment des quantités plus importantes d'EPS hydrophobes dans les couches basales. C'est probablement là que se trouvent le lien entre la structuration morphologique et la structuration microbiologique. Des populations microbiennes différentes peuvent produire des matrices différentes en termes de quantité et de composition, générant une stratification des propriétés physiques du biofilm qui fait suite à la stratification microbiologique.

Le point 5 de la Figure I-19 illustre l'importance des interactions microbiennes dans un biofilm. La promiscuité des cellules rend possibles les communications intercellulaires. Des groupes plus ou moins spécialisés dans une tâche émergent alors. Ainsi Hall-Stoodley et al. (2004) distinguent trois types de phénotypes au sein d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*. Le premier est le phénotype de production d'EPS : les cellules impliquées vont synthétiser de manière intense des EPS et sont les acteurs principaux de la formation de la matrice. Le second phénotype identifié est celui de la propagation : certaines cellules vont retourner à la phase liquide et présenter à nouveau un phénotype avec une motilité flagellée, et elles permettent ainsi la propagation de la colonie vers les zones voisines. Enfin le troisième phénotype évoqué est celui de la résistance : ces cellules présentent des résistances accrues face aux différentes agressions que peut subir la population et assurent la pérennité de la colonie.

Ces différenciations comportementales se font grâce aux interactions cellulaires et aux divers moyens de communications intercellulaires. Le moyen le plus fréquent est le quorum sensing. Il s'agit d'une coordination de l'expression génétique à l'échelle de la population. Cette régulation est primordiale et est directement liée à la densité de population microbienne. Davies et al. (1998) ont démontré l'importance du quorum sensing dans la différenciation au sein des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*, notamment via l'influence de ce type de communication sur la synthèse des EPS. Sauer et al. (2002) démontrent aussi l'activation des gènes impliqués dans le quorum sensing dans les heures qui suivent la formation du biofilm.

Comme cité précédemment, les interactions d'une cellule ou d'une espèce à l'autre peuvent être de différentes natures, tantôt compétitives ou coopératives (Tableau I 2). Ces interactions vont sculpter le biofilm et donner une logique structure-fonction aux différents compartiments qui le composent. Des spécificités morphologiques et des communautés différenciées émergent progressivement. Nadell et al. (2009) décrivent cette structuration comme à la fois passive, répondant aux différentes contraintes du milieu, et active, faite de coopération et de compétition, résumée par le terme de « sociobiologie ». Stoodley et al. (2002) comparent cette organisation à celle d'organismes supérieurs tels que les végétaux ou les animaux. Les spécialisations phénotypes, la localisation préférentielle des espèces, les architectures et propriétés mécaniques différenciées et les interactions entre chacun de ces compartiments peuvent être comparables à celles retrouvées au sein d'un organisme complexe, fait de différents tissus cellulaires et organes.

I.3.1.3 *Le biofilm mature*

Après acquisition de structures différenciées matures, le biofilm reste un système biologique dynamique et en interaction avec son milieu. Plusieurs phénomènes d'accumulation et de perte de biomasse se compensent. L'attachement et la croissance microbienne expliquent l'accumulation tandis que les pertes de biomasse sont dues aux détachements et à la mort cellulaire. Cependant, ces phénomènes ne se compensent généralement qu'en partie, et le biofilm mature va en réalité suivre un cycle où se succèdent l'accumulation et la perte de biomasse (Lewandowski et al., 2007). Cet enchaînement de cycles peut ne pas être détectable ou ne semble pas influencer le système dans sa globalité. Les auteurs soulignent cependant l'intérêt de l'échelle à laquelle le biofilm est étudié. En effet, à l'échelle macroscopique, le système peut sembler stable : les performances d'un bioréacteur dans le cadre de l'épuration d'eau par exemple peuvent être constantes. Néanmoins, à l'échelle microscopique, le biofilm peut présenter une diversité de structures au cours du temps, suivant ce cycle croissance-détachement-recroissance.

La problématique du détachement au sein des biofilms matures est un sujet très étudié (Elenter et al., 2007; Garny et al., 2008; Horn et al., 2003; Paul et al., 2012; Telgmann et al., 2004). Dans le cadre du traitement d'eau, le détachement est lié à la diminution des performances du procédé. Pour les biofilms négatifs, le détachement est synonyme d'augmentation des concentrations en microorganismes planctoniques et donc des risques sanitaires.

Les points 7 et 8 de la Figure I-19 donnent un aperçu de la diversité de ces phénomènes. Ils peuvent être actifs ou passifs, c'est-à-dire issus d'une régulation physiologique qui mène au détachement ou au contraire subis suite à des contraintes et agressions du milieu. La Figure I-22 résume ces différentes possibilités.

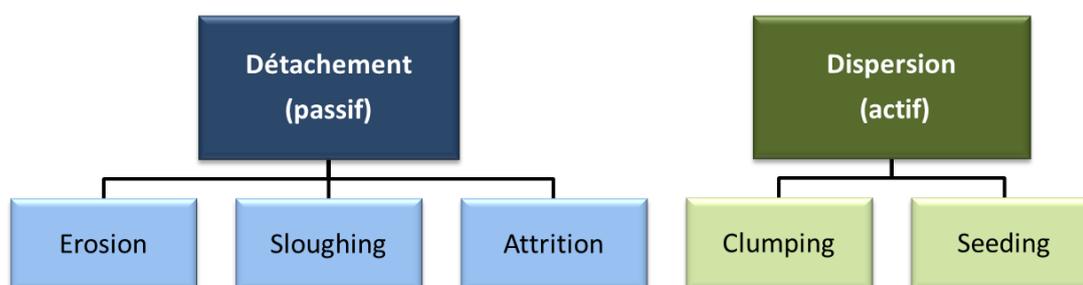


Figure I-22: Les différents mécanismes de décrochement du biofilm

Tout d'abord les phénomènes dits passifs sont essentiellement expliqués par les contraintes hydrodynamiques du milieu. Néanmoins certains événements, couplés aux conditions hydrodynamiques, peuvent augmenter l'importance des détachements, en termes d'occurrence ou de taille des éléments concernés. Le point 7 de la Figure I-19 en est un exemple. Un antibiotique, ou tout autre type d'agression, peut venir perturber les couches superficielles du biofilm. Celles-ci, affectées dans leur structure et leur activité biologique par cet agent chimique, sont susceptibles de se décrocher du biofilm. Trois types de détachement sont distingués, notamment en fonction de la taille de la fraction détachée (Bryers, 1988). L'érosion se définit comme la perte continue de petites parties du biofilm (Characklis and Marshall, 1990). Il peut s'agir de détachements de cellules individuelles ou de petits clusters ($< 25\mu\text{m}$) qui vont directement influencer la structure de surface du biofilm, en lissant plus ou moins les rugosités. L'attrition (ou abrasion) concerne des détachements du même ordre de grandeur, mais contrairement à l'érosion qui est causée directement par les contraintes exercées par le fluide, l'attrition est causée par des collisions entre le biofilm et des particules en suspension. Le sloughing quant à lui correspond à des détachements beaucoup conséquents en terme de taille (Garny et al., 2009). Il s'agit d'une perte massive et soudaine de biofilm sur toute son épaisseur. Son impact sur la structure morphologique est beaucoup plus flagrant que les deux phénomènes précédents.

Les phénomènes actifs quant à eux sont stimulés par des interactions et communications cellulaires entraînant des modifications de l'expression génétique (Stoodley et al., 2002). Hall-Stoodley et al. (2004) en distinguent deux types, le clumping et le seeding, qui sont caractérisés par le relargage dans la phase planctonique d'agrégats ou de cellules mobiles, respectivement. Ils sont considérés comme des processus actifs car ils sont corrélés à des diminutions de synthèse d'EPS voire à l'expression de gènes codant pour des enzymes dégradant les EPS (Stoodley et al., 2002). Généralement, le vecteur final de leur détachement est bien les conditions hydrodynamiques mais la population a rendu possible son propre détachement via une régulation de son expression génétique. Les processus actifs dits de dispersion peuvent être une stratégie de retour à la phase planctonique dans le but de prospecter et coloniser le milieu environnant.

Les biofilms matures sont des systèmes biologiques aux structures différenciées en interaction permanente avec leur milieu. Des cycles d'accumulation, caractérisés par une succession de détachement-recroissance, en font un système dynamique. Certains paramètres

vont participer activement à la structuration de ces biofilms. Les architectures, propriétés mécaniques et communautés microbiennes vont être plus ou moins influencées par des facteurs environnementaux tels que les conditions hydrodynamiques, l'histoire même du biofilm ou encore la prédation.

1.3.2 Les différents facteurs modifiant la structuration du biofilm

1.3.2.1 Les conditions hydrodynamiques

Les conditions hydrodynamiques, via les contraintes de cisaillement appliquées à l'interface, peuvent influencer directement le développement des microcolonies. Tout d'abord, suite à une division cellulaire, la cellule fille va naturellement se placer, guidée par l'écoulement, là où les contraintes de cisaillement sont les plus modérées (Brugnoni et al., 2011). Au fur et à mesure, une directionnalité dépendant du sens de l'écoulement peut apparaître. Quelques études ont aussi démontré l'impact d'un écoulement turbulent sur la distribution spatiale et sur la taille de ces microcolonies (Brugnoni et al., 2012; Pereira et al., 2002; Perni et al., 2006). Pereira et al. (2002) ont constaté chez *Pseudomonas fluorescens* une formation de microcolonies beaucoup plus importante en régime turbulent qu'en régime laminaire.

L'impact des conditions hydrodynamiques est encore plus flagrant sur les phénomènes de maturation et de différenciation des structures. Liu and Tay (2002) mentionnent qu'un fort cisaillement entraîne la formation d'un biofilm plus dense et plus fin (Figure I-23). La morphologie du biofilm est généralement plus homogène et lisse dans le cas de fortes contraintes hydrodynamiques. L'érosion, plus intense dans ce cas, va continuellement débarrasser le biofilm de ces rugosités et lisser sa surface. La quantité et la composition de la matrice en EPS peut aussi évoluer avec le cisaillement, expliquant en partie l'augmentation de la densité. En effet, le rapport entre la concentration en polysaccharides et celle en protéines au sein de la matrice tend à augmenter avec le cisaillement.

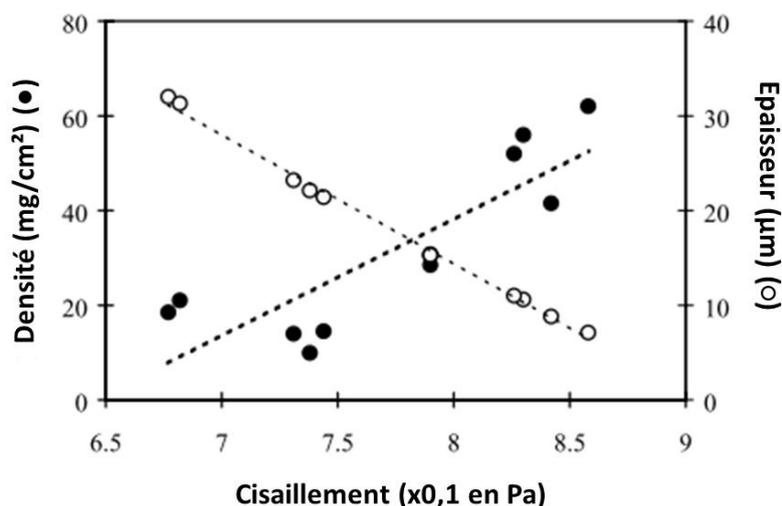


Figure I-23: Impact du cisaillement sur la densité et l'épaisseur du biofilm (adaptée de Liu and Tay (2002)).

Une augmentation de la densité du biofilm est également observée lorsque des cisaillements élevés sont appliqués après acquisition de ces structures matures (tests d'érosion). Ce phénomène est aussi appelé compaction ou compression (Casey, 2007; Paul et al., 2012). Lapidou et Rittmann (2004) vont même plus loin en identifiant une série d'adaptations morphologiques suite à une augmentation soudaine du cisaillement. Ils ont nommé ce mécanisme « consolidation ». En plus de la compaction et des événements de détachement plus fréquents, il est noté une croissance non plus dans le sens de l'épaisseur mais plutôt visant à combler les vides interstitiels entre microcolonies. La rugosité et la porosité du biofilm vont donc diminuer. L'accumulation de matières inertes dans les couches inférieures est aussi mentionnée et participe à l'augmentation de la densité du biofilm basal. Ceci va aussi permettre de renforcer la stratification des forces de cohésion.

Les conditions hydrodynamiques vont aussi influencer les communications intercellulaires (Liu and Tay, 2002). Le quorum sensing, comme la plupart des mécanismes de communications entre microorganismes, se fait au moyen de molécules libérées hors de la cellule et qui diffusent dans le milieu. Le quorum sensing repose sur la densité de population et la concentration de ces molécules « signal ». Cependant, l'augmentation de la densité réduit la vitesse du transport de ces molécules. En outre, l'augmentation des forces convectives peut provoquer le lessivage de ces molécules hors du biofilm et les rendre inopérantes. Via l'augmentation de la densité et les forces convectives, la concentration requise pour générer le

quorum sensing peut ne pas être atteinte. Certains échanges vont être compromis, influençant la régulation génétique et donc la structuration du biofilm.

Concernant la structuration microbienne, les études menées tendent à démontrer que le cisaillement ralentirait la maturation microbienne et maintiendrait un biofilm jeune (Besemer et al., 2007; Rochex et al., 2008). Au début du développement du biofilm, une diversité abondante est notée, directement dépendante des phénomènes d'adhésion. Les compétitions pour le support et pour les substrats entraînent une diminution de la diversité microbienne du biofilm. Enfin la présence de différents microhabitats permet une augmentation de la diversité. Les contraintes hydrodynamiques en agissant sur une multitude de paramètres comme le détachement, l'accès au substrat, les communications intercellulaires vont ralentir l'enchaînement de ces trois étapes.

Un autre levier d'action essentiel des conditions hydrodynamiques sur la structuration du biofilm est le transfert de masse, en particulier l'accès au substrat. Un paramètre primordial permettant de comprendre la morphologie du biofilm est le rapport entre l'accès au substrat et le taux de croissance de la population microbienne (Picioreanu et al., 1998; van Loosdrecht et al., 2002). La Figure I-24 présente l'influence de ce ratio sur la structure du biofilm.

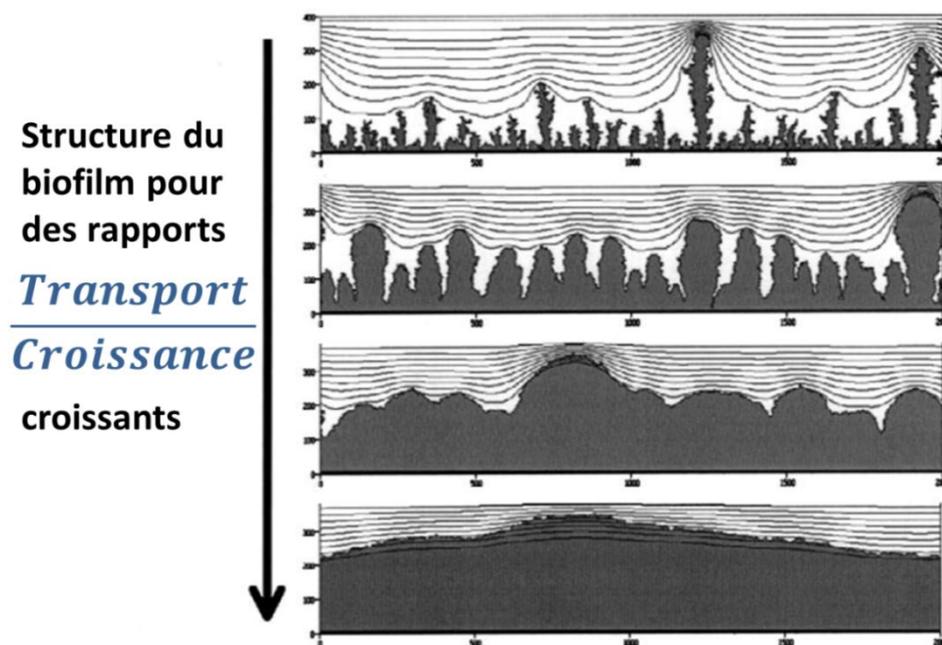


Figure I-24: Modèle simulant l'évolution de la structure du biofilm en fonction de l'accès au substrat et de la croissance microbienne (adaptée de Picioreanu et al. (1998)). Les

abscisses et les ordonnées donnent en micromètres la largeur et l'épaisseur du biofilm, respectivement.

Le biofilm est représenté en gris et les lignes noires sont les lignes d'iso-concentration du substrat.

De la figure de haut à celle du bas, le biofilm passe d'un régime où l'accès au substrat est limitant à une situation où la croissance microbienne est maximale et constitue le facteur limitant. Lorsque que le substrat est limitant, les microorganismes y ayant accès et présentant les taux de croissance les plus élevés vont progressivement se développer. Ce développement est naturellement dirigé vers le substrat, donc vers la phase liquide. Un biofilm très hétérogène se forme avec une succession de structures dites en « doigt » ou « champignon » et des vallées où le substrat est de moins en moins présent avec la croissance de ces mêmes structures. Dans le cas d'une croissance limitante et d'un accès au substrat suffisant, une structure superficielle beaucoup plus homogène et lisse émerge. L'ensemble du biofilm peut progresser et croître, de manière isotropique dans la mesure où le substrat est bien distribué (Picioreanu et al., 2000; van Loosdrecht et al., 2002).

Des structures filamenteuses peuvent aussi apparaître et leur présence est mettre en lien avec le régime d'écoulement (Rusconi et al., 2011; Stoodley et al., 1998). Ces structures, les streamers, sont constituées d'une base, ou tête, fixée au support, et d'un prolongement qui va osciller avec l'écoulement dans la phase liquide. Ce type d'architecture, capable d'accéder à l'écoulement et à la zone de mélange convectif, présente un avantage stratégique quant à l'accès au substrat (Taherzadeh et al., 2012, 2010). Ces oscillations lui assurent un transfert plus efficace et entretiennent son élongation. Ces structures tout à fait particulières sont aussi le témoignage d'une relation étroite entre l'accès au substrat, la morphologie du biofilm et les conditions hydrodynamiques.

Ainsi, les conditions hydrodynamiques influent directement sur ce rapport transport/croissance. Le transport et l'accès au substrat dépendent directement du régime d'écoulement. En modifiant l'hydrodynamique, c'est donc directement ce ratio et la structure du biofilm qui sont altérés. Ainsi, dans le cas d'une augmentation de la turbulence du milieu, les forces convectives augmentant, le substrat est distribué de manière plus homogène à l'ensemble du biofilm. Si la concentration en substrat est suffisante, la croissance microbienne est limitante et une structure homogène est obtenue. Il faut ajouter à cela, la recrudescence des phénomènes d'érosion qui tendent à lisser d'autant plus la surface du biofilm (van Loosdrecht et al., 2002). De plus, il existe des interactions permanentes entre ces trois mécanismes que sont l'accès au substrat, la croissance et la structuration du biofilm et les contraintes hydrodynamiques. Ces interactions continues d'un facteur sur l'autre constituent l'histoire du biofilm.

I.3.2.2 L'histoire du biofilm

La structure du biofilm exerce donc un impact significatif sur les paramètres mêmes qui en sont à l'origine. L'histoire du biofilm, sa structuration, va donc participer à sa propre évolution en influençant les paramètres clés opérants. Un biofilm placé dans les mêmes conditions opératoires mais à différents moments de son développement ne va pas systématiquement s'adapter et réagir de la même manière (Elenter et al., 2007; Ohashi et al., 1995; Telgmann et al., 2004). Comme point d'orgue de ce mécanisme, Lewandowski et al. (2004) notent le premier événement de détachement. Cette première modification drastique de la structure du biofilm va le faire entrer dans une logique de croissance – détachement – recroissance qui lui sera propre. Les auteurs insistent sur le fait que c'est ce mécanisme qui explique la difficulté d'obtenir des résultats reproductibles d'un biofilm mature à l'autre, même dans des conditions opératoires identiques. L'influence de ce premier détachement sur la suite de la structuration du biofilm a aussi été constatée par Telgmann et al. (2004). Des expériences de détachement provoqué, en augmentant la vitesse de l'écoulement, sont opérées à différents moments dans le développement du biofilm. Des morphologies significativement différentes émergent témoignant de l'impact important de l'histoire du biofilm sur sa structuration.

Les mécanismes mis en jeu sont les mêmes que ceux cités précédemment mais c'est surtout leur interconnection, leur influence les uns sur les autres qui va entretenir l'effet de l'histoire du biofilm sur sa structuration à venir. Comme Picioeanu et al. (2000) le mettent en exergue, les interactions entre la morphologie du biofilm, l'accès au substrat et les conditions hydrodynamiques sont d'autant plus intéressantes qu'elles s'alimentent l'une l'autre. Ces relations sont résumées par la Figure I-25:

- 1 : Les conditions hydrodynamiques et les phénomènes de convection et diffusion assurent la distribution du substrat au biofilm.
- 2 : Accédant au substrat, le biofilm peut se développer et croître, il va acquérir une morphologie dépendante de cet accès au substrat.
- 3 : Certaines structures, comme les streamers, ont des croissances directement orientées là où le substrat est disponible, elles vont être capables d'accéder à des zones plus favorables. D'autre part, la densité du biofilm va directement influencer l'accessibilité au substrat, la diffusion pouvant être sensiblement affectée par des densités importantes.

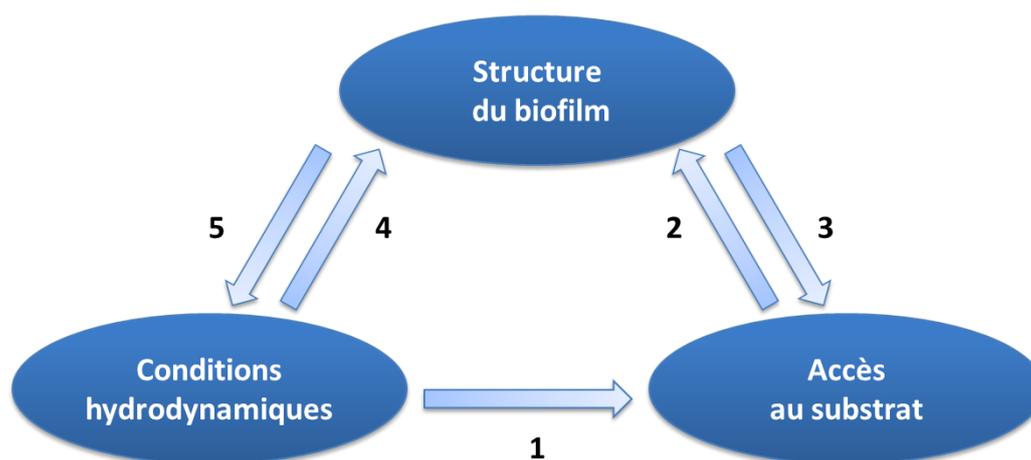


Figure I-25 : Interconnexions entre hydrodynamique – substrat – structure du biofilm

- 4 : des phénomènes de détachements et d'érosion apparaissent au fur et mesure que le biofilm se développe. Ils sculptent directement la morphologie du biofilm, en lissant sa surface via l'érosion, ou en créant des vides importants via le sloughing. En outre, la densité et l'épaisseur du biofilm sont corrélées au cisaillement. Ceci peut compromettre l'accès substrat (point 3).
- 5 : L'ensemble du développement du biofilm va modifier les paramètres hydrodynamiques locaux tels que le cisaillement, la vitesse ou la direction de l'écoulement. Que cela soit dû aux détachements (point 4) ou la croissance (point 2), les conditions hydrodynamiques vont évoluer avec le développement du biofilm. Cela même va jouer sur l'accès au substrat (point 1) et donc la croissance du biofilm (point 2), les phénomènes de détachements et d'érosion (point 4).

1.3.2.3 *Les phénomènes de prédation*

Un biofilm peut aussi être le siège d'une prédation intense. Les eucaryotes, les métazoaires comme les nématodes et les rotifères, ou les protozoaires comme les amibes et les ciliés, jouent le rôle de prédateurs en se nourrissant d'organismes procaryotes. Les impacts de cette prédation sur le biofilm sont généralement à la fois morphologiques et microbiologiques (Derlon et al., 2012; J. Li et al., 2013; Pons et al., 2009). Deux mécanismes distincts peuvent avoir un impact sur le biofilm.

Lors de prédation, une partie de la biomasse bactérienne est effet mobilisée par les eucaryotes pour les nourrir. La prédation peut ne pas être faite de manière homogène sur

l'ensemble de la population bactérienne, la taille, l'état et la localisation de la bactérie affectant sa probabilité d'être captée (Paris et al., 2007; Young, 2006). Cela va participer à la structuration morphologique et microbiologique du biofilm. Ainsi Young (2006) rapporte les mécanismes de défense bactériens pour faire face à la prédation, notamment leur taille. Les bactéries les plus petites ont mathématiquement moins de chances de rencontrer leurs prédateurs et les plus grandes seront trop grosses pour être ingérées. Paris et al. (2007) ont noté, dans des biofilms mixtes et monocouches, une prédation préférentielle exercée par des amibes sur les cellules isolées par rapport aux cellules des microcolonies. En outre, il existe plusieurs modes de prédation en fonction du mécanisme permettant de se saisir de la proie. Böhme et al. (2009) ont démontré un impact significatif non seulement de la prédation mais du mode de prédation sur la morphologie des biofilms.

Le second mécanisme concerne la mobilité des prédateurs. Si certains sont sessiles, d'autres vont se mouvoir au sein du biofilm sculptant sa morphologie à leur passage. Leur mouvement pour se frayer un chemin au sein du biofilm va provoquer la création de nouveaux canaux avec des microcolonies plus nombreuses (Böhme et al., 2009; Derlon et al., 2012). La Figure I-26 montre l'impact d'une prédation plus ou moins intense sur la morphologie d'un biofilm membranaire multi-espèce.

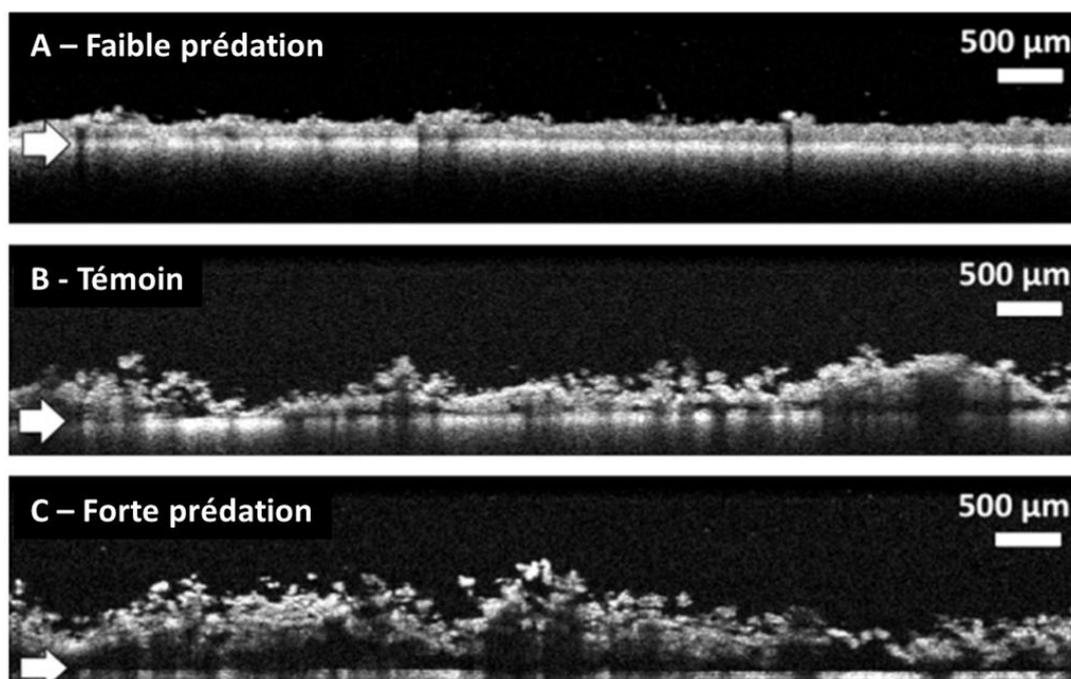


Figure I-26 : Impact de la prédation sur la structure de biofilms membranaires (adaptée de Derlon et al. (2012)). Images obtenues par Tomographie Optique Cohérente (OCT). La flèche blanche indique la surface de la membrane.

La rugosité et la porosité du biofilm augmentent drastiquement avec la prédation. Cela va aussi engendrer une sensibilité plus grande aux phénomènes de détachement dans la mesure où le biofilm, altéré, ne présente plus les mêmes forces de cohésion. Ainsi, que cela soit en termes de concentration en biomasse bactérienne, du nombre et de la taille des microcolonies, de la rugosité et de la porosité du biofilm, la prédation va structurer le biofilm, aussi bien sa morphologie et que sa communauté bactérienne.

1.3.3 Les techniques d'études adaptées

L'objet de cette partie n'est pas de dresser une liste exhaustive des différents outils possibles pour l'étude des biofilms mais de présenter succinctement les techniques les plus couramment rencontrées dans la littérature.

1.3.3.1 Les dispositifs expérimentaux

Différents dispositifs de culture peuvent être utilisés en fonction de l'objectif de l'étude. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les chambres d'écoulement sont particulièrement appropriées pour les études d'adhésion. Elles peuvent aussi s'avérer pertinentes pour des certaines études sur le développement du biofilm. Mais étant données les faibles dimensions du système, il s'agira principalement de culture de biofilms peu épais en régime laminaire. Ces chambres d'écoulement sont ainsi retrouvées dans les domaines de l'eau potable et médical (Davies and Geesey, 1995; Paris et al., 2007; Park et al., 2011; Walter et al., 2013).

Pour la maturation de biofilm multi-espèces en régime turbulent, d'autres réacteurs spécifiques sont généralement utilisés. Le réacteur de Couette-Taylor, ou réacteur annulaire rotatif, est un des plus fréquents (Gagnon and Slawson, 1999; Lawrence et al., 2000; Milferstedt et al., 2009; Pechaud et al., 2012; Tsai et al., 2004). Il est constitué de deux cylindres concentriques dont l'un est rotatif et l'autre fixe. La phase liquide est localisée entre les deux cylindres et le biofilm se développe sur des coupons placés sur l'un des cylindres. Une large gamme de matériaux peut être testée. Les coupons sont aisément prélevés sans heurt pour la biomasse, et peuvent être facilement observés en microscopie. Ce réacteur présente des avantages particulièrement pertinents pour les études concernant l'hydrodynamique. Les écoulements et le cisaillement peuvent être déterminés avec précision. La

géométrie du réacteur permet aussi un mélange complet de la phase liquide. Une description plus complète de ce genre de réacteur est réalisée dans la section II.1.1.

Le réacteur tubulaire est un autre réacteur fréquemment rencontré dans la littérature (Elenter et al., 2007; Horn and Hempel, 1997a, 1997b). Comme son nom l'indique il s'agit d'un tube dont certaines fractions sont détachables et servent à l'observation microscopique. Des régimes laminaires et turbulents peuvent être établis en fonction de la vitesse du fluide et des sections de la conduite. Des microélectrodes, utilisées entre autres pour déterminer les coefficients de diffusion de composés dissous, sont facilement installées sur le système permettant des mesures directement en réacteur.

D'autres types de système de culture des biofilms peuvent être croisés dans la littérature (Horn, 2012), notamment les colonnes à bulles (Milferstedt et al., 2013; Saur et al., 2014), les disques rotatifs (Brugnoni et al., 2011; Pons et al., 2009), les lits fluidisés (M. Li et al., 2013; van Loosdrecht et al., 2002), les réacteurs membranaires (Derlon et al., 2012; Martin and Nerenberg, 2012) ou encore le réacteur canal (Besemer et al., 2009b, 2007). Chaque type de réacteur permet de mimer et étudier au mieux un procédé ou un paramètre opératoire et structurant du biofilm. Ainsi les biofilms développés sur les membranes ou en réacteur canal permettent de représenter au mieux les procédés de filtration et de colmatage et le développement de biofilms de rivière, respectivement.

I.3.3.2 Les techniques d'observation

Comme cela a été dit précédemment, il existe une multitude de techniques de microscopie possibles. Néanmoins avec le développement du biofilm, l'échelle microscopique peut ne plus s'avérer la plus pertinente. Il faut alors faire appel à de nouveaux outils d'observation pour les échelles méso- et macroscopique. La Figure I-27 témoigne de la pertinence de l'outil en fonction de la dimension de l'objet à observer.

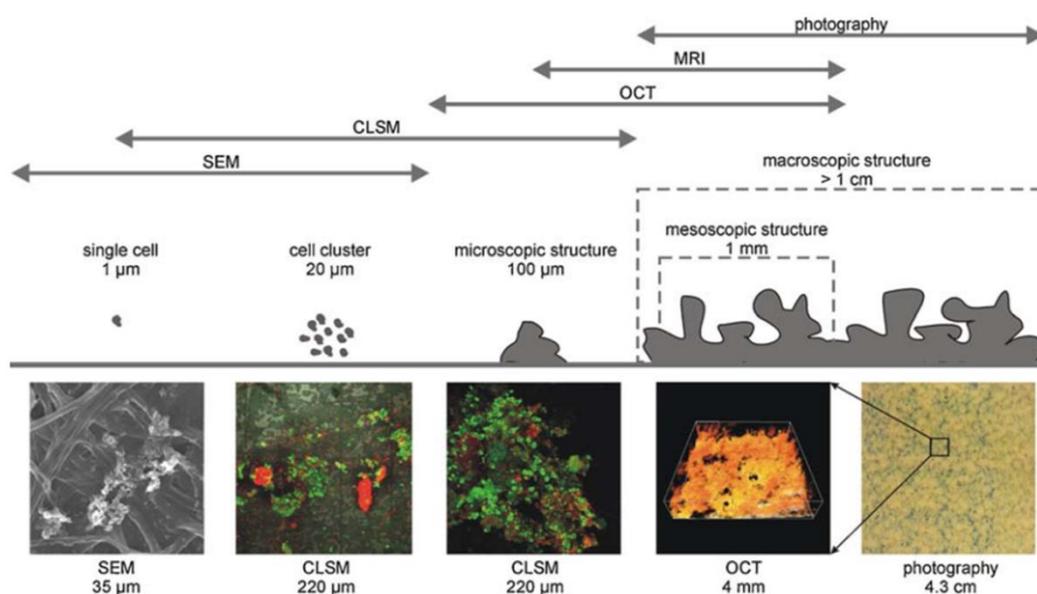


Figure I-27 : Les différents outils d'observations des biofilms en fonction de l'échelle considérée (adaptée de Wagner et al. (2010)). SEM = Microscopie électronique à balayage, CLSM = Microscopie confocale à balayage laser, OCT = Tomographie Optique Cohérente, MRI = Microscopie à résonance magnétique

La microscopie électronique à balayage, dont le fonctionnement a été expliqué précédemment, est particulièrement intéressante pour des cellules isolées et des clusters de faible diamètre. Son intérêt est donc logiquement concentré sur les étapes d'adhésion et les biofilms monocouches.

Vient ensuite la microscopie confocale à balayage laser (CLSM de l'anglais Confocal Laser Scanning Microscopy). L'observation de biofilms plus épais et de microcolonies jusqu'à 100 µm de diamètre est possible. L'originalité de la technique réside dans le fait que seules les parties de l'échantillon situées dans le plan focal sont capturées. Contrairement à la microscopie optique classique où l'échantillon est éclairé sur une large surface, le CLSM utilise un laser, un faisceau lumineux concentré, qui balaye la surface de l'échantillon (axes X et Y). Un système de sténopé permet de bloquer les photons réfléchis n'étant pas issus du plan focal considéré, seuls les points images conjugués des points objets sont conservés (d'où le terme « confocale »). Le système réalise ce balayage pour un ensemble de plans focaux (axe Z) et la reconstruction de ces différentes coupes permet une acquisition en trois dimensions de l'échantillon. Cette technique de microscopie optique à fluorescence permet d'obtenir des structures tridimensionnelles de l'échantillon sans pour autant être invasive. Dans l'étude de la structuration du biofilm, cet outil est particulièrement intéressant puisqu'il permet d'obtenir

des informations morphologiques, via la structure en 3D, et des données microbiologiques, via des longueurs d'onde de fluorescence pouvant être propres à chaque espèce (Neu, 2012).

Au fur et à mesure que le biofilm se développe et que ses dimensions augmentent, des observations à l'échelle millimétrique deviennent nécessaires pour mieux caractériser la structure du biofilm. La tomographie optique cohérente (OCT de l'anglais Optical Coherence Tomography) repose sur l'interférométrie lumineuse et la pénétration de la lumière dans l'échantillon. Une source lumineuse émet un faisceau qui va être divisé en deux : une partie va venir se réfléchir sur une surface donnée de l'échantillon, une seconde sur un miroir de référence. La combinaison des deux rayons réfléchis, l'un issu de l'échantillon, l'autre du miroir, donne un profil d'interférence, interprétable si les deux rayons ont parcouru la même distance. En faisant varier la position du miroir de référence, il est ainsi possible d'obtenir des profils d'interférence sur l'ensemble de la profondeur de l'échantillon (A-scan). En faisant de même sur l'ensemble de la surface (B-scan), la structure 3D de l'échantillon peut être reconstruite. Cet outil, non invasif, est approprié notamment pour l'acquisition de la morphologie du biofilm, non seulement de surface mais aussi dans son épaisseur (Wagner, 2012).

Enfin, pour des échelles encore plus globales, de l'ordre de la dizaine de millimètre voir du centimètre, la stéréomicroscopie devient une solution de choix. Il s'agit de microscopie optique classique avec des possibilités d'utilisation en fluorescence, contrairement à l'OCT.

1.3.3.3 Les techniques d'investigation du biofilm

1.3.3.3.1 La caractérisation physique

Plusieurs techniques de caractérisation physique des biofilms peuvent être utilisées pour déterminer la biomasse attachée, l'épaisseur ou encore la densité. Elles peuvent se faire directement sur le matériel biologique brut ou par analyse d'image. Pour les techniques directes, il va s'agir de d'égouttage, de séchage et de pesées aux moments opportuns pour déterminer la biomasse humide ou sèche. A partir de ces pesées il est aussi possible de retrouver la densité et l'épaisseur du biofilm (Horn and Hempel, 1997b). Par analyse d'image, il est possible d'accéder à ces mêmes éléments. Les niveaux de gris peuvent ainsi être corrélés à la quantité de biomasse (Pons et al., 2009). Suite à une calibration efficace, les méthodes directes, plus longues, peuvent ainsi être remplacées. De même, l'épaisseur peut être

déterminée par analyse d'image, soit par analyse de vues en coupe (Derlon, 2008) ou par analyse de variance des niveaux de gris (Lauvvik and Bakke, 1994)

I.3.3.3.2 *La caractérisation physico-chimique*

Une autre méthode répandue pour caractériser les biofilms consiste à utiliser des microélectrodes. Ces microcapteurs sont des sondes dont la pointe peut être directement plongée dans le biofilm. Le diamètre de cette pointe est de l'ordre de quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres. Parmi ces capteurs, il existe les microélectrodes électrochimiques. Il en existe quatre catégories : potentiométriques, ampérométriques, voltamétriques ou encore les microbiocapteurs. Au-delà des microélectrodes électrochimiques, il existe celles à fibre optique. De manière générale, ces capteurs servent à déterminer essentiellement des concentrations chimiques. Il est possible d'accéder au pH, aux concentrations en ions (NO_3^- , NH_4^+ ...), en gaz dissous (O_2 , H_2 ...). La température, les UV et la fluorescence peuvent être déterminés ainsi également (Kühl, 2012).

I.3.3.3.3 *La caractérisation biochimique*

La caractérisation biochimique précise des EPS reste une difficulté majeure encore aujourd'hui en dépit de l'importance de ces substances dans la structuration morphologique des biofilms. Des techniques de marquage moléculaire couplées à la microscopie confocale permettent d'identifier préférentiellement certaines molécules, notamment les lectines (Neu et al., 2001). Des procédés d'extraction et de caractérisation partielle sont aussi rencontrés et permettent d'approfondir progressivement la connaissance de ce sujet précis (Ras et al., 2013).

I.3.3.3.4 *Les communautés microbiennes*

Le moyen le plus couramment rencontré dans la littérature reste la microscopie à fluorescence, notamment via le CLSM. Comme nous l'avons vu précédemment, cette technique permet de marquer préférentiellement telle ou telle espèce ou population (Besemer et al., 2007). Il existe une très grande variété de fluorochrome avec des spécificités propres. Certaines molécules peuvent ne marquer que les eucaryotes ou que les bactéries Gram positif, etc. Il est aussi possible de ne marquer qu'une séquence d'ADN bien précise. Cette technique appelée FISH (Fluorescent In-Situ Hybridization) consiste à utiliser des sondes nucléiques marquées. Ce fragment d'ADN simple brin marqué va se fixer à la séquence complémentaire dans la cellule. Grâce à un choix de séquence appropriée, des populations spécifiques peuvent

être marquées (Elenter et al., 2007). Des informations aussi bien de composition microbiologique du biofilm que de distribution spatiale des populations peuvent ainsi être recueillies.

D'autres outils moléculaires existent pour caractériser les communautés microbiennes. Ils se basent notamment sur l'extraction d'ADN et son amplification. Il est fréquemment trouvé dans la littérature les techniques de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) ou encore RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Besemer et al., 2009a; Rochex et al., 2008). L'ensemble de ces techniques visent à séparer les produits PCR en fonction de la souche microbienne dont ils sont issus. Ceci peut se faire grâce à leur taille, leur séquence, leur conformation. Des techniques de séquençage peuvent aussi être utilisées (Pierra et al., 2014). Ces différents outils moléculaires permettent de caractériser la diversité de la communauté microbienne ainsi que l'abondance relative de chaque espèce.

1.4 Les objectifs de l'étude

Cette étude bibliographique démontre la complexité de cet objet d'étude qu'est la structuration d'un biofilm. Dès les étapes d'adhésion, de nombreux paramètres sont capables d'influencer la structuration morphologique du biofilm ainsi que la distribution spatiale et la composition de la flore attachée. Avec les étapes ultérieures du cycle du biofilm, la structuration acquiert un niveau supérieur de complexité. Des architectures et morphologies diverses apparaissent, le biofilm et ses différentes populations se stratifient, s'agencent et s'organisent. Cet état de l'art met en exergue le rôle primordial des conditions hydrodynamiques sur l'ensemble du cycle de vie du biofilm. Cependant bien d'autres paramètres, comme les propriétés morphologiques et physicochimiques de la cellule, l'accès au substrat ou encore la prédation, entrent en ligne de compte. Il ressort aussi de cette synthèse l'intrication de ces différents mécanismes structurants rendant extrêmement délicate l'analyse de leur impact direct.

La synthèse bibliographique accorde une place importante aux conditions hydrodynamiques. Cela s'explique tout d'abord par leur influence directe ou indirecte sur la structuration des biofilms, via les diverses interactions avec d'autres paramètres. En outre, elles représentent un facteur important dans notre projet, tantôt utilisées directement comme paramètre d'étude ou encore comme outil pour faire varier la structure des biofilms.

Ainsi, malgré l'abondance des études sur la structuration des biofilms, de nombreux aspects restent encore à approfondir. Que cela soit pour les biofilms positifs ou négatifs, l'étude de la structuration de ce système biologique présente un intérêt majeur. Mieux comprendre son développement peut permettre de façonner le biofilm selon notre propre intérêt, de la prévention de son développement à l'optimisation de son activité. Ce projet de thèse vise donc élargir le champ de connaissance dans ce domaine. Afin de donner une dimension plus concrète et applicative à nos travaux, nous avons veillé à être au plus proche des conditions rencontrées dans la plupart des industries et bioprocédés environnementaux, notamment en travaillant en écoulement turbulent et avec des consortia microbiens mixtes.

La Figure I-28 résume l'ensemble du projet de thèse, en mettant en relief les originalités de la démarche vis-à-vis de littérature scientifique du domaine. Nous nous sommes focalisés

sur trois étapes : l'adhésion, le développement et le biofilm mature, afin d'approfondir pour chacun d'eux les connaissances des phénomènes régissant la structuration du biofilm. Dans chaque section, nous nous sommes concentrés sur un paramètre influent, le cisaillement, l'histoire du biofilm et la prédation, respectivement.

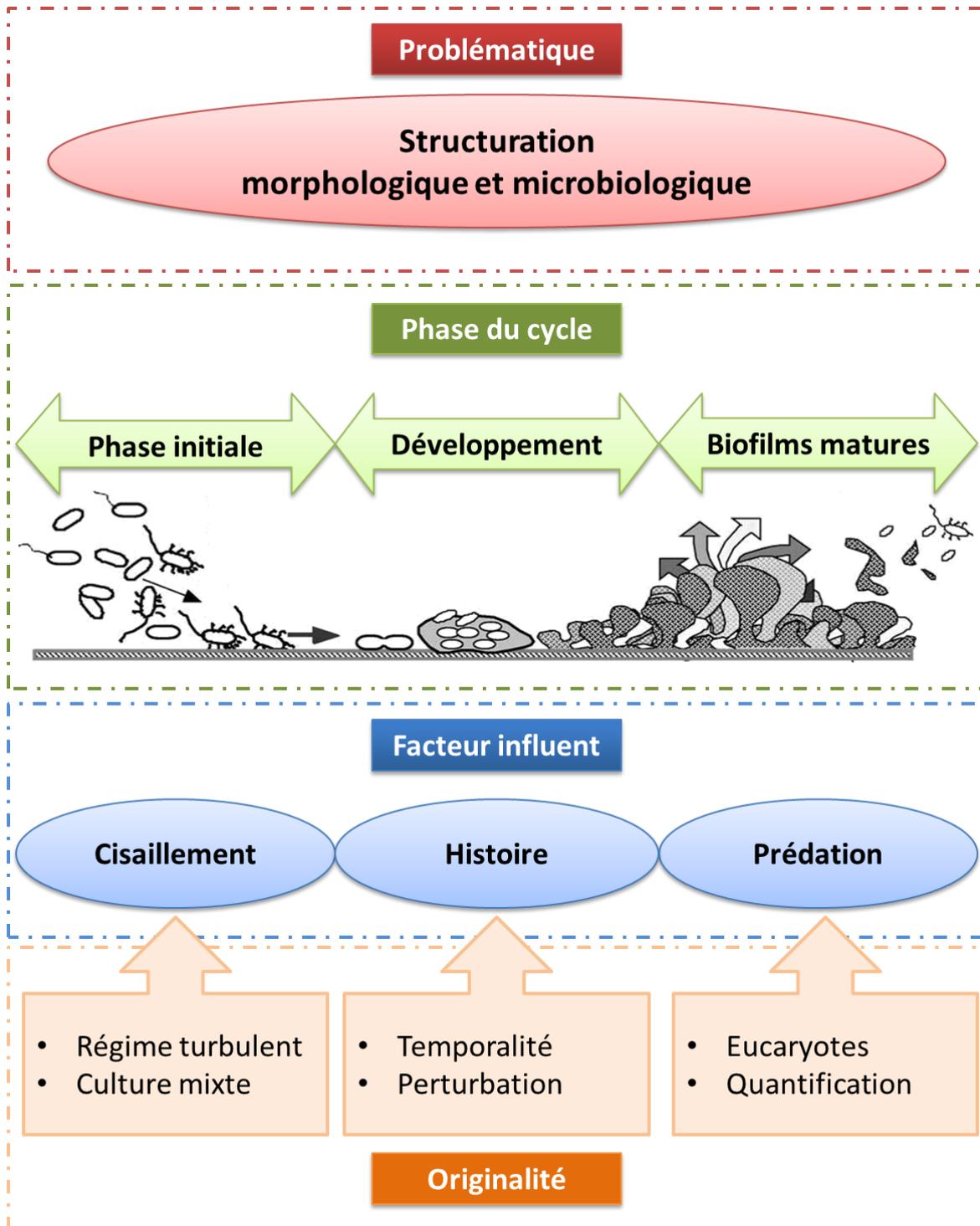


Figure I-28 : Objectifs et stratégie du projet de thèse (schéma du biofilm adapté de Ghigo (2003)).

Comme cela a pu être constaté dans la synthèse bibliographique, la littérature concernant l'adhésion microbienne est très riche, notamment au sujet de l'impact des conditions hydrodynamiques. Néanmoins, la grande majorité des travaux est effectuée en souche pure et en régime laminaire. Le premier objectif de ce travail est donc d'apporter un autre regard sur l'adhésion microbienne en l'étudiant dans des conditions hydrodynamiques turbulentes et avec des inocula multi-espèces, conditions opératoires plus appropriées aux biotechnologies de l'environnement. Des observations à l'échelle micrométrique ont été réalisées via l'utilisation de microscopie à fluorescence. Elles sont complétées d'une caractérisation par empreinte moléculaire des communautés microbiennes.

Le second objectif de ce projet de thèse est d'approfondir les connaissances de l'impact de l'histoire du biofilm sur sa propre structuration. Faisant suite aux travaux sur l'adhésion, il est en effet cohérent de s'interroger sur la conservation ou non des structures acquises par le biofilm lorsque celui-ci est soumis à des perturbations de son milieu à différents moments de son développement. Il est donc question ici du rapport entre la temporalité des structures – leur conservation – et le développement ou l'âge du biofilm lorsqu'il est soumis à une perturbation, ici hydrodynamique. Là encore, la littérature présente un vide flagrant sur ses aspects. Pour cette étude, la stéréomicroscopie a été privilégiée afin d'obtenir une caractérisation millimétrique et non plus micrométrique du développement du biofilm. Les empreintes moléculaires ont également permis de suivre la structuration microbiologique du biofilm.

Le dernier volet s'intéresse aux biofilms matures. La littérature démontre un impact important de la prédation sur la structure des biofilms. Néanmoins elle se focalise sur les organismes protozoaires. L'originalité a consisté ici à étudier des prédateurs eucaryotes, particulièrement intéressant dans le domaine de l'épuration de l'eau, et à être capable de les quantifier, leur nombre influençant directement la structure du biofilm. Ici aussi le travail s'est focalisé sur une échelle millimétrique, plus appropriée pour une caractérisation et un suivi macroscopique des biofilms matures. Des techniques d'analyse d'image réalisées sur les acquisitions obtenues par stéréomicroscopie ont été développées pour mener à bien cette étude.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1 Les dispositifs expérimentaux

Pour mener à bien l'ensemble des travaux de thèse, deux types de réacteurs ont été utilisés selon l'étape du cycle de vie du biofilm : réacteur de Couette-Taylor et colonne à bulles. Le premier type de réacteur a été mis en œuvre pour l'étude des phénomènes d'adhésion. Les colonnes à bulles quant à elles ont servi aux travaux sur le développement et les biofilms matures.

II.1.1 L'adhésion : réacteur de Couette-Taylor

II.1.1.1 Présentation du réacteur

Le réacteur de Couette-Taylor (CTR) se présente sous forme de deux cylindres concentriques, l'un rotatif, l'autre fixe. Le dispositif utilisé (Figure II-1) est le modèle 1320LJ de la société Biosurface Technologies Corp., Bozeman, Etats-Unis.

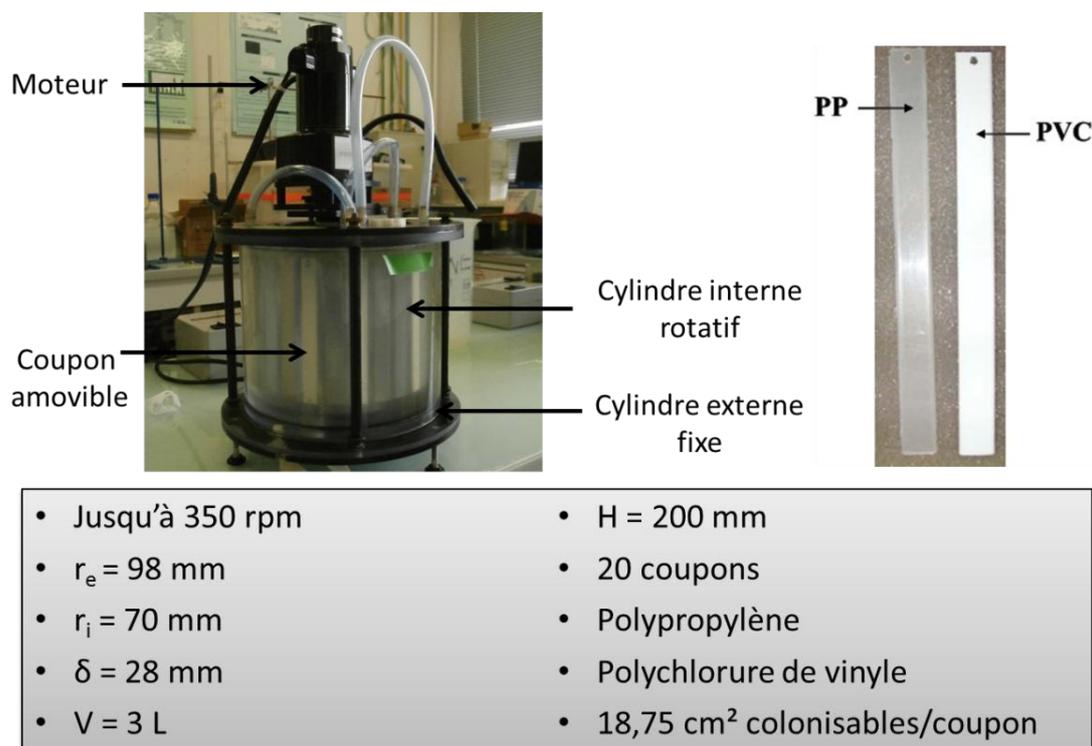


Figure II-1 : Réacteur de Couette-Taylor et caractéristiques du dispositif utilisé. r_e : rayon du cylindre externe, r_i : rayon du cylindre interne, δ : entrefer (distance entre les deux cylindres), H : hauteur, V : volume.

Un moteur assure la rotation du cylindre interne, et sa vitesse est modifiable de 25 à 350 rotations par minute (rpm). C'est l'espace entre les deux cylindres qui constitue le volume utile de la phase liquide. Sur le cylindre interne, 20 emplacements sont disponibles pour héberger des coupons sur lesquels le biofilm va croître. Ces coupons sont biseautés de manière à épouser le plus parfaitement possible leur emplacement sur le cylindre (photo de gauche de la Figure II-1). Ainsi les perturbations de l'écoulement de la phase liquide dues aux irrégularités géométriques sont minimisées. Dans notre cas, deux types de matériaux ont été étudiés : le polypropylène (PP) et le polychlorure de vinyle (PVC). Chaque coupon présente une surface colonisable de 18,75 cm².

Les CTR sont fréquemment rencontrés dans la littérature et présentent de nombreux avantages (Characklis and Marshall, 1990; Lawrence et al., 2000; Rochex et al., 2008). Tout d'abord, la phase liquide est parfaitement mélangée et les conditions hydrodynamiques sont homogènes. Le cisaillement est uniforme pour toute la surface colonisable des coupons. Ce type de réacteur est aussi très utilisé en mécanique des fluides. Des corrélations sont ainsi disponibles dans la littérature et permettent de caractériser l'écoulement avec précision ainsi que les contraintes de cisaillement appliquées sur les parois du réacteur.

II.1.1.2 *Les paramètres hydrodynamiques dans le CTR*

Nous avons précédemment défini le nombre de Reynolds Re (Equation 5). Dans ce type de réacteur, sa formule est réaménagée et la caractérisation de l'écoulement est également réalisée par l'intermédiaire du nombre adimensionnel de Taylor Ta (Kataoka, 1986).

$$Re = \Omega \delta r_i / \nu \quad [10]$$

$$Ta = \Omega^2 \delta^3 r_i / \nu^2 \quad [11]$$

avec Ω la vitesse angulaire (T⁻¹). Le nombre de Taylor permet de caractériser le régime hydrodynamique spécifiquement dans les CTR. Andereck et al. (1986) distinguent près d'une dizaine de régimes d'écoulement que la Figure II-2 se propose de résumer.

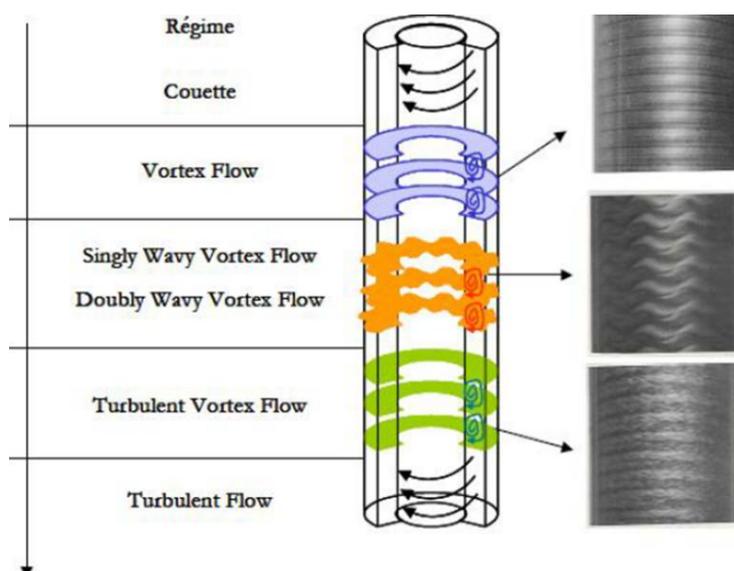


Figure II-2 : Les principaux régimes hydrodynamiques en réacteur de Couette-Taylor (adaptée de Coufort (2004)).

Le régime de Couette, ou régime laminaire azimuthal, correspond à un écoulement axisymétrique stable (Andereck et al., 1986; Coufort, 2004). La première transition, vers le « vortex flow » ou « Taylor vortex flow », est donnée par le nombre de Taylor critique Ta_c et marque l'apparition d'une instabilité de l'écoulement. A l'établissement de ce second régime, des vortex toroïdaux caractéristiques apparaissent et se succèdent dans toute la hauteur du réacteur. Si Ta augmente encore, les vortex commencent à onduler et un écoulement tourbillonnaire ondulé (« wavy vortex flow ») apparaît. Pour des Ta encore supérieures, un écoulement turbulent est établi. Il peut se présenter avec ou sans vortex. C'est ce type d'écoulement turbulent que nous avons visé pour réaliser nos travaux. Afin de garantir la présence d'un régime turbulent dans notre dispositif, une étude bibliographique a été menée afin de rassembler les différentes données fixant Ta et Re pour ces transitions (Tableau II-1).

		Taylor (1923)	Andereck et al. (1986)	Fenstermacher et al. (1979)	Brandstätter et al. (1983)	Desmet et al. (1996)
Première transition	Re_c	115	118	119	N.A.	N.A.
	Ta_c	1818	1830	1190	N.A.	2500
Apparition de la turbulence	Re	N.A.	1382	1429	N.A.	N.A.
	Ta	N.A.	$2,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	N.A.	$2,5 \times 10^5$
Re/Re_c	Re/Re_c	N.A.	11,8	12,0	12	N.A.
Ta/Ta_c	Ta/Ta_c	N.A.	138	144	N.A.	100

Tableau II-1: Bilan de l'étude bibliographique sur les CTR

Les informations ainsi répertoriées dans la littérature et les calculs effectués à partir de celles-ci démontrent qu'avec $Re > 1500$ et $Ta > 300\ 000$, un régime d'écoulement turbulent est établi. D'autre part, les études menées sur le sujet ont permis d'établir des corrélations pour déterminer la contrainte de cisaillement sur la surface du cylindre interne du CTR (Racina and Kind, 2006) :

$$\tau = \frac{2,13 * \left(\frac{r_i}{r_e}\right)^{1,5} * Re^{1,445} * \rho v^2}{2\pi r_i^2 * \left(1 - \frac{r_i}{r_e}\right)^{1,75}} \quad \text{pour } Re > 8 \times 10^2 \quad [12]$$

$$\tau = \frac{0,113 * \left(\frac{r_i}{r_e}\right)^{1,5} * Re^{1,764} * \rho v^2}{2\pi r_i^2 * \left(1 - \frac{r_i}{r_e}\right)^{1,75}} \quad \text{pour } Re > 10^5 \quad [13]$$

Ainsi, grâce à une littérature riche concernant ce type de réacteur, l'ensemble des paramètres hydrodynamiques peut être quantifié avec précision.

II.1.2 Le développement et les biofilms matures : colonne à bulles

II.1.2.1 Présentation du réacteur

Les travaux concernant les deux autres volets de cette thèse, le développement et les biofilms matures, ont été menés en colonne à bulles. La Figure II-3 donne une description détaillée de ce dispositif. La conception et la réalisation de ces réacteurs ont été effectuées par l'atelier de notre laboratoire. Le biofilm croît sur des coupons de 5cm^2 ($5\text{ cm} \times 1\text{ cm}$) de surface colonisable. De plus, les coupons sont collés sur des anneaux qui sont eux-mêmes insérés dans les réacteurs. Le réacteur peut héberger jusqu'à 152 coupons, permettant une très grande quantité de prélèvements. Ce dispositif offre en outre la possibilité de retirer, remplacer ou intervertir à volonté les anneaux entre les colonnes.

Les coupons ont été découpés à partir d'une bande de film de polyéthylène. Ce film présente deux couches. Sur la couche plus fine, de la colle est disposée et le coupon est collé sur l'anneau métallique. L'autre face est disponible pour la croissance du biofilm. Au moment du prélèvement du biofilm, la couche souillée par la colle est retirée. Le biofilm présent sur la surface de la face externe n'est pas modifié lors de cette étape, et la face interne est dans ce cas vierge.

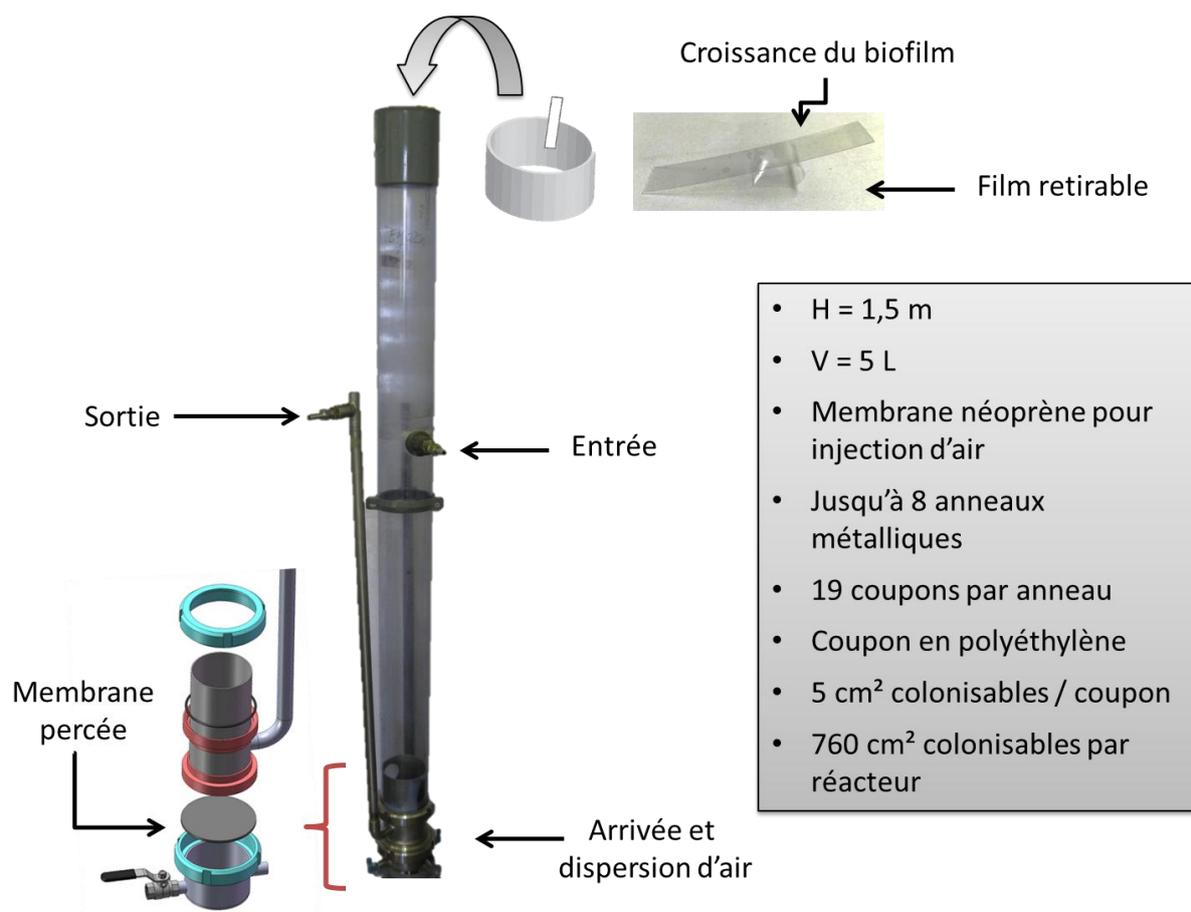


Figure II-3 : Schéma et caractéristiques des colonnes à bulles utilisées

L'injection de l'air dans la colonne à bulles se fait grâce à une membrane en néoprène de 2 mm d'épaisseur que nous avons percée de 63 trous. Ces trous permettent d'injecter l'air en fines bulles réparties de manière homogène sur toute la section du réacteur. Dans ce type de réacteur, le mélange efficace assuré par les bulles permet d'obtenir une bonne homogénéité de la phase liquide. Il est de plus très facile de saturer le milieu en oxygène.

II.1.2.2 Description du régime hydrodynamique

Kantarci et al. (2005) définissent trois types de régimes hydrodynamiques en colonne à bulles, tous les trois étant turbulents (Figure II-4). Le premier, auquel nous avons opéré, est nommé « homogeneous bubble flow regime » et correspond à des bulles dont la taille et la vitesse sont homogènes et aucune coalescence de bulles n'est notée. Lorsque les vitesses de gaz augmentent, les régimes « slug flow » et « churn turbulent » font leur apparition. Ils sont caractérisés par des phénomènes de coalescence et une distribution hétérogène de tailles de

bulles. Le « slug flow » n'est détecté que dans des colonnes de faible diamètre et est caractérisé par des calottes d'air de même dimension que ce diamètre.

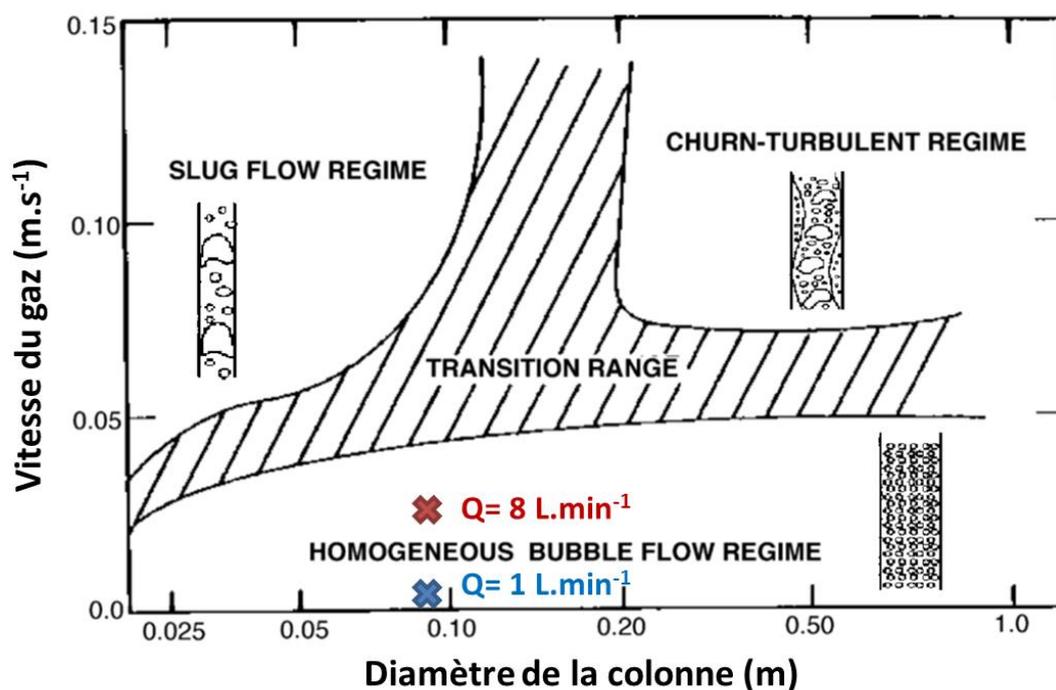


Figure II-4 : Régimes hydrodynamiques dans les colonnes à bulles (adaptée de Kantarci et al. (2005)). En rouge et en bleu sont indiquées les conditions opératoires correspondant à notre dispositif. Q : débit.

Par conséquent, la littérature assure l'établissement de régime d'écoulement turbulent dans nos travaux. Les réacteurs expérimentaux et les conditions hydrodynamiques étant désormais connus, la partie suivante traite de la conduite de ces dispositifs.

II.2 La conduite des réacteurs

II.2.1 Le déroulement d'un essai d'adhésion

II.2.1.1 Les différentes contraintes appliquées

Quatre cisaillements ont été opérés. Le Tableau II-2 résume les différentes conditions hydrodynamiques que nous avons testées.

	Vitesse (rpm)	Re	Ta	τ (Pa)
Borne inférieure	25	$5,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^7$	0,086
Milieu logarithmique	99	$2,0 \times 10^4$	$1,7 \times 10^8$	0,79
Milieu linéaire	238	$4,9 \times 10^4$	$9,5 \times 10^8$	3,7
Borne supérieure	350	$7,2 \times 10^3$	$2,1 \times 10^9$	7,3

Tableau II-2 : Synthèse des paramètres hydrodynamiques opérés

Les nombres de Reynolds et de Taylor indiquent que des régimes turbulents sont établis et ce même pour une vitesse de rotation du cylindre interne de 25 rpm. Un facteur de 85 a pu être mis en place entre le cisaillement le plus faible (0,086 Pa) et le plus élevé (7,3 Pa). Il est à noter que nous avons procédé à une modification du réacteur afin de pouvoir augmenter le facteur entre les deux bornes (Cf Annexe 1). Pour l'ensemble des essais réalisés, le même protocole d'inoculation a été suivi.

II.2.1.2 L'inoculum

L'inoculum utilisé pour les essais d'adhésion provient d'une station d'épuration à boues activées (Vinassan-Armissan). A partir d'un même inoculum, des essais préliminaires ont été réalisés pour tester plusieurs protocoles d'inoculation : boues congelées (afin d'avoir strictement le même inoculum pour tous les essais), boues alimentées 24 ou 48h, surnageants de boues décantées. Dans ce cadre, une méthode d'enrichissement a été mise au point afin d'obtenir une flore active suffisamment concentrée pour obtenir des réponses exploitables en microscopie et en biologie moléculaire. Un résumé de ce travail est fourni en Annexe 2.

La solution retenue pour la suite de l'étude correspond à la procédure suivante. Les boues sont prélevées la veille du test d'adhésion puis elles sont mises à décanter 30 minutes. Le surnageant est prélevé. Le fait de travailler sur le surnageant entraîne certes une sélection de certains microorganismes par rapport aux boues activées mais permet de s'affranchir des flocs et autres agrégats qui rendent l'observation microscopique impossible. Le surnageant prélevé est alimenté avec un mélange d'extrait de levure, extrait de viande et de peptones. Le ratio entre l'apport de substrat (en demande chimique en oxygène DCO) et les matières volatiles en suspension (MVS) de l'inoculum est d'environ $0,1 \text{ gDCO.gMVS}^{-1}$. Le surnageant est alors aéré 24h. Cet apport en substrat complexe et en oxygène permet la croissance des microorganismes en minimisant la sélection de la flore. Une flore concentrée, active et diverse est donc obtenue suite à ce protocole. Au terme des 24h, la concentration en DCO soluble est vérifiée afin de s'assurer que le substrat introduit a bien été consommé. En effet, l'absence d'une concentration élevée en DCO soluble au moment de l'inoculation du CTR garantit de limiter les phénomènes de croissance cellulaire lors de l'étape d'adhésion.

II.2.1.3 *Le protocole d'adhésion*

Après désinfection du réacteur et des coupons à l'aide d'un détergent (RBS35, Traitements Chimiques de Surfaces, France), le cylindre interne est mis en rotation à la vitesse sélectionnée. L'inoculum est ensuite ajouté. Par conséquent, les microorganismes ne sont pas en contact avec les coupons sans qu'un cisaillement soit appliqué. Un temps de contact d'une heure est maintenu.

Au terme de ces 60 minutes, s'en suit une heure de lessivage. L'enjeu de cette étape est de lessiver les microorganismes planctoniques du réacteur afin de pouvoir arrêter la rotation du cylindre et retirer les coupons. Cette étape évite donc l'adhésion de microorganismes planctoniques sur les coupons alors qu'aucun cisaillement ne s'y applique. Le lessivage consiste à ajouter en continu un liquide dépourvu de microorganismes. Le liquide de lessivage correspond aux eaux de sortie de la station d'épuration servant aux prélèvements des boues. Ainsi les propriétés chimiques de ce liquide ne diffèrent que peu d'avec l'inoculum. Cependant, ces eaux de sortie sont filtrées à $30\mu\text{m}$ pour éviter les phénomènes d'attrition puis autoclavées. Chaque réacteur est rincé par huit fois son volume, soit 24 litres par réacteur.

Après ces deux heures d'expérience (adhésion et lessivage), le CTR peut être stoppé et les coupons prélevés. Une partie de ces coupons va être utilisée pour la caractérisation morphologique de l'adhésion, l'autre partie va permettre l'analyse des communautés microbiennes.

II.2.2 L'opération des colonnes à bulles

Les informations données ici sont valables – sauf si indication contraire – à la fois pour les travaux concernant le développement du biofilm et l'étude sur les prédateurs dans les biofilms matures.

II.2.2.1 Les deux types de conditions hydrodynamiques testés

Comme cela a été évoqué précédemment (Figure II-4), deux conditions hydrodynamiques ont été opérées sur les colonnes à bulles, toutes deux correspondant à un régime turbulent. Dans l'un des deux réacteurs un débit d'air stable de 1 L.min^{-1} a été maintenu. Dans la seconde colonne à bulles, des perturbations hydrodynamiques sont générées pendant 12 min et ce toutes les 60 minutes. Le débit d'air injecté passe en effet de 1 à 8 L.min^{-1} . Si le régime hydrodynamique est toujours le même (« homogeneous bubbly flow »), la vitesse du gaz est multipliée par huit, le nombre et la taille des bulles augmentant aussi de manière significative. A l'aide d'un programmateur sur lequel les pompes à air sont branchées, il est possible de réguler de façon précise les débits d'air. Ainsi deux conditions hydrodynamiques ont permis la croissance de biofilms structurellement différents : un régime stable avec des contraintes modérées et un régime variable soumis à des perturbations horaires intenses.

II.2.2.2 L'inoculation des réacteurs

L'inoculum utilisé correspond à des boues activées issues de la station d'épuration d'Armissan-Vinassan. Un batch de 24 heures est d'abord réalisé pour permettre l'adhésion et le développement de la biomasse sur les coupons. 250 ml de boues activées fraîches sont dilués dans une solution d'alimentation. Cette dernière a la même composition que la solution d'alimentation utilisée lors de la conduite en continu du réacteur. Elle est cependant six fois plus concentrée (162 gDCO.L^{-1}), ce qui correspond à un ratio d'environ $1,32 \text{ gDCO.gMVS}^{-1}$. Le volume final est de 5 litres et permet l'inoculation du réacteur. Il est à noter ici que les perturbations hydrodynamiques sont d'ores déjà opérées au cours de cette période. Les

biofilms de la colonne à bulles concernée possèdent donc une croissance entièrement soumise au régime hydrodynamique variable. Après cette période de batch, un fonctionnement avec une alimentation en continu est lancé.

II.2.2.3 La conduite continue

Le fonctionnement en continu va permettre le lessivage des microorganismes planctoniques et ainsi favoriser la croissance du biofilm. La Figure II-5 en illustre la mise en œuvre.

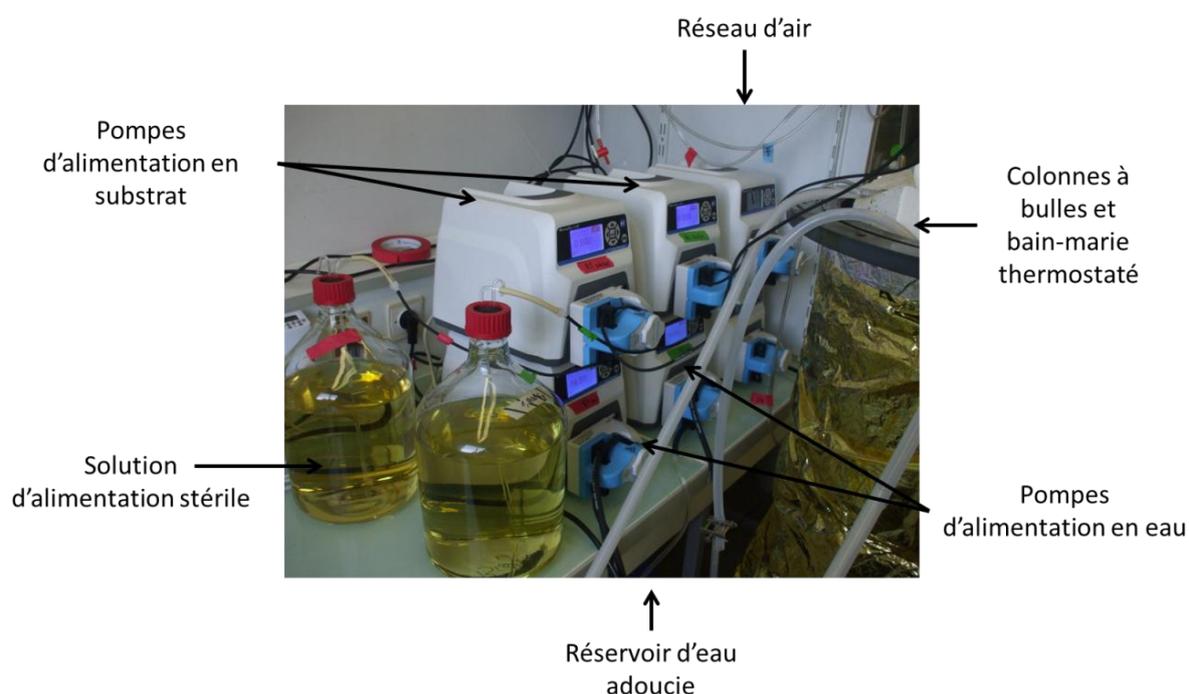


Figure II-5 : Mise en œuvre du fonctionnement continu.

Chaque colonne est alimentée en eau adoucie et en substrat à des débits de 4,47 et de 0,03 L.h⁻¹, respectivement. Le temps de séjour hydraulique dans la colonne à bulles est de 65 min. L'eau est adoucie afin d'éviter toute réaction de précipitation de carbonate dans le réacteur. L'eau adoucie est stockée dans un réservoir commun aux deux colonnes à bulles dont le temps de séjour hydraulique est de 5 heures environ.

Le substrat a légèrement différencié entre les travaux sur le développement du biofilm et les travaux sur prédation. Dans les deux cas, un mélange dans les mêmes proportions d'extrait de viande, d'extrait de levure et de peptones est utilisé, avec une concentration finale en entrée de 27 mg.L⁻¹. Ce mélange autoclavé est complété ensuite avec une solution d'éléments traces

ajoutée de manière stérile. Dans le cas des travaux sur les biofilms matures les éléments suivants ont aussi été ajoutés : NH_4Cl $0,31 \text{ mg.L}^{-1}$, K_2HPO_4 1 mg.L^{-1} , KH_2PO_4 $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $1,05 \text{ mg.L}^{-1}$. Le substrat est maintenu stérile grâce à un filtre de $0,2\mu\text{m}$ en fin de circuit.

Afin de vérifier leur bon fonctionnement, les réacteurs ont été suivis en termes de pH, concentration en oxygène dissous, rendement épuratoire. Un suivi de la biomasse attachée a aussi été réalisé. Les protocoles sont présentés dans la partie suivante.

II.2.3 Les caractérisations physico-chimiques

La DCO soluble a été mesurée par oxydation au dichromate de potassium. Nous avons utilisé des kits MR 0-1500 mg.L^{-1} et LR 0-150 mg.L^{-1} d'Aqualytic. Un prélèvement de 2ml de l'échantillon filtré est introduit dans un tube contenant la solution de dichromate de potassium. Le tube est chauffé 2h à 150°C puis après refroidissement la lecture est réalisée par spectrophotométrie.

Afin de déterminer la masse de matériel biologique fixé sur le support, le biofilm a été raclé et récupéré dans une coupelle préalablement pesée (M_0). L'ensemble a ensuite été placé 24h à 105°C puis pesé à nouveau (M_1) (NFT 90-029, (AFNOR, 1999)). La différence entre les deux pesées correspond aux matières sèches. La coupelle peut être remplacée deux heures à 550°C avant une dernière pesée (M_2) afin de déterminer les matières volatiles. Les équations suivantes donnent ainsi les masses de matières sèches attachées (MSA) et de matières volatiles attachées (MVA) :

$$MSA = M_1 - M_0 \quad [14]$$

$$MVA = M_1 - M_2 \quad [15]$$

Nous avons complété cette méthode avec une technique d'analyse d'image. Une corrélation linéaire ($R^2=0,90$) a été trouvée entre les résultats obtenus par raclage et le niveau de gris moyen des images du biofilm avant raclage. Après calibration, la méthode par analyse d'image, plus rapide et aisée, a remplacé la détermination directe des matières sèches.

Concernant les matières en suspension et matières volatiles en suspension permettant de caractériser les boues activées, la norme NF EN 872 a été suivie. Pour la mise en œuvre, un volume V a été prélevé et filtré sur filtre Whatman GF/C. Il s'agit ensuite d'appliquer le protocole des matières sèches précédent sur le filtre (avec M_0 la masse du filtre propre, M_1 la masse du filtre et du rétentat après séchage à 105°C et M_2 après le passage à 550°C) et de rapporter les masses obtenues au volume prélevé.

II.3 La caractérisation morphologique

II.3.1 Les techniques d'observation

II.3.1.1 La microscopie à épifluorescence

Pour caractériser la quantité et la distribution spatiale des microorganismes lors des travaux d'adhésion, nous avons opté pour une observation à l'échelle microscopique. Après retrait du CTR, une partie des coupons est rincée par trempage puis immergée 20 min dans une solution de DAPI à $1,25\mu\text{g.ml}^{-1}$. Les coupons sont ensuite rincés à nouveau.

Les observations de microscopie à épifluorescence ont été faites sur un microscope Olympus BX 60-F. Sur celui-ci, nous avons utilisé deux objectifs différents. L'un est un objectif 100x à immersion d'huile et le second est un 60x à immersion d'eau (acquis par le laboratoire au cours de la thèse). Dans le cas du premier objectif, les coupons sont séchés à 35°C pendant 60 min afin d'éliminer l'eau. Cette étape est nécessaire car l'indice de réfraction de l'eau n'est pas compatible avec celui de l'huile d'immersion, ce qui peut compromettre l'observation. Après séchage, l'huile est directement posée sur le coupon. Dans le cas de l'objectif 60x à immersion d'eau, nous nous sommes affranchis de l'étape de séchage. Le coupon est fixé au fond d'une boîte de Pétri puis immergé dans une solution stérile. Pour les solutions de rinçage, de DAPI et d'immersion mentionnées précédemment, les eaux de sortie de la station d'épuration sont utilisées. Elles sont préalablement stérilisées par filtration à $0,2\mu\text{m}$.

Nous avons enregistré environ 60 photographies par coupon à l'aide de l'appareil CCD Nikon Digital Camera DXM 1200F. Des images de $0,013\text{ mm}^2$ (1280×1024 pixels²) sont obtenues et sauvées en format tif. Les paramètres d'acquisition (temps d'obturation, luminosité, filtres DAPI...) sont identiques pour un même matériau.

II.3.1.2 La stéréomicroscopie

Nous nous sommes intéressés à une observation à l'échelle macroscopique pour les travaux de développement et de biofilms matures. Le prélèvement se déroule comme suit. L'anneau est retiré du réacteur et le coupon prélevé de l'anneau. Le film fin détachable et souillé de colle est retiré du coupon. Celui se présente donc avec une face sur laquelle se

trouve le biofilm et la seconde propre, ce qui permet une observation microscopique par transmission. Le coupon est placé dans un réceptacle prévu à cet effet. Il est ensuite immergé dans 600µl d'une solution correspondant à la sortie de la colonne filtrée à 0,2µm.

Un stéréomicroscope Leica M205 FA, équipé d'un objectif 0.63× plan-apochromatique et d'un appareil photographique Leica DFC495, a été utilisé. Afin de comparer toutes les images entre elles, quelle que soit la date d'acquisition, un système de standardisation des paramètres de luminosité a été mis en place. Ainsi chaque séance d'acquisition est précédée de l'analyse d'une lame de référence. Les paramètres d'acquisition sont donc ajustés d'une session à l'autre afin que l'histogramme des niveaux de gris décrivant l'image de référence soit toujours à l'identique. Une fois cette étape réalisée, l'acquisition des images du biofilm commence. Des images en niveaux de gris de 6,4mm x 4,8 mm (2176 x 1632 pixels²) sont sauvées en format tif. Pour décrire l'ensemble du coupon, 14 images sont enregistrées (sept positions sur la longueur du coupon et deux sur la largeur).

II.3.2 L'analyse d'image

II.3.2.1 La caractérisation des images d'adhésion

Les images acquises par microscopie à épifluorescence sont ensuite traitées. L'objectif est de mettre au point une procédure automatisée et fiable. Les images provenant de différents matériaux et des différents essais peuvent ainsi être traitées de la même manière, sans faire intervenir de paramètres subjectifs. L'enjeu est de pouvoir chiffrer les caractéristiques d'adhésion, aussi qualitatives que quantitatives. Un traitement sur le logiciel Image J 1.45s (Rasband, 1997) a donc été conçu. La Figure II-6 résume les étapes de l'analyse d'image. Pour chaque étape, nous avons testé différents paramètres (algorithme, valeur de pixels, rayon de l'analyse locale...) en nous assurant que son effet respecte le plus possible l'image originale.

Après l'acquisition des images, la première étape consiste à remplacer les pixels morts (fonction « Remove outiliers »). En effet, certains pixels isolés apparaissent systématiquement dans des couleurs très vives et sont directement issus d'une défectuosité de la caméra. Ces pixels sont identifiés et remplacés par la moyenne des valeurs des pixels environnants.

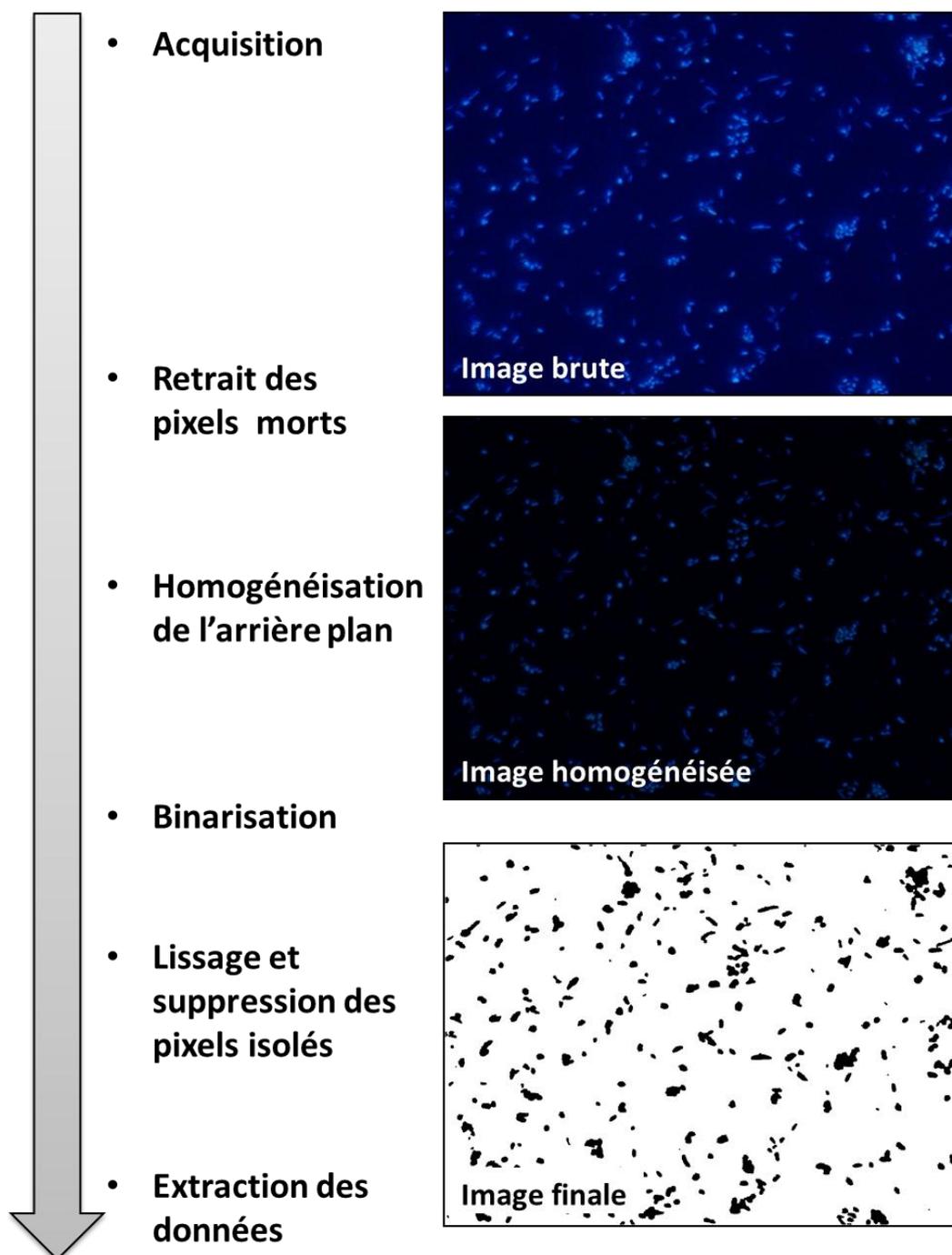


Figure II-6 : Description du traitement d'image des travaux d'adhésion

La seconde étape consiste à homogénéiser la luminosité de l'arrière-plan (fonction « Subtract background »). En fonction de la taille des structures marquées et de leur intensité de fluorescence, des hétérogénéités importantes peuvent apparaître. Si elles ne sont pas traitées, l'étape suivante de binarisation de l'image s'avère sévèrement influencée, biaisant complètement le résultat obtenu. Nous avons donc implémenté cette étape afin d'assurer la fiabilité du traitement.

La phase suivante, la plus cruciale, va permettre de passer d'une image en couleurs à une image en noir en blanc (fonctions « Color Threshold » et « Make binary »). Elle porte le nom de binarisation car, à son terme, les pixels ne peuvent posséder que deux valeurs au lieu des 256 possibles initialement : 0 ou 255 pour blanc ou noir. Pour la réalisation de cette étape, une valeur, appelée seuil de binarisation, est déterminée. Selon que le pixel possède une valeur supérieure ou inférieure à ce seuil, il sera blanc ou noir au terme du traitement. Des algorithmes de binarisation existent et déterminent la valeur du seuil, qui pourra varier d'une image à l'autre. Nous avons cependant remarqué que la fiabilité du traitement par algorithme était assez aléatoire. Nous avons donc opté pour l'autre alternative consistant à fixer nous-même la valeur du seuil de binarisation. Pour la déterminer, nous nous sommes basés sur la valeur moyenne donnée pour un échantillon de dix images binarisées avec l'algorithme « Renyi entropy » (Kapur et al., 1985). Ces images sont donc binarisées par l'algorithme, la fiabilité du traitement est visuellement vérifiée, les dix valeurs de seuils sont recueillies et moyennées. Ainsi nous avons pu déterminer un seuil de binarisation fiable et commun à tous les coupons d'un même matériau. Les seuils entre les coupons PP et PVC sont en effet différents, les paramètres d'acquisition l'étant aussi.

Enfin la dernière étape consiste à lisser les formes et supprimer les pixels isolés (fonctions « Close -> » puis « Open »). L'objectif est de réduire le bruit inhérent au traitement d'image. De nombreux pixels isolés peuvent être retrouvés sur l'image et les objets peuvent avoir des formes irrégulières en fonction de la valeur du seuil de binarisation. Cette étape est donc un nettoyage afin d'éliminer des biais intrinsèques au traitement.

L'ensemble des images est ainsi traité et le résultat du traitement est visuellement contrôlé. Trois paramètres sont extraits de cette analyse et servent à caractériser la morphologie du biofilm monocouche. Tout d'abord, le taux de recouvrement correspond au pourcentage de pixels noirs par rapport au nombre total de pixels. Nous avons ensuite pris en compte le nombre d'objets sur l'image et la taille moyenne d'un objet. Ces trois paramètres sont obtenus pour chaque image et sont ensuite traités statistiquement (Boxplots, ANOVA et t-tests) pour caractériser la structuration morphologique des essais d'adhésion.

II.3.2.2 La structuration des images de biofilm en développement

Pour chaque coupon, 14 images sont recueillies. Chacune d'elle est analysée grâce à la méthode SGLDM (de l'anglais Spatial Gray Level Dependence Matrices). Cette méthode repose la comparaison des niveaux de gris de pixels pris deux à deux. La Figure II-7 représente un exemple simple de la méthode.

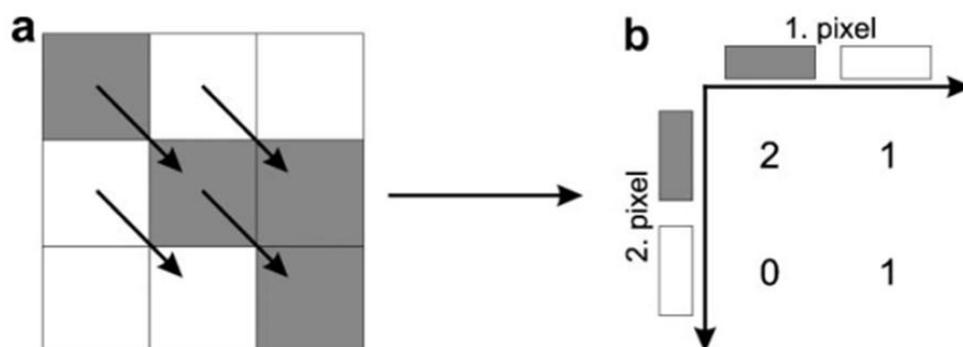


Figure II-7 : Concept de la méthode SGLDM (Milferstedt et al., 2008). (a) Exemple d'image de 3x3 pixels à deux niveaux de gris. (b) Matrice de comparaison résultant de l'application l'opérateur de position 45°- 1 pixel

Ces comparaisons de pixels appariés sont faites sur la base d'une combinaison distance – angle appelée opérateur de position (OP). Pour la Figure II-7, l'OP 45°- 1 pixel est lancé et il en résulte une matrice de dépendance représentée en b. Cette méthode permet donc de s'intéresser à plusieurs échelles (en jouant sur les distances), et la directionnalité de la structure de l'image (en jouant sur l'angle). De plus, contrairement à beaucoup de techniques d'analyse d'image présentes dans la littérature (Renslow et al., 2011; Yang et al., 2000), aucune binarisation n'est ici nécessaire. D'une part, une telle analyse permet de s'affranchir du biais généré par le traitement d'image. D'autre part, l'analyse ne se base pas uniquement sur deux valeurs de niveaux de gris (0 et 255) mais bien sur les 256 nuances possibles, rendant l'analyse beaucoup plus fine. Une fois la matrice (256x256) correspondante à un OP déterminée, elle va être résumée par quinze descripteurs mathématiques (Haralick et al., 1973; Milferstedt et al., 2008). L'expression mathématique de ces descripteurs est donnée en Annexe 3. Ces descripteurs n'ont pas nécessairement de traduction concrète en termes de structure de l'image : il s'agit du principal défaut de la méthode SGLDM. Néanmoins ils

permettent de caractériser l'image avec précision. Pour résumer cette étape, un OP est lancé sur une image et il en résulte une matrice décrite par quinze descripteurs.

Dans notre cas, nous avons lancé sur chaque image une analyse avec 48 OP, correspondant à six angles et huit distances (0°, 30°, 60°, 90°, 120°, 150° x 30, 75, 150, 300, 450, 600, 900, 1200 µm). La Figure II-8 résume le traitement de données opéré.

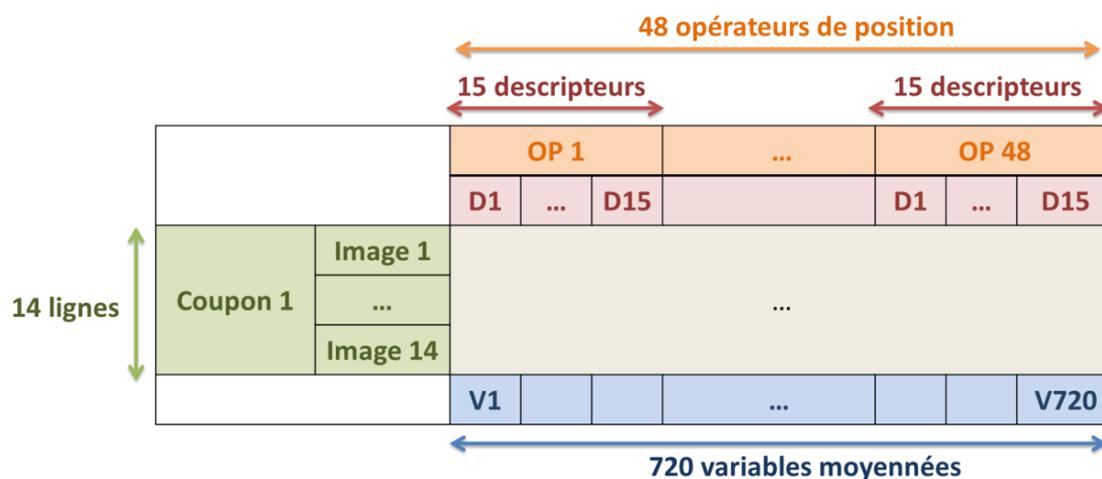


Figure II-8 : Traitement des descripteurs issus des matrices de comparaison. OP : opérateur de position, D : descripteur, V : variable.

Ces 48 OP représentent donc 720 variables par image (48 OP x 15 descripteurs). Chacune des 720 variables a été moyennée pour les 14 images acquises par coupon. Au final, chaque coupon est donc décrit par un jeu de 720 variables. Enfin, celles-ci sont traitées statistiquement par Analyses en Composantes Principales (ACP) afin de pouvoir comparer les coupons les uns avec les autres.

II.3.2.3 La quantification des prédateurs

La même procédure d'acquisition que pour les travaux sur le développement du biofilm a été suivie ici à une différence près. Dans ce cas, chacun des 14 emplacements a été acquis deux fois, avec un intervalle d'une seconde entre les deux acquisitions. Durant cette seconde, les organismes mobiles se sont déplacés : la méthode de quantification développée repose ainsi sur la détection et la quantification de ces mouvements. Les deux images obtenues sont chargées sur Image J. La Figure II-9 présente la méthode de quantification des prédateurs mobiles.

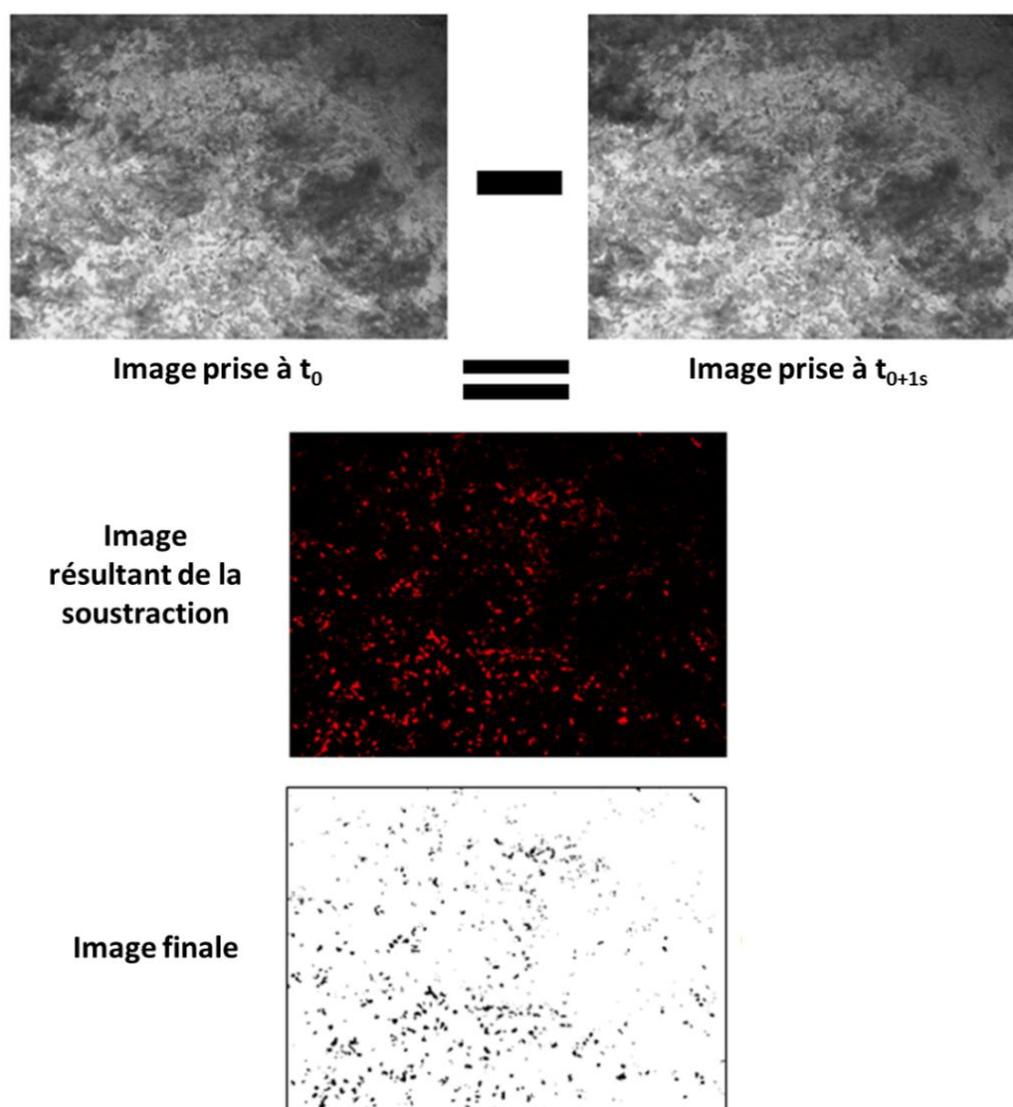


Figure II-9 : Analyse d'image pour la quantification des organismes mobiles.

La seconde image (t_{0+1s}) est soustraite de la première (fonction « Image calculator »). L'image résultante est ensuite binarisée grâce à l'algorithme de binarisation Otsu (Otsu, 1979) (fonctions « Threshold » et « Make binary »). Dans ce cas, l'algorithme a démontré une très bonne fiabilité de traitement et nous avons donc conservé les valeurs de seuil de binarisation données. Comme vu précédemment, l'image binarisée est traitée pour réduire le bruit inhérent au traitement (fonction « Open »). Le taux de recouvrement ainsi que le nombre d'objets sur l'image sont finalement extraits. Ces deux paramètres sont corrélés à un comptage manuel des rotifères effectué directement sur les images. Notons que des essais ont aussi été réalisés en allongeant l'intervalle de temps entre les acquisitions et/ou en inversant le sens de la soustraction. Les mêmes tendances ont été obtenues.

II.4 La caractérisation microbiologique

Cette partie concerne uniquement les travaux sur l'adhésion et ceux sur le développement des biofilms. Aucune caractérisation microbiologique telle que décrit dans cette partie n'a été faite pour les travaux sur les biofilms matures.

II.4.1 L'extraction d'ADN

Pour procéder à la caractérisation microbiologique des échantillons, il est dans un premier temps nécessaire de récupérer le matériel biologique

II.4.1.1 Le décrochage des cellules et extraction d'ADN pour l'adhésion

Les coupons extraits du CTR sont tout d'abord rincés. Une étape importante consiste à récupérer les cellules adhérentes. Plusieurs techniques ont été comparées pour décrocher de manière efficace, aussi bien qualitativement que quantitativement, les microorganismes adhérents. Nous avons en effet testé des bains successifs dans des solutions de détergents, agitées ou non, avec ou sans passage dans un bain à ultrasons. La solution retenue consiste à frotter les coupons avec de la laine de quartz légèrement imbibée d'eau stérile. Son pouvoir abrasif va permettre de décrocher un nombre important de cellules sans distinction d'espèce. La laine de quartz est ensuite stockée et congelée à -20°C.

L'extraction d'ADN est réalisée directement sur la laine de quartz. Les kits QIAamp DNA Stool Minit Kit de Qiagen sont utilisés et le protocole du fournisseur a été suivi. Brièvement, après lyse des cellules dans une solution prévue à cet effet, les inhibiteurs de la PCR ainsi que les protéines sont neutralisés. Le tout est ensuite filtré, l'ADN étant retenu par la membrane. Celui est lavé puis remis en solution grâce à une solution éluate.

II.4.1.2 La récupération du biofilm en développement et extraction d'ADN

Les coupons sont extraits de la colonne à bulles. Après observation en stéréomicroscopie, ils sont coupés en deux moitiés. Chacune est placée dans un tube de 2ml stérile stocké à -20°C. Le protocole décrit par Rochex et al. (2008) a ensuite été suivi. Brièvement, la lyse des cellules est faite par ajout de 500µl de tampon phosphate à pH 8 contenant 5% de N-Lauroyl

sarcosine (N-LS). Le tube est incubé une heure à 70°C puis plongé dans la glace. Des billes stériles de zirconium (500µl) sont ajoutées et le tube est placé dans un vibro-broyeur 10 minutes. Puis, 15mg de polyvinylpolypyrrolidone sont ajoutés pour neutraliser les inhibiteurs de la PCR. Le tube est vortexé puis centrifugé 3 min à 12000 rpm et le surnageant est récupéré. Les billes sont lavées à l'aide d'une solution de 500µl de TENP (Tris-Cl, 50mM ; EDTA, 20 mM ; NaCl, 100mM, polyvinylpolypyrrolidone, 1%), puis le tube est centrifugé et le surnageant récupéré. L'opération est répétée trois fois et les surnageants réunis. Après une dernière centrifugation, l'ajout d'isopropanol au surnageant permet la précipitation de l'ADN qui est alors récupéré par centrifugation et resuspendu dans 200µl d'eau ultrapure. Sont enfin ajoutés 20µl de RNase à 1 mg.ml⁻¹ puis le tube est incubé 10 min à 37°C. L'ADN est finalement purifié avec les kits QIAamp DNA Stool Minit Kit de Qiagen. Après purification, la quantité et la pureté de l'ADN sont mesurées par spectrophotométrie (Infinite M200 Reader, NanoQuant, Tecan).

II.4.2 L'amplification PCR et l'analyse CE-SSCP

Une amplification PCR (Polymerase Chain Reaction) a ensuite été opérée sur l'ADN extrait. Le même protocole que Rochex et al. (2008) a été suivi. En résumé, la région V3 de l'ADNr 16S est amplifiée en utilisant les amorces bactériennes W49 (ACGGTCCAGACTCCTACGGG, *Escherichia coli* position F331) et W104 (TTACCGCGGCTGCTGGCAC, *E. coli* position R533). L'amorce W49 est marquée par un fluorochrome. Au cours de l'amplification, l'ADN amplifié sur cette amorce hérite aussi de ce marquage. Le cycle d'amplification est comme suit : 2 min de dénaturation initiale à 94°C, 25 cycles d'amplification (30s à 94°C, 30s à 61°C, 30s à 72°C) et 10 min d'élongation finale à 72°C. Les produits PCR sont ensuite vérifiés par électrophorèse via un bioanalyseur Agilent 2100 selon les recommandations du constructeur.

L'analyse d'empreinte moléculaire, ou CE-SSCP (Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism), est ensuite réalisée (Sen et al., 2008). Cette analyse est en fait similaire à une électrophorèse et permet de séparer les séquences d'ADN grâce à leur conformation secondaire simple brin. Les produits PCR (1µl) sont dilués dans 18µl de formamide et 1 µl de standard de taille Rox. (Rox 400HD, Applied Biosystems, Etats-Unis). Après dénaturation thermique (5min à 94°C), l'échantillon est plongé dans la glace. Le refroidissement trop rapide ne permet aux deux brins complémentaires de s'associer, l'ADN

simple brin va se replier sur lui-même (conformation secondaire). Sa conformation va dépendre de sa séquence et sa vitesse de migration va dépendre de sa conformation. La migration se fait dans un analyseur génétique ABI 3130 (Applied Biosystems) équipé d'un capillaire de 50 cm et 50µm de diamètre rempli de 5,6% de polymère. L'électrophorèse est effectuée sous 15 kV et 32 °C en 30 min. Un détecteur laser va capter la fluorescence émise par les brins marqués lors de la PCR.

Les profils SSCP sont ainsi obtenus. Afin de pouvoir comparer les différents profils entre eux, ils sont traités sur le logiciel R 2.12 (R Development Core Team, 2010) avec le package StatFingerprints (Michelland et al., 2009). Le standard de taille Rox est utilisé comme référence pour aligner les profils entre eux. La Figure II-10 présente l'allure générale d'un profil SSCP.

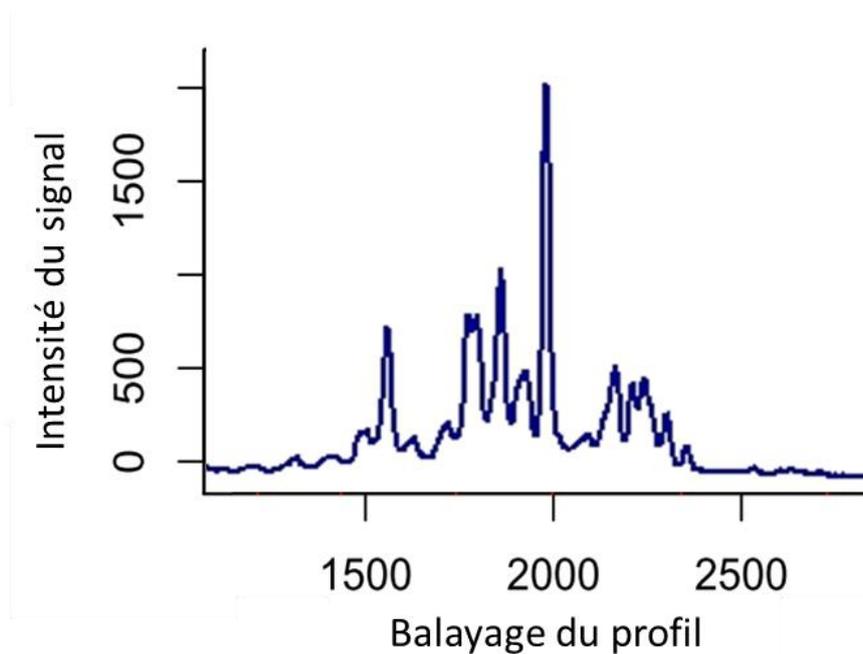


Figure II-10 : Exemple d'un profil SSCP.

Concernant l'interprétation, chaque pic correspond à un signal de fluorescence donc a priori à une séquence. De plus l'aire sous le pic est liée à l'intensité du signal, donc à l'abondance de cette séquence. Cette technique permet donc d'obtenir des informations sur la diversité des populations ainsi que leur abondance relative dans l'écosystème considéré.

II.5 Le traitement de données et analyses statistiques

L'ensemble des traitements de données complexes et des analyses statistiques a été réalisé grâce au logiciel R. Sauf indication contraire, les données de morphologie ont été traitées via R 2.15 et les données de microbiologie via R 2.12 (les fonctions utilisées n'étant pas disponibles sur la version 2.15).

II.5.1 Le traitement des données

II.5.1.1 Les boîtes à moustaches des travaux d'adhésion

Comme mentionné précédemment, les trois paramètres (taux de recouvrement, taille et nombre des objets) issus du traitement des images d'adhésion sont analysés statistiquement. La première étape consiste à supprimer les valeurs aberrantes. Sur certaines images, la présence de flocs ou le manque de fiabilité du traitement d'image peut engendrer des valeurs aberrantes. Une méthode courante pour identifier ces valeurs est d'avoir recours aux boîtes à moustache (LeGuen, 2002; Tukey, 1977). Pour chaque coupon, les trois paramètres subissent le traitement via la fonction « boxplot ». Seules les valeurs n'étant pas identifiées comme aberrantes dans les trois cas sont conservées. Des analyses de variances sont ensuite effectuées pour comparer les données entre cisaillements ou entre matériaux.

II.5.1.2 Les matrices de distances des travaux sur le développement

Pour les travaux concernant le développement du biofilm, des matrices de distances euclidiennes sont utilisées pour comparer les différents coupons. Elles sont calculées soit à partir des coordonnées des profils SSCP soit à partir des coordonnées obtenues après ACP sur les descripteurs SGLDM. Pour les données microbiologiques (profils SSCP), le package vegan 2.12.2 et la fonction « vegdist » ont été utilisés (Oksanen et al., 2011). Pour les données morphologiques (SGDLM-ACP), nous nous sommes servis de la fonction « dist ».

II.5.2 Les analyses statistiques

II.5.2.1 Les analyses de variances

Que cela soit pour les travaux d'adhésion et de développement, des analyses de variances ont été opérées. De manière générale, la significativité a été testée à 5% près, une p-value inférieure à 0,05 permet de conclure à un effet significatif du paramètre testé.

Concernant l'adhésion, ce sont les données morphologiques qui ont été traitées. Si seules deux conditions sont testées (deux cisaillements ou deux matériaux), nous avons utilisé des tests de Welch et de Student (Welch si les variances sont significativement différentes, Student dans le cas contraire) avec la fonction « t.test » (Cornillon, 2008). Si plus de conditions sont présentes, par exemple trois cisaillements, des ANOVA (pour « ANalysis Of VAriance ») sont pratiquées avec la fonction « anova ».

Pour les travaux sur le développement du biofilm, ce sont les données microbiologiques qui ont été testées. Le package `vegan` 2.12.2 et la fonction « `adonis` » ont été mis à contribution. Les calculs sont basés sur les matrices de distances obtenues à partir des profils SSCP comme mentionné précédemment.

II.5.2.2 Les Analyses en Composantes Principales

Des Analyses en Composantes Principales (ACP) ont été utilisées. Elles permettent d'agréger les variables décrivant les individus en les regroupant par combinaisons linéaires. L'information totale contenue dans l'ensemble des variables initiales peut ainsi être concentrée sur un nombre réduit de nouvelles variables appelées composantes principales. Idéalement, un maximum d'information peut être agrégé sur une ou deux composantes. Celles-ci peuvent alors servir d'axes pour une représentation graphique des individus.

L'ACP a été opérée sur les coordonnées des profils SSCP dans le cas des travaux sur l'adhésion. Ceci s'est fait grâce au package `vegan` 2.12.2 et la fonction « `rda` ». Concernant les travaux sur le développement, le package `ade4` et la fonction « `duci.pca` » ont été utilisées (Chessel et al., 2004).

II.5.2.3 La régression linéaire des travaux sur la prédation

Dans les travaux sur les biofilms matures, nous examinons la corrélation entre un comptage manuel et les paramètres issus du traitement d'image (taux de recouvrement et nombre d'objets). Pour ce faire, la fonction « lm » de R2.15 nous a permis de tester le modèle linéaire sur les données. Ce test est réalisé pour différents seuils de coupure du filtrage. Ce filtrage est simplement réalisé sur R en écartant des données les objets dont la taille est inférieure à la valeur choisie.

III. RESULTATS

III.1 Impact du cisaillement sur les phénomènes d'adhésion

III.1.1 Avant-propos

Le premier objectif de ce projet de thèse a été d'étudier l'étape initiatrice de la formation du biofilm, l'adhésion microbienne. Pour un microorganisme, le premier enjeu de cette phase est avant tout d'atteindre le support, ce qui constitue la condition *sine qua non* évidente pour adhérer à la surface de celui-ci. Une fois qu'une proximité suffisante a été établie, des liaisons vont pouvoir être créées entre le microorganisme et la surface du support. En fonction de la force d'adhésion, deux états, l'adsorption réversible et l'adhésion irréversible, sont distingués (Characklis and Marshall, 1990; Stoodley et al., 2002). La théorie dite de la XDLVO explique ces phénomènes (van Oss, 1995; Wang et al., 2011). Une fois que l'adhésion est ferme et irréversible, un véritable biofilm va pouvoir commencer à se constituer.

Comme cela a été relevé dans la synthèse bibliographique précédente, le succès de l'adhésion microbienne dépend de nombreux paramètres. Un des facteurs fondamentaux est le cisaillement conditionné notamment par les paramètres hydrodynamiques dont les effets ambivalents sur l'adhésion en font un sujet très étudié. La Figure III-1 explicite l'ambiguïté de l'effet des forces hydrodynamiques sur les phénomènes d'adhésion.

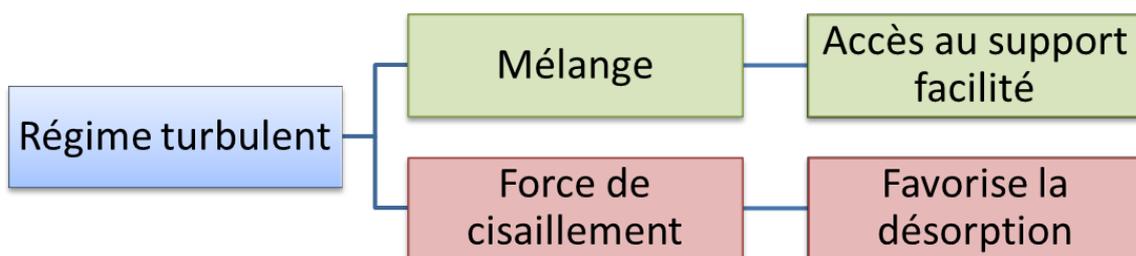


Figure III-1 : Mise en évidence de la problématique des conditions hydrodynamiques sur l'adhésion microbienne

Avec l'augmentation des forces hydrodynamiques et de la turbulence du milieu, un mélange plus important de la phase liquide est obtenu. Ceci permet d'augmenter la probabilité de rencontre entre le microorganisme en suspension dans la phase liquide et le support. En ce sens, l'augmentation des forces hydrodynamiques favorise l'adhésion microbienne. A l'inverse, dans le même temps, une augmentation des vitesses d'écoulement est observée et s'accompagne d'un accroissement des forces de cisaillement responsables du détachement des microorganismes déjà fixés. Ce dernier mécanisme peut donc avoir un effet préjudiciable pour l'adhésion microbienne. Ainsi deux impacts contradictoires sont identifiés lors de l'augmentation des contraintes hydrodynamiques, l'un favorisant l'accès au support par l'accroissement des phénomènes de transfert de masse, l'autre stimulant les décrochements via des cisaillements plus importants.

L'objectif de ce premier volet du projet de thèse est donc de mieux comprendre et mieux définir l'influence de l'hydrodynamique sur l'adhésion microbienne. Il est à noter qu'une littérature déjà riche existe sur ce sujet. Néanmoins, très peu de travaux ambitionnent de s'intéresser à ces mécanismes en régime turbulent et en culture mixte. Nos travaux visent ainsi à se situer à l'intersection encore très peu étudiée de plusieurs ensembles comme le résume la Figure III-2.

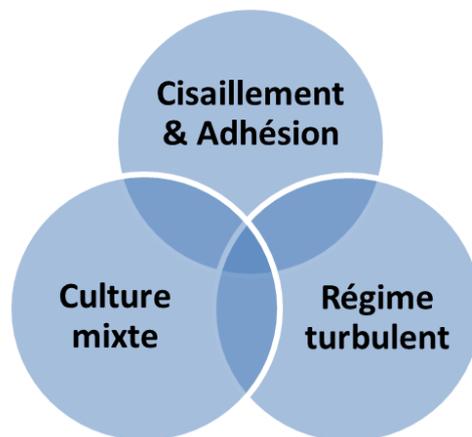


Figure III-2: Originalité de la démarche des travaux d'adhésion

Dans la littérature actuelle, la plupart des études sont réalisées en souche pure et en régime laminaire. Or il existe un intérêt flagrant à l'étude des biofilms multi-espèces en régime turbulent. Le plus souvent ce sont ces conditions qui sont réunies, notamment dans les domaines de l'industrie et de l'environnement.

Une étude à l'échelle microscopique a donc été réalisée pour mieux comprendre la structuration aussi bien en termes de flores fixées que de quantité et de distribution spatiale des microorganismes adhérents. L'adhésion microbienne a été étudiée dans des réacteurs possédant des environnements contrôlés en testant l'effet de quatre contraintes de cisaillement sur deux types de support. Des techniques de biologie moléculaire ont permis de caractériser les communautés microbiennes attachées. En parallèle, la microscopie à épifluorescence a permis non seulement de quantifier l'adhésion microbienne mais aussi d'appréhender la distribution spatiale des microorganismes sur la surface du support. Le développement d'une procédure de traitement d'image standardisée a en effet rendu possible la caractérisation morphologique de l'adhésion microbienne.

III.1.2 Impact of shear stress on initial bacterial adhesion in a Couette-Taylor reactor

D'après l'article en cours de soumission.

T. SAUR^a, E. MORIN^a, F. HABOUZIT^a, N. BERNET^a, R. ESCUDIÉ^{a*}

^a INRA, UR050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France

* Corresponding author: renaud.escudie@supagro.inra.fr; +33 4 68 42 51 73

III.1.2.1 Abstract

The objective of this study was to assess bacterial adhesion under different shear stresses in turbulent flow and using a complex bacterial consortium. A better understanding of the mechanisms governing microbial adhesion would be useful in diverse domains such as industrial processes, medical fields or environmental biotechnologies. The impact of shear stress – ranging from 0.09 to 7.3 Pa – on polypropylene (PP) and polyvinyl chloride (PVC) was carried out in Couette-Taylor reactors to evaluate adhesion in terms of morphological and microbiological structures. Epifluorescence microscopy was used to quantitatively and qualitatively characterize adhesion. Attached bacterial communities were assessed by molecular fingerprinting profiles (CE-SSCP). High shear stresses increased the quantity of attached bacteria but also altered their spatial distribution on the substratum surface. As the shear increases, aggregates or clusters appeared and their size grown when increasing shears. Co-adhesion is likely to be involved in this process. Adhered bacterial communities also evolved gradually with the applied shear and different bacterial motilities and affinities for the substratum material could be involved in this process.

Keywords: Adhesion, shear, biofilm, cluster, bacterial community

Highlights

- Shear stress increases bacterial surface coverage.
- Shear alters the spatial distribution of bacteria on the substratum surface.
- Clusters are formed and their size increases with the shear.
- Composition of bacterial communities evolves gradually with the shear.

III.1.2.2 **Introduction**

Microbial adhesion, as the first step of biofilm formation, constitutes a critical stage in biofilm development and management (Liu and Tay, 2002). This process is of great interest in a various range of domains such as environmental biotechnologies (Habimana et al., 2014; Habouzit et al., 2011; Nicoletta et al., 2000), medical fields (Andrews et al., 2001; Bos et al., 1994) or industrial processes (Brugnoni et al., 2012; Florjanič and Kristl, 2011; Meylheuc et al., 2006; Perni et al., 2006). On the one hand, a better understanding of the impact of shear stress on microbial adhesion is crucial to prevent detrimental biofilm formation and reduce associated sanitary and economic issues. On the other hand, it could help to develop and optimize beneficial biofilm systems such as in water and wastewater treatment, bioremediation and industrial biotechnology.

Hydrodynamic strengths play a key role in microbial adhesion (Busscher and van der Mei, 2006; Liu and Tay, 2002). Adhesion involves transport of bacteria to the substratum surface and their attachment on it. Hydrodynamic conditions can have an ambivalent effect on adhesion mechanisms. On the one hand, an increase in mixing efficiency and in convective transport can promote microbial adhesion as it facilitates access of bacteria to the substratum. On the other hand, high hydrodynamic strengths also trigger a shear increase and thus intensify the detachment forces. Lecuyer et al. (2011) reported not only a decreasing number of adhesion events while increasing the shear, but also an increasing number of firmly attached bacteria. Park et al. (2011) obtained the highest level of adhesion in microfluidic channel for intermediate values of shear. Thus, despite the large number of studies dealing with the impact of shear stress on adhesion coverage, many aspects remain unclear. In addition, shear can also qualitatively impact attached bacterial communities. To our knowledge, only very few studies (Habouzit et al., 2011; Rochex et al., 2008) investigated changes of communities in biofilms, exhibiting a gap in the literature. However, it could be interesting to know whether or not shear can be used to control or select bacterial communities since the adhesion step.

Microbial adhesion has also been widely reported as being possibly impacted by the substratum characteristics. Indeed, all bacteria species have their own intrinsic features determining their attachment ability. This ability is related to the substratum properties such as surface energy, hydrophobicity or roughness. In addition, the affinity of a given

microorganism to a given substratum material plays a key role in both quantitative and qualitative properties of adhesion. Meylheuc et al. (2006) characterized different types of substrata in terms of surface energy and hydrophobicity and obtained significantly different adhesion of *Listeria monocytogene* depending on the substratum. Habouzit et al. (2011) investigated up to seven materials and demonstrated significant dissimilarities in surface coverage and structure of bacterial communities.

Our work was carried out in Couette Taylor reactors (CTR) basically used for adhesion (Habouzit et al., 2011) and biofilm studies (Derlon et al., 2008; Florjanič and Kristl, 2011). This kind of reactors presents many advantages. The liquid phase is completely mixed, ensuring an uniform distribution of bacteria in the bulk phase (Characklis and Marshall, 1990). The constant wall shear stress distribution makes also this reactor very relevant. Furthermore, hydrodynamic conditions and flow regimes are well-defined (Andereck et al., 1986; Kataoka, 1986) and shear stress can be precisely estimated (Racina and Kind, 2006; Rochex et al., 2008). High Reynolds numbers can also ensure a turbulent flow.

In the literature, most of the research were devoted to the impact of shear on adhesion in pure culture and under a laminar flow (Bakker et al., 2003; Lecuyer et al., 2011; Wang et al., 2011). The novelty of this work is to investigate the adhesion process for mixed culture in a turbulent flow which is more relevant for bioprocess engineering. In industrial and man-made processes as well as in natural environments, adhesion is mediated by many different strains of microorganisms, either cooperating or competing for the surface colonization (Bos et al., 1994; Meylheuc et al., 2006). A complex and diverse inoculum seems more appropriate to mimic these issues. Besides, complex hydraulic circuits found in industrial processes make the range of encountered shears and Reynolds numbers very wide (Brugnioni et al., 2012; Lelièvre et al., 2002).

In the present work, we focused on looking at the shear stress impact on microbial adhesion in these conditions. A wide range of shear stresses, 0.09-7.3 Pa, equivalent to a range of wall shear rates of 86-7300 s⁻¹, were tested (5,000 < Re < 72,000). Two materials were used (PP and PVC) as substratum to evaluate whether or not different impacts of the shear were obtained. Both qualitative and quantitative aspects of microbial attachment morphology were characterized as well as adhered bacterial communities.

III.1.2.3 *Materials and methods*

III.1.2.3.1 *Reactor characteristics*

Annular reactors – also named Couette-Taylor reactor (CTR) – from Biosurface Technologies Cord, Bozeman, USA (model 1320LJ) were used to investigate the microbial adhesion. It consisted of a rotating inner cylinder and a non-rotating outer cylinder. The inner cylinder was driven by a motor whose rotational speed can be selected – from 25 to 350 rpm – allowing the selection of different shear stresses. The radius of the inner cylinder (r_i) and of the outer cylinder (r_e) were 70 and 98 mm, respectively and the gap (δ) between the two cylinders was 28 mm. Up to 20 removable slides can be placed on the inner cylinder and they are beveled to perfectly fit slots on the inner cylinder and minimize local secondary flow. The available surface area for adhesion was 18.75 cm² (150 mm x 12.5 mm) per slide.

Two different substrata were selected based on Habouzit et al. (2011): polyvinyl chloride (PVC) and polypropylene (PP). Their characterizations, in terms of surface energy and roughness, are summed up in Tableau III-1.

	Surface energies (mJ.m ⁻²)					Roughness measurements (µm)				
	γ	γ_{LW}	γ_{AB}	γ^-	γ^+	Ra	Rz	Rmax	Rpk	Rvk
PP	35.6 ± 1.7	34.1 ± 1.4	1.6 ± 1.0	3.5 ± 1.1	0.2 ± 0.2	0.041 ± 0.006	0.648 ± 0.311	1.628 ± 0.453	0.110 ± 0.085	0.142 ± 0.000
PVC	51.2 ± 1.9	43.1 ± 1.5	8.1 ± 1.2	6.5 ± 1.2	2.5 ± 0.5	0.038 ± 0.001	0.553 ± 0.099	0.845 ± 0.191	0.092 ± 0.028	0.075 ± 0.014

Tableau III-1: Characterization of the two materials used as substrata: PVC and PP. γ surface energy; γ_{LW} , Lifshitz–Van der Waals component; γ_{AB} , polar component; γ^- , electron donor interaction component; γ^+ , electron acceptor interaction component; Ra, arithmetical average; Rz, mean peak to valley heights of five adjoining sample lengths; Rmax, distance of the highest peak to the deepest valley of the five sections mentioned in Rz definition; Rpk, measurement of the peaks which will be the areas of most rapid wear; Rvk, oil retaining capability of the valley.

Using an anaerobic consortium, these materials showed significant differences in the structures of adhered bacterial communities (Habouzit et al., 2011). PP also presented a higher surface coverage than PVC. It can be noted that both materials can be considered as

smooth compared to industrial materials and differences in adhesion between PP and PVC were explained by the surface energy.

III.1.2.3.2 *Hydrodynamics and shear stress*

Hydrodynamic conditions and flow regimes in CTR are well documented. One of the first extensive study was from Taylor (1923) where the Taylor vortex flow was described. This flow regime is characterized by the presence of superposed toroidal vortices. Other flow regimes characteristic of CTR have been well described (Andereck et al., 1986; Kataoka, 1986). The flow regime depends on two dimensionless numbers, the Reynolds number (Re) and the Taylor number (Ta):

$$Re = \frac{\Omega r_i \delta}{\nu} \quad [16]$$

$$Ta = \frac{\Omega r_i^{\frac{1}{2}} \delta^{\frac{3}{2}}}{\nu} \quad [17]$$

where Ω is the rotational speed of the inner cylinder (rad.s^{-1}) and ν is the kinematic viscosity of water ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$). Both numbers are often described as the ratio between inertial forces – centrifugal forces in CTR – and viscous forces. They can also be used to determine the turbulence onset.

As our aim was to study microbial adhesion under turbulent flow, determining the rotational speed from which the turbulence onset is ensured was necessary. Calculations based on literature (Andereck et al., 1986; Kataoka, 1986; Taylor, 1923) highlighted a $Ta = 500$ for the onset of the Turbulent Vortex Flow. Even at the lowest rotational speed of 25 rpm on our system, Ta equaled 3,245 ensuring that a turbulent flow was effective.

Wall shear stress (τ) was also well modeled in CTR. As described by Racina and Kind (2006) and applied by Rochex et al. (2008), the following equations can be used to estimate τ :

$$\tau = 2.13 \frac{\left(\frac{r_i}{r_e}\right)^{\frac{3}{2}}}{\left(1-\frac{r_i}{r_e}\right)^{\frac{7}{4}}} Re^{1.445} \frac{\rho v^2}{2\pi r_i^2} \quad \text{for } Re > 800 \quad [18]$$

$$\tau = 0.113 \frac{\left(\frac{r_i}{r_e}\right)^{\frac{3}{2}}}{\left(1-\frac{r_i}{r_e}\right)^{\frac{7}{4}}} Re^{1.764} \frac{\rho v^2}{2\pi r_i^2} \quad \text{for } Re > 10^4 \quad [19]$$

where ρ is the density of water ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$). For the lowest available speed of 25 rpm, Re equaled 5,131 and the shear stress on the inner cylinder was 0.09 Pa. For the highest rotational speed of 350 rpm, τ equaled 7.3 Pa. Two intermediate shear stresses were also tested: 3.7 and 0.79 Pa which corresponded respectively to the linear and the logarithmic middle values between the highest and the lowest shears. These four shear stresses are equivalent to 86 – 787 – 3700 and 7300 s^{-1} shear rates.

III.1.2.3.3 ***Microbial adhesion protocol***

One day before each experiment, fresh activated sludge were collected from a wastewater treatment plant (Armissan, France). It was firstly settled and the supernatant was recovered to avoid the presence of big aggregates. The supernatant was then fed with an equal amount of yeast extract, meat extract and peptone with a ratio Chemical Oxygen Demand (COD) over Volatile Suspended Solids (VSS) of $0.1\text{g}_{\text{COD}}\cdot\text{g}_{\text{VSS}}^{-1}$. The supernatant was aerated for 24h so bacteria were able to consume the substrate and to grow. An active and concentrated inoculum was thus obtained. Before the experiment, we checked that no or only little COD remained in the inoculum to ensure that no bacterial growth occurred during the adhesion process.

Reactors and slides were sterilized with a detergent solution (RBS 35, Traitements Chimiques de Surfaces, Frelinghien, France) and rinsed with autoclaved water. Rotation of the inner cylinder was switched on at the determined speed and then the inoculum was added. After a one-hour contact time between inoculum and slides, reactors were washed out with a $30\mu\text{m}$ filtered and autoclaved outlet of the wastewater treatment plant. Eight volumes of this solution were added in one hour to wash out the planktonic bacteria. By this way, almost no bacteria remained in the liquid phase when rotation was stopped. This protocol ensured that the observed adhesion necessarily occurred when shear was applied on the slides. Slides were removed from the reactor and processed either for morphological and microbiological characterizations.

III.1.2.3.4 ***Morphological structure analysis***

III.1.2.3.4.1 *Image acquisition*

All the solutions used for staining slides and image acquisition were prepared with the outlet of the wastewater treatment plant. This outlet was first filtered at $0.2\mu\text{m}$ in sterile

conditions. This allowed to minimize changes in osmotic and ionic forces and to avoid detachment of bacteria on the substratum.

Once carefully removed from the reactor, slides were rinsed and soaked in a DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) solution for staining. Then slides were rinsed again and glued at the bottom of a Petri dish filled with the filtered outlet. Microscopic observations were done with an Olympus BX 60-F microscope and either a 100x oil immersion objective (in this case, slides were dried at 35°C for one hour) or a 60x water-immersion objective. Acquisition was realized with CCD Nikon Digital Camera DXM 1200F. Images of the dimension 1280x1024 pixels² equivalent to 0.013 mm² were acquired in lossless RGB tif format. The acquisition parameters such as exposition time, sensitivity, use of UV filters were kept constant for a given material and a given experiment. 60 images were recorded per slide.

III.1.2.3.4.2 Image processing

Images were processed using the software Image J. First of all, the function “Subtract Background” was used to remove heterogeneous light distribution. Images were then binarized using the “Color threshold” function. Many threshold algorithms were tested. The image processing was found to be more reliable when the thresholding value was fixed. To determine this thresholding value, the Renyientropy thresholding algorithm was run on images and the mean of all the obtained values was chosen. Finally, functions “Close” and “Open” were applied in order to fill small holes and remove isolated pixels considered as noise.

From these black and white images, three parameters were calculated:

- surface coverage defined here as the fraction of black pixels over the total pixels (black and white pixels),
- number of particles, whatever their size and shape,
- average size of particles, whatever their shape.

Statistical analyses were then performed on these parameters with the statistical software R 2.15. Boxplots were used to remove outliers as well as ANOVA and t-tests to test the significativity of our results.

III.1.2.3.5 **Microbiological structure analysis**

III.1.2.3.5.1 *DNA extraction*

Slides were rinsed and scraped with moistened sterile quartz wool. This bacteria harvesting method had been tested by staining scraped slides to check if adhered bacteria were removed from the substratum. Wool was frozen at -20°C until DNA extraction was performed.

DNA extraction was realized using the QIAamp DNA Stool Minit Kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). The extraction protocol described by the manufacturer was applied. The quantity and purity of DNA was checked by spectrometry.

III.1.2.3.5.2 *PCR-SSCP*

Bacterial communities were characterized by PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) fingerprinting technique (Rochex et al., 2008; Wéry et al., 2008). The V3 region of the 16S rRNA gene were amplified with the following mix: 2.5µl of 10X Pfu Turbo buffer (Stratagene), 0.5µl of fluorescent dye-labelled primer W49 (20µM) (ACGGTCCAGACTCCTACGGG, *Escherichia coli* position F331), 0.5µl of primer W104 (20µM) (TTACCGCGGCTGCTGGCAC, *E. coli* position R533), 2µl of deoxynucleoside triphosphates (dNTPs 2.5mM) and 0.25µl of Pfu Turbo DNA polymerase Stratagene (2.5U/µl), 1µl of genomic DNA and water was added to obtain a final volume of 25µl. Thermal amplification cycling was as described in Rochex et al. (2008). Amplification product sizes were confirmed by electrophoresis. Finally PCR-SSCP products were separated par capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism (CE-SSCP). One µl of diluted PCR-SSCP products was mixed with 18.925 µl of formamide and 0.075 µl internal size standard ROX 400 HD (Applied Biosystems, California, USA). The mix was placed at 95°C for 5 minutes for DNA denaturation and rapidly transferred in ice for 10 minutes. This methods allows to obtain a single strand conformation of DNA which depends on the sequence. CE-SSCP was performed using an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) equipped with four 50-cm capillary tubes filled with 5.6% conformation analysis polymer (Applied Biosystems) in the corresponding buffer and 10% glycerol. The injection of DNA in capillaries required 5 kV for 3 s. Electrophoresis was carried out at 15 kV and 32°C for about 30 min per sample.

III.1.2.3.5.3 *Fingerprinting profile statistical analysis*

Data were analyzed with the package Statfingerprints implemented in the software R 2.12 (Michelland et al., 2009). To compare SSCP profiles more easily, Principal Component Analysis based on their genetic distances was performed by using the package vegan designed for community ecology studies (Oksanen et al., 2011).

III.1.2.3.6 **Strategy for microbial adhesion study**

The determination of the effect of shear stress on microbial adhesion was realized in three successive phases (Tableau III-2). For each phase, both morphological structure – spatial pattern of adhesion – and microbiological structure – bacterial communities – were characterized. These two characterizations being time-consuming, it was not possible to treat more than 20 slides per day. As a consequence, when three reactors were operated simultaneously, no more than seven slides per reactor were analyzed.

The first phase (phase 1) consisted in checking the variability of biofilms grown at the same time in one reactor. By demonstrating that two slides placed in the same reactor had a satisfying repeatability, we were able to reduce the required number of slides per operating condition (i.e. per reactor) and increase the number of reactor instead for phases 2 and 3. The total number of analyzed slides was the same from one experiment to another but their repartition changed depending on the number of CTR in operation.

Experiment	Number of CTR	Shear stress (Pa)	Material	Aim
Var 1	1	- / - / - / 7.3	PP / PVC	Phase 1: Variability test
Var 2		0.09 / - / - / -		
Shear 1	3	0.09 / - / 3.7 / 7.3	PP	Phase 2: Impact of shear stress
Shear 2		0.09 / 0.79 / - / 7.3		
Mat	2	0.09 / - / - / 7.3	PP / PVC	Phase 3: Material test

Tableau III-2: Description of the different experiments carried out.

For phase 1, two runs (Var 1 and Var 2) were carried out in order to investigate the adhesion variability for the two substrata (PP and PVC) at the extreme shear stresses of 0.09 and 7.3 Pa. Then, four shear stresses ranging from 0.09 to 7.3 Pa were tested to investigate the impact of hydrodynamic strengths on adhesion (phase 2). A first run was carried out with three shear stresses: 0.09, 7.3 and an intermediate value of 3.7 Pa. In a second run, 0.09 and

7.3 Pa were repeated to be used as references and the intermediate value was changed to 0.79 Pa. These shear stresses are equivalent to the following shear rates: 86 – 787 – 3700 and 7300 s⁻¹. Finally in phase 3, another material, PVC, was used to confirm the results obtained on PP. Two CTR, operated at different shear stresses – 0.09 and 7.3 Pa – and containing both material slides, were carried out, and PP slides were used as a control. The effect of both shear and material on adhesion was investigated.

III.1.2.4 **Results**

III.1.2.4.1 **Variability test**

The first task was to investigate the variability of two slides of the same material placed in the same reactor. Two experiments (Var1 and Var2) were run with 10 slides of each material split in two groups: four slides for the morphological study and six for the microbiological study.

III.1.2.4.1.1 *Morphological data*

For the morphological characterization of adhesion, a set of pictures was recorded per slide. Surface coverage, number and size of particles were then extracted from the processed images. Equation 4 was used to check if enough images were recorded to obtain a reliable estimation of the averaged values of the three parameters (Yau, 2013).

$$n = \left(\frac{z_{\alpha/2} \sigma}{E}\right)^2 \quad [20]$$

where n is the required sampling size, $z_{\alpha/2}$ is the 97.5th percentile of the normal distribution, σ the standard deviation of our sample and E the 10% margin of error. This equation gives the required number of pictures to create a 95% confidence interval with a margin of error of 10% of the mean. Based on these calculations, a sample size of 60 images recorded per slide was finally chosen.

	Surface coverage		Number of particles		Size of particles	
	PP	PVC	PP	PVC	PP	PVC
VAR1 0.09 Pa	9.8 %	26.3 %	5.9 %	16.1 %	12.0 %	17.0 %
VAR2 7.3 Pa	8.2 %	10.2 %	10.6 %	11.7 %	7.6 %	13.0 %

Tableau III-3: Coefficients of variation based on four slides of each material (PP and PVC) per condition (i.e. shear stress).

Tableau III-3 presents the coefficients of variation of the three adhesion parameters for each tested conditions. For PP material, the coefficients of variation fluctuated between 5.9% and 12.0% which is acceptable for all the parameters. Values were slightly higher for PVC material: coefficients of variation ranged from 10% to 17% except for the surface coverage at 0.09 Pa where the coefficient equaled 26.3%. This is probably due to the heterogeneity that can exist between two slides. Indeed, slides coming from the same manufacturing run can even present small color differences that can affect image acquisition and processing. As PP slides demonstrated more repeatable results for the morphological parameters, this material was selected for phase 2.

III.1.2.4.1.2 Microbiological data

The repeatability for the bacterial communities was also investigated. Six slides of each material placed under the same shear stress were analyzed with the CE-SSCP fingerprinting technique (Figure III-3). For each graph, SSCP profiles overlaid very well, highlighting a good repeatability for both materials and shear.

The repeatability being demonstrated for both morphological and microbiological data, the number of slides per condition can be decreased and the number of concomitant CTR can be increased. The impact of the shear stress using three CTR was then investigated (phase 2).

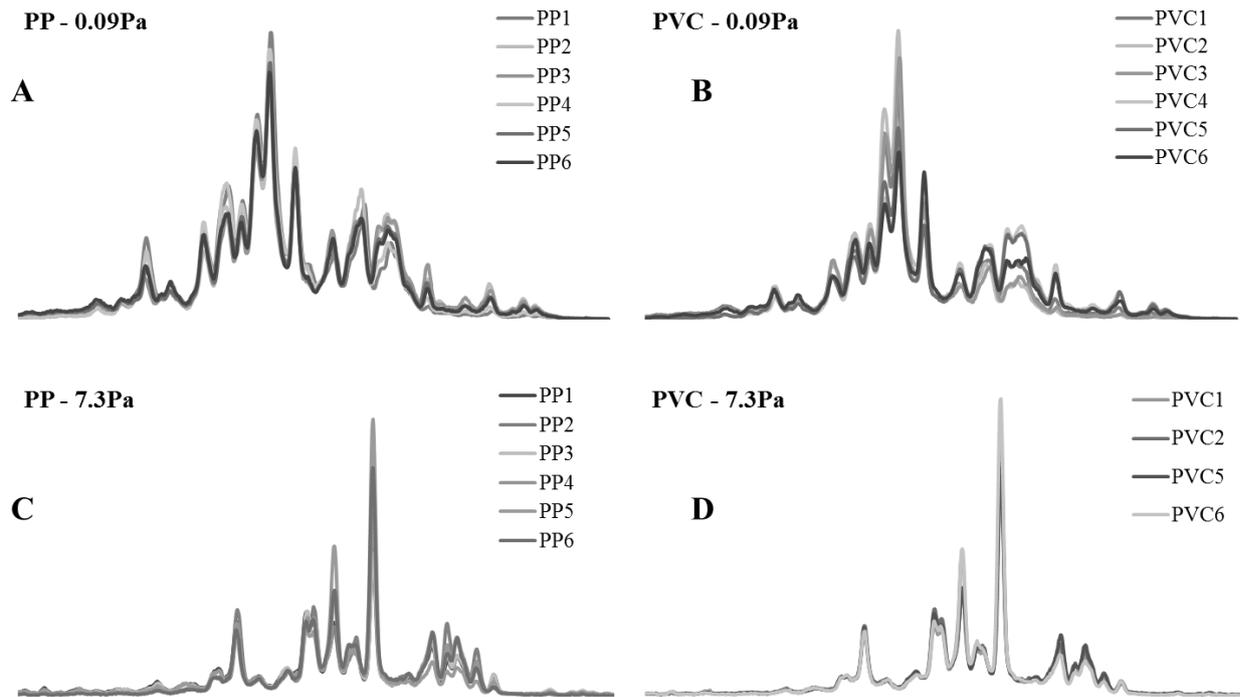


Figure III-3: SSCP profiles corresponding to the different tested conditions. PP material (A and C) and PVC material (B and D) at 0.09 Pa (A and B) and 7.3 Pa (C and D). Only four PVC profiles were obtained at 7.3 Pa because of unsuccessful DNA extractions on slides PVC3 and PVC4.

III.1.2.4.2 *Impact of the shear stress on the microbial adhesion*

The impact of the shear stress on adhesion was studied in phase 2. Only one material was used (PP). Two runs were carried out, Shear 1 and Shear 2, allowing to test four different shear stresses ranging from 0.09 to 7.3 Pa (Tableau III-2). For each experiment, three CTR were simultaneously run, each containing six slides.

III.1.2.4.2.1 *Morphological data*

Figure III-4 presents the results for the three parameters describing the physical structure of the microbial adhesion. For each graph, four points corresponding to the four shear stresses – 0.09, 0.79, 3.7, 7.3 Pa – are presented. Since the adhesion characteristics were obtained thanks to two successive runs, we scaled all values by using the 0.09 Pa values as a reference. As a consequence, for a given parameter, values obtained for 3.7 Pa and 0.79 Pa were divided by values obtained at 0.09 Pa in Shear 1 and Shear 2 experiments, respectively. For 7.3 Pa, two experimental values were obtained – one per experiment – and the average value with the standard deviation are represented in Figure III-4.

ANOVA tests were performed, demonstrating a highly significant impact of the shear stress on both quantitative aspects (*i.e.*, the surface coverage) and qualitative aspects (*i.e.*, number and size of particles) with p-values lower than 10^{-16} .

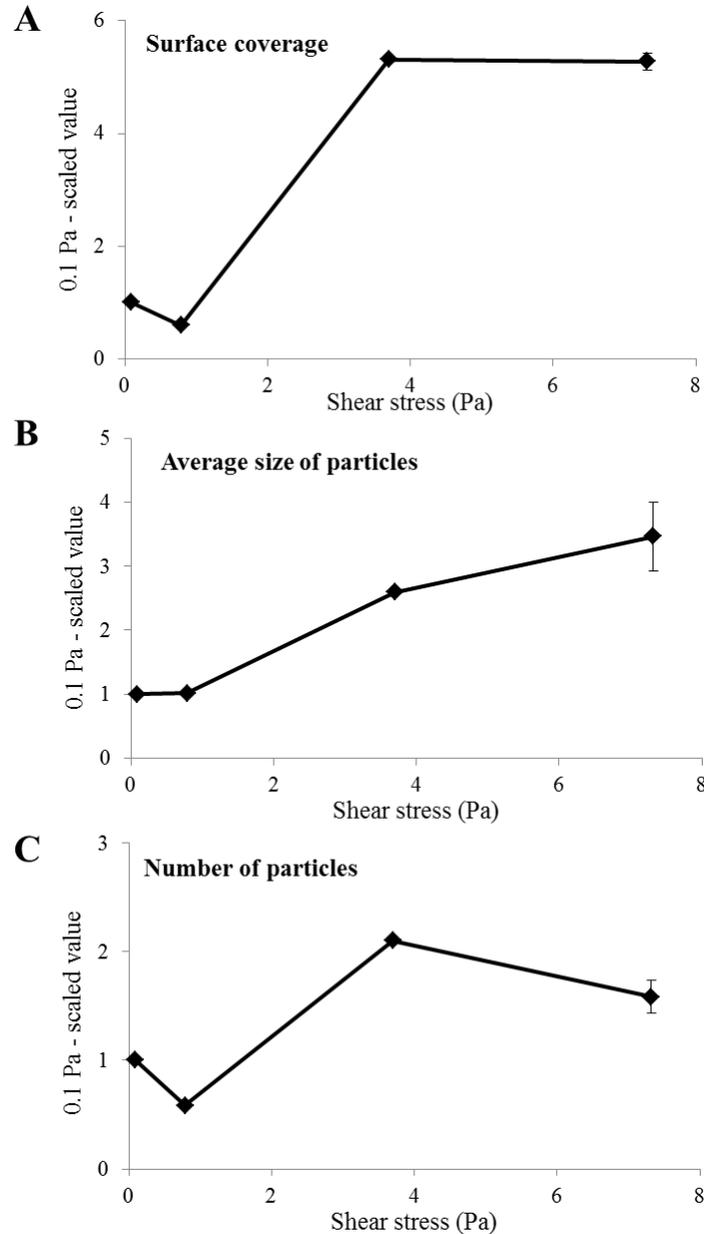


Figure III-4: Variation of the three morphological parameters with shear. Surface coverage (A), number of particles (B), average size of particles (C). The y-axis represents values scaled by the value obtained at 0.1 Pa shear.

The surface coverage increased with increasing shear, but the relationship was not linear. The two lowest shear stresses had low and similar values but surface coverages were five

times higher at 3.7 and 7.3 Pa. As a consequence, shear stress triggered a non-linear increase in the quantity of attached bacteria until a plateau seemed to be reached.

The variation of the average size of attached particles per cm^{-2} was almost linear with a R^2 equal to 0.96. The size of detected particles increased with increasing shear. In the other hand, the variation of the number of detected particles was surprising. The maximum value was obtained for 3.7 Pa shear with twice as particles as for 0.09 Pa. For 7.3 Pa, the number of detected particles was lower but still greater than the two lowest shears. Since the surface coverage is the combination of both the size and the number of particles, these two parameters compensated each other for high shear stress. For 3.7 and 7.3 Pa, surface coverages were equal but the number and size of particles were different. A higher number of particles compensated the lower average size and vice versa. As a consequence, different adhesion patterns were actually observed. Figure III-5 shows four representative microscopic pictures observed at the four shears.

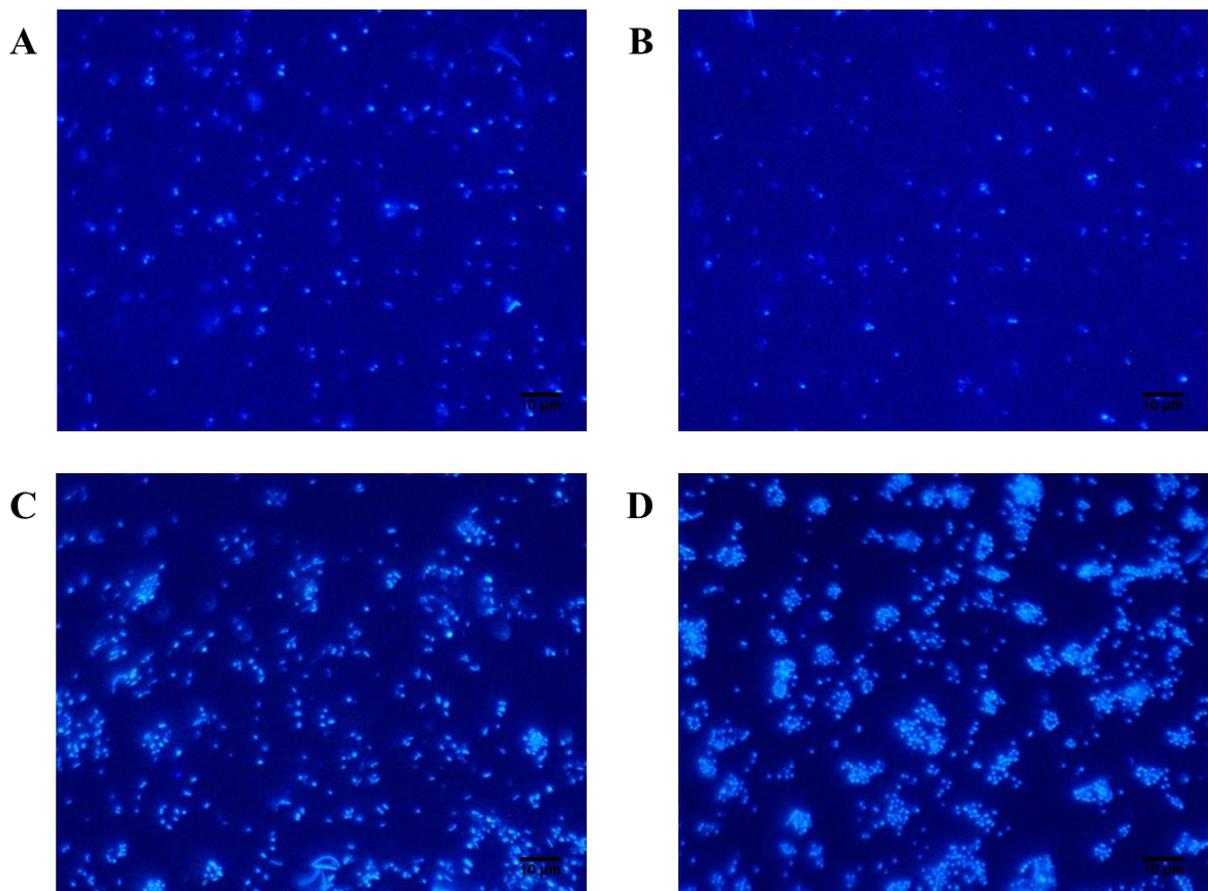


Figure III-5: Epifluorescence microscopic pictures. 60x water immersion objective. 0.09 Pa (A), 0.79 Pa (B), 3.7 Pa (C) and 7.3 Pa (D)

The increase in the surface coverage with increasing shear is visualized. Pictures A and B corresponding to the lowest shear stresses present a surface coverage much lower than pictures at 3.7 and 7.3 Pa. In addition to these quantitative aspects, single cells were randomly scattered on the surface for 0.09 Pa and for 0.79 Pa. However, for a shear stress of 3.7 Pa, the picture shows that bacteria gathered and formed small clusters even if isolated attached bacteria remained numerous. Since, during the adhesion phase, the liquid solution was depleted in nutrients, formation of clusters was only related to cells aggregation according to shear stress and not to microorganism growth. We therefore refer to these aggregates as clusters and not micro-colonies whose formation is linked to growth. At 7.3 Pa, single bacteria were still observed but their number significantly decreased. Most of the surface coverage consisted of bacteria gathered as clusters. This is the reason why fewer particles were detected whereas a similar number of bacteria as at 3.7 Pa were attached: well-formed clusters were counted as one particle of greater size. This explains why adhesion under 7.3 Pa presented a pattern with less detected particles but higher average size than under 3.7 Pa (Figure III-4). As a consequence, morphological analysis demonstrated a clear evolution in the spatial distribution with increasing shear from a single-cell pattern to a cluster pattern. The average size of particles increased with increasing shear, highlighting the intensification of this phenomenon.

III.1.2.4.2.2 Microbiological data

The impact of the shear stress on bacterial communities was also investigated. One Principal Component Analysis per experiment was performed on SSCP profiles coordinates. Results are presented in Figure III-6. On each graph, y-axis corresponds to the first Principal Component which gathers 88% and 79% of the information contained in the SSCP profiles of Shear 1 and Shear 2 experiments, respectively.

For experiments Shear 1 (Figure III-6A) and Shear 2 (Figure III-6B), a progressive change of the attached communities with increasing shear was obtained. The distribution of the profiles was strongly dependent on the shear stress applied during the adhesion experiment.

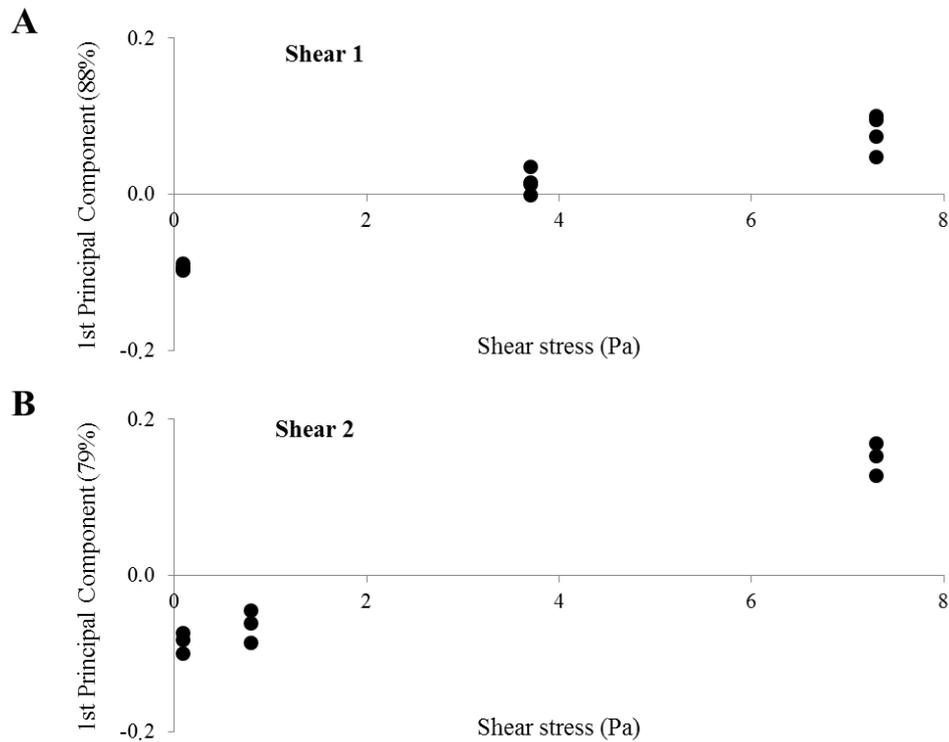


Figure III-6: Attached bacterial communities on PP slides with shear stress for Shear 1 (A) and Shear 2 (B) experiments. Each point (●) corresponds to one slide. Y-axes are the first Principal Component resulting from the PCA performed on each experiment. For Shear 1 and Shear 2, the first Principal Component sums up 88% and 79% respectively of the total information that are contained in SSCP profiles.

III.1.2.4.3 *Impacts of shear stress and material on the microbial adhesion*

In order to check the impact of the shear rate on the adhesion on the surface of different materials, PVC slides were used in the study. PP and PVC are common plastic materials used in industrial processes and they present distinct adhesion characteristics (Habouzit et al., 2011). As the number of slides per reactor increased when studying two materials, only two reactors were carried out (Tableau III-2) at the extreme shear stresses of 0.09 and 7.3 Pa.

III.1.2.4.3.1 Morphological data

Surface coverage, number and average size of detected particles were characterized for PP and PVC slides at both shear stresses (Figure III-7). For PP, surface coverage at high shear stress was 3.5 times greater than at low shear stress, confirming previous results. This difference between surface coverages at high and low shear stress was more pronounced for PVC with a 4.2-fold increase. This increase was explained for both materials by an increase in the average size and number of particles. For PP, the average size increased of 35% while the number of particles had a 150% increase from low to high shear. Same trends were observed for PVC with increases of 60% and 160% for size and number of particles, respectively. Welch's t tests were performed on each parameter to compare low and high shear values and high level of significance was obtained for all tests (p-value lower than 10^{-16}). As a consequence, the impact of the shear in both qualitative and quantitative microbial adhesion features was confirmed on PVC material with an increase in the quantity of attached bacteria (i.e. surface coverage) and in the size of detected particles, highlighting the formation of clusters.

The comparison of the adhesion characteristics on both materials at a given shear stress is also interesting. Based on measurements and statistical analyses done by Habouzit et al. (2011), PP was considered as a slightly rougher material and with a significantly lower surface energy than PVC (Tableau III-1). Regarding the microbial adhesion, PP substratum presented higher values for all three parameters and for both shears. Welch's t tests were also performed and demonstrated a high significance of the material's impact on the adhesion. These data confirmed results obtained by Habouzit et al. (2011) where materials with lower surface energy are associated to higher surface coverages. Var 1 and Var 2 also presented same trends (data not shown). Altogether these data demonstrate (i) the impact of the shear observed on PP was reproducible to another material (PVC) with different roughness and surface energy properties and (ii) both the material and the shear had a significant effect on quantitative and qualitative features of the early biofilm morphology.

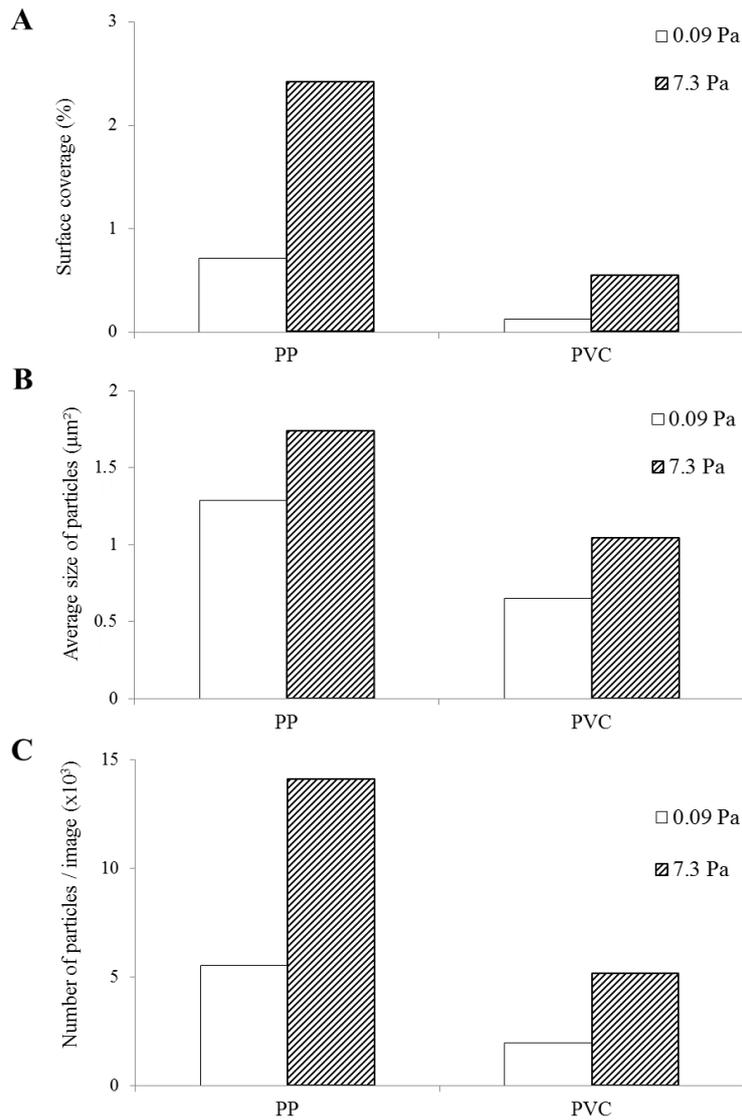


Figure III-7: Bar plots representing the surface coverage (A), the average size of particles in μm^2 (B) and the number of particles mm^2 (C). Empty bars are for low shear stress (0.09 Pa) and hatched bars are for high shear stress (7.3 Pa).

III.1.2.4.3.2 Microbiological data

Fingerprint of the attached bacterial communities was also determined for each material and shear. Figure III-8 represents the Principal Component plot performed on SSCP profiles and only the first Principal Component (70%) is represented. Communities adhered at the low or high shear stresses are well separated along the first Principal Component. Genetic differences in these communities were important, indicating a strong impact of shear on microbial community structure adhered on both PVC and PP materials. However, the kind of material has no significant impact on microbial communities.

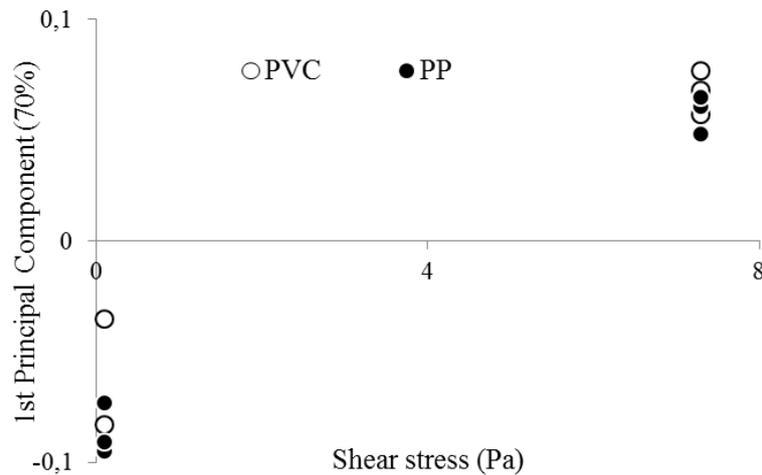


Figure III-8: Principal Component plot performed on the bacterial communities harvested on slides. Euclidian distances between points are proportional to genetic distances between communities.

III.1.2.5 Discussion

Many studies reported the impact of shear stress on bacterial adhesion. But most of them are realized at low Reynolds numbers and for pure cultures which are not the most relevant features for industrial processes. This study focused on high Reynolds number – ranging from 5,000 to 72,000 – and a complex consortium of microorganisms. Our objective was to identify whether shear stress influences microbial adhesion, the spatial distribution of bacteria on the substratum and the structure of attached microbial communities.

As reported by Liu and Tay (2002), biofilm formation starts with microbial adhesion and this adhesion can be divided in two steps. The first step consists of physical movements allowing bacteria to reach the substratum surface. Many forces are involved such as diffusion, gravity, motility or hydrodynamic forces. Then microorganisms have to create bonds with the substratum surface. The extended Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (XDLVO) models (van Oss, 1995), initially thought for colloidal particles, are widely used to describe and understand this step. Forces such as Van der Waals force, hydrogen bonds, electrostatic interaction and many others play a key role.

The present work demonstrated first that adhesion is quantitatively enhanced by high shear stresses. Mass transport increase indeed promotes adhesion facilitating bacterial access to the substratum surface. But here a plateau was reached, surface coverages obtained at 3.7

and 7.3 Pa being similar. This could be explained by the increase of the detachment force probability due to high shear rates that compensates mass transport promoting effect. The ambivalent effect of mass transport on adhesion is well known (Busscher and van der Mei, 2006). It increases the access to the substratum but also promotes detachment by increasing shear. The two opposite mechanisms could explain similar values obtained at 3.7 and 7.3 Pa, both effects compensating each other.

However, despite this quantitative resemblance, differences in the spatial distribution were reported from the present experimental work. Clusters were identified for higher shears and their size increased with increasing shear stress. Same behaviors have already been described (Brugnoni et al., 2011; Perni et al., 2006). Co-adhesion and/or co-aggregation phenomena are likely to be involved in this clusterisation process. Either bacteria attached to the substratum surface as a group already formed in the liquid phase (co-aggregation) or they attached preferentially to other bacteria already fixed on the material forming growing clusters (co-adhesion) (Bos et al., 1994). High Reynolds numbers promote collisions in the bulk phase and formation of aggregates. These aggregates can reach the substratum and attach to it. Coufort et al. (2005) analyzed floc size distribution in CTR and reported that shear stress decreases the floc size while increasing their number. This observation can be *a priori* inconsistent with our results, but bigger particles are also more exposed to shear stress once attached on the substratum surface. At low shear stress, aggregates are too big to be able to stay attached. And as a high amount of biomass is mobilized as big aggregates, a single-cell adhesion pattern is obtained. And as the shear increases, a new equilibrium between floc size distribution, mass transport and detachment force is established.

On the other hand, with high shear, bonds between microorganisms and the substratum surface have to be strong enough to overcome the shear strengths and co-adhesion could be an efficient mechanism to understand differences in cluster formation at high shear stress. To our knowledge, only a few studies have been carried out on co-adhesion phenomena. Bos et al. (1994) proposed this term for “the stimulation of microbial adhesion through interactions between a planktonic cell and a sessile cell”. Some bacteria can play the role of early colonizers and then other bacteria of the liquid phase are able to fix to these primary colonizers more readily than to other place on the substratum. These early colonizers can also be used as anchorage points to finally reach the substratum surface. Bos et al. (1995) showed the positive impact of the shear on co-adhesion kinetics between *Actinomyces* and

Streptococci. Mass transport allows more planktonic bacteria-attached bacteria interactions. But beyond a given shear, contact between both microorganisms is too short for strong bonds to arise. In this case, co-adhesion cannot occur and co-adhered bacteria are rapidly detached.

The present study also demonstrates quantitative differences in adhesion between PP and PVC materials, probably because of different affinities of the microorganisms to these materials. The quantity of bacteria attached on PP substratum was much higher. This corroborates data found in the literature (Habimana et al., 2014; Habouzit et al., 2011; Meylheuc et al., 2006) indicating that rougher and more hydrophobic materials are more suitable for microbial adhesion. Qualitative differences such as the size of particles were also observed. We could expect that the size would be higher on PVC for which affinity is lower and in doing so co-adhesion would be promoted. But greater sizes of cluster were obtained for PP. This is very likely explained by the fact that at high shear stress, kinetics of adhesion and low affinity for PVC do not allow strong bonds to be created between PVC and co-adhered bacteria. They might be washed out before strong interactions occurred. On PP material, a higher affinity makes the required time to create strong bonds shorter and co-adhesion could be possible. Also not all bacteria are able to co-aggregate and co-adhere. It is likely that bacteria having high affinity for PP are also able to co-adhere as similar characteristics are required.

In addition to these morphological considerations, we demonstrated that different microbiological community structures can occur depending on the shear applied. The change in bacterial communities is gradual with shear magnitude. This could be explained by the different constraints that bacteria have to overcome to being irreversibly attached to the substratum surface. First, bacteria have to reach the substratum surface, and then, adhesion can occur. The XDLVO theory identifies two energy minima separated by an energy barrier that can help explaining bacterial attachment (Wang et al., 2011). These two energy minima correspond to the reversible and irreversible adsorptions as reported by Characklis and Marshall (1990). The ability for bacteria to (i) reach the substratum and (ii) overcome the energy barrier to develop an irreversible adsorption depends on many parameters and shear is one of them. This could explain why we observed different communities on the slides from the same inoculum (data not shown) and a gradual change in bacterial communities with shear. At low shear stress, the boundary layer is thicker and a higher distance has to be crossed by microorganisms to reach the substratum surface. In this layer, convection is not

effective anymore. Bacteria have to cross it either by diffusion, Brownian motion or motility. In other terms, bacteria displaying motility appendages possess a selective advantage to reach the substratum and could overcome this first obstacle more easily. As the shear increases, the boundary layer thickness decreases and this advantage might gradually become obsolete.

Furthermore, other levers of selection can arise. As the mass transport increases, more bacteria can reach the substratum but they have to create strong bonds to overcome the shear strain. Only bacteria having high enough affinity for the substratum – or with an already adhered bacterium – could present sufficient attachment kinetic and strength to overcome the energy barrier and develop an irreversible adhesion. And the more the shear strain develops, the more critical these conditions become.

Some bacteria possess ways to sense shear and can adapt their attachment. Thomas et al. (2002) demonstrated a shear-dependent adhesion in *Escherichia Coli*. It is mediated by the FimH adhesin which was found to be able to act as a force sensor. Lecuyer et al. (2011) reported similar shear-dependent adhesion on *Pseudomonas aeruginosa*. An increase in the residence time was observed with the shear. Bacteria were able to stay longer on the substratum surface as the shear strains increased. These works highlight the adaptation of adhesion strength as a function of shear. Bacteria possessing this kind of ability present an advantage for adhesion under high shear stress.

In addition, other intrinsic characteristics of bacteria can endow them a higher ability for adhesion. The shape plays a key role in the adhesion capability of bacteria (Young 2006). Some shapes present favorable selective advantages such as reducing exposure to shear stress or increasing their surface in contact with the substratum. Also, as we said previously, co-aggregation and co-adhesion constitute another way to overcome the energy barrier and develop an irreversible adhesion. Bacteria able to realize these phenomena are more likely to be found in the microbiological composition of attached communities.

III.1.2.6 **Conclusions**

The objective of this work was to test the impact of shear stress on bacterial adhesion. The characterization of the adhesion consisted in quantifying the spatial distribution of bacteria on the surface (i.e. morphological parameters) and also the composition of attached bacterial community. The study was carried out on a wide range of shear stresses (i.e. Reynolds numbers) and a complex consortium was used as inoculum. We found out that:

- Shear had a strong impact on attached bacterial communities.
- The quantity of attached bacteria globally increased with the shear but this is a nonlinear relationship. Similar values were obtained for 0.09 and 0.79 Pa and for 3.7 and 7.3 Pa but a drastic increase was noted between these two groups
- Different spatial distributions were observed depending on the shear. A single cell adhesion pattern was identified for low shear stresses. But as the shear increased, a cluster adhesion pattern appeared. Clusters formed and their size increased with the shear.

Altogether these data demonstrate that shear stress can be used as a lever to select one population or the other. The attached community could be adapted to a targeted objective by finding the optimal shear promoting its selection. This could be very useful when biofilm is used as a tool such as in environmental biotechnology. In addition, these results show the quantitative impact of shear on adhesion. This is critical to either prevent development of detrimental biofilms or optimize biofilm-based processes. Further work should however be done to determine whether these differences are smoothed or maintained during a biofilm maturation.

III.1.3 Discussion

Ces travaux confirment l'ambiguïté déjà rapportée concernant l'effet des conditions hydrodynamiques sur l'étape d'adhésion microbienne. Cependant ils permettent de mettre en évidence des phénomènes de structuration très peu évoqués auparavant. D'un point de vue quantitatif, nous avons démontré que l'augmentation de la turbulence et du cisaillement favorise l'adhésion et également qu'un effet de palier est observé avec la stabilisation de la quantité de microorganismes adhérents. C'est alors une transition principalement dans la distribution spatiale qui s'opère avec des regroupements de cellules, des clusters, de plus en plus nets et larges. Si l'origine reste à déterminer, il est probable que les phénomènes de co-adhésion et la co-agrégation soient responsables et constituent une réponse efficace pour lutter contre les forces de cisaillement. Ce type d'observations a déjà été rapporté dans la littérature (Brugnoni et al., 2011; Paris et al., 2007; Perni et al., 2006) mais jamais pour un temps de contact aussi court que deux heures. Il est probable que l'utilisation de consortia microbiens complexes utilisés dans nos travaux de recherche soit un facteur déterminant. En effet, la richesse microbienne de l'inoculum utilisé favorise la diversité des interactions possibles et augmente ainsi les probabilités de co-adhésion et co-agrégation. Les aptitudes à co-adhérer et co-agréger ne se valent pas d'une combinaison d'espèces à une autre (Bos et al., 1994). La mise en contact d'une plus grande diversité de microorganismes va donc accroître la probabilité d'observer ce genre de phénomènes.

Du point de vue de la structure de la communauté microbienne, ces travaux démontrent un effet progressif du cisaillement sur la composition de la flore. Les travaux sont très originaux sur ce point, puisque ce type d'étude n'a été mené jusqu'à présent qu'en souche pure. Même si il est impossible de comparer nos résultats avec la littérature, il est néanmoins possible d'émettre des hypothèses concernant les mécanismes gouvernant ce changement graduel de la flore fixée. Tout d'abord, pour de faibles cisaillements, l'épaisseur de couche limite où la diffusion est prépondérante est importante, et les bactéries possédant une motilité propre présentent un avantage stratégique dans la mesure où elles sont plus à même d'atteindre le support (O'Toole and Kolter, 1998; Wang et al., 2011). Dans cette hypothèse, l'accès au support représenterait donc un moyen de sélection. A l'inverse, avec l'augmentation du cisaillement et des forces de détachement, les probabilités de décrochement des microorganismes fixés augmentent. La pression de sélection serait alors assurée par les forces

d'adhésion liées à la capacité du microorganisme à s'accrocher fermement au support. Celles-ci sont conditionnées par de nombreux paramètres tels que la forme de la cellule (Young, 2006), les affinités de surface (Habimana et al., 2014; Meylheuc et al., 2006), les aptitudes à la co-adhésion et co-agrégation (Bos et al., 1995, 1994). Ainsi un changement progressif dans les facteurs gouvernant la sélection, de l'accès au support à la résistance au détachement, expliquerait les différences de structures microbiennes observées.

Ces résultats ouvrent aussi des perspectives d'un point de vue industriel et en ingénierie des biofilms. En effet, ils démontrent tout d'abord l'impact quantitatif du cisaillement sur l'adhésion microbienne. Cette information est utile, que l'objectif soit de prévenir la colonisation d'un milieu dans le domaine médical notamment, ou au contraire de permettre une inoculation rapide des supports dans le traitement de l'eau par exemple. En outre, ces travaux démontrent que les conditions hydrodynamiques peuvent être utilisées comme moyen de sélection des communautés microbiennes. Le cisaillement pourrait donc être optimisé afin de promouvoir la colonisation préférentielle d'une population donnée. Ceci peut s'avérer particulièrement intéressant en biotechnologie environnementale où il serait possible d'adapter la communauté à l'objectif souhaité (rendement épuratoire, pollution carbonée, azotée...).

Néanmoins, tous les phénomènes mis en jeu ici sont essentiellement physiques. Ces travaux, effectués sur des colonisations de deux heures, ne laissent que très peu de place aux réponses biologiques. La littérature démontre une intrication des phénomènes physiques et biologiques dans la structuration du biofilm, qu'elle concerne la morphologie (van Loosdrecht et al., 2002) ou les communautés microbiennes (Besemer et al., 2007). Il est donc primordial de s'intéresser à l'évolution au cours du temps des structures acquises lors de l'adhésion. Il est en effet possible qu'elles soient lissées ou au contraire entretenues voire amplifiées. Déterminer l'impact à moyen et long terme des structures observées lors de l'adhésion microbienne est une perspective essentielle de ces travaux.

III.2 Impact de l'histoire du biofilm sur son développement

III.2.1 Avant-propos

Il a été constaté dans la partie précédente que des structurations différentes étaient possibles dès les premières heures de la formation du biofilm. Prolongeant ce constat, nous nous sommes interrogés sur le devenir des structures acquises à un moment donné et sur leur évolution face à des changements de conditions environnementales. Dans les procédés industriels, il n'est pas rare d'avoir des conditions hydrodynamiques et d'accès au substrat variables au cours du temps (Elenter et al., 2007; Lelièvre et al., 2002). Mieux appréhender les réactions du biofilm face à ce genre de variabilités peut permettre d'anticiper et d'optimiser un procédé.

L'objectif de ce volet du projet de thèse est donc d'étudier l'impact de l'histoire du biofilm sur sa propre structuration et sur la conservation temporelle de ses caractéristiques structurelles. La Figure III-9 présente la réflexion qui a animé cette partie.

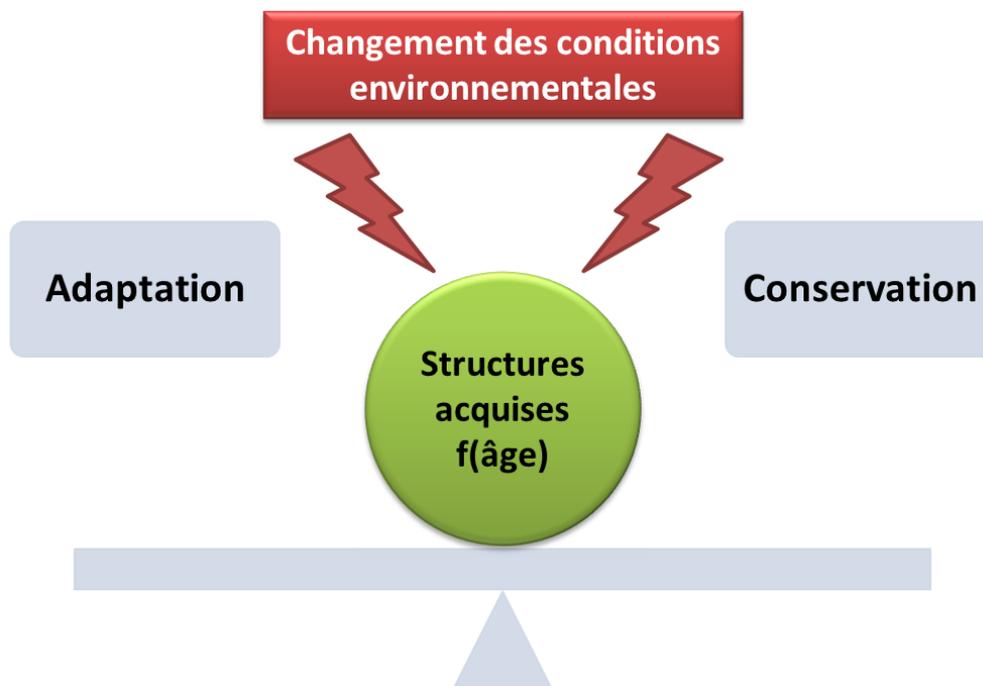


Figure III-9: Mise en évidence de la problématique de structuration des biofilms lors d'un changement dans les conditions environnementales

Le biofilm est soumis à un changement de conditions environnementales, ici un changement des conditions hydrodynamiques, et l'évolution de ses structures est suivie au cours du temps. L'évolution des caractéristiques du biofilm peut pencher soit vers l'adaptation aux nouvelles conditions hydrodynamiques, soit vers la conservation des structures déjà acquises. L'intérêt de l'étude est aussi de porter notre regard sur l'influence de l'âge du biofilm. En effet, il est intéressant de soumettre le biofilm à une modification environnementale à différents moments dans son développement. Ainsi, un aspect de temporalité et d'influence de l'âge du biofilm est considéré.

Quelques publications soulignent l'intérêt de prendre en considération l'histoire du biofilm pour expliquer et comprendre sa structure (Lewandowski et al., 2004; Picioreanu et al., 2000; Telgmann et al., 2004). Nos travaux, comme le présente la Figure III-10, viennent enrichir la littérature scientifique, non seulement en s'intéressant à l'âge du biofilm mais aussi en le soumettant à un changement environnemental permanent.

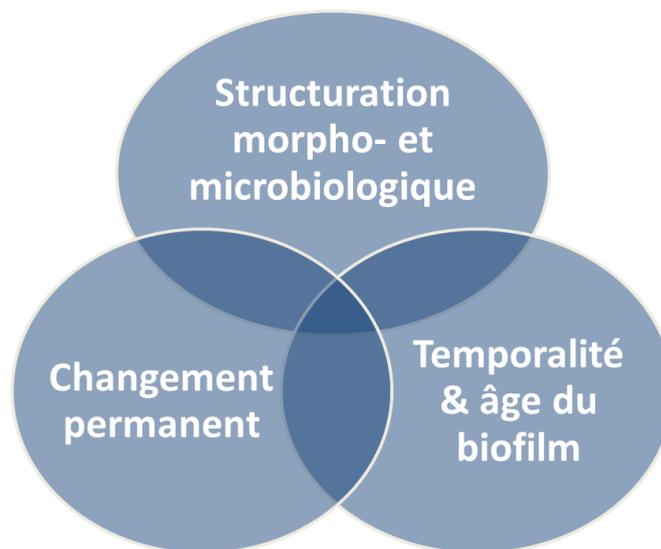


Figure III-10: Originalité des travaux concernant l'impact de l'histoire du biofilm

Tout d'abord, le critère d'histoire du biofilm ou de temporalité n'est jamais qu'évoqué sans être vraiment étudié. Dans nos travaux, le changement est réalisé à différents moments dans le développement du biofilm. L'hypothèse est qu'un biofilm possédant des microcolonies jeunes et en cours de maturation ne réagira pas de la même manière qu'un biofilm plus mature. De plus, la modification est définitive. Dans la littérature, des tests d'érosion (Derlon et al., 2008; Paul et al., 2012) suivant la croissance ou des augmentations très brèves de cisaillement sont opérés (Telgmann et al., 2004). L'enjeu du travail présenté ici

est de soumettre le biofilm à un changement permanent et définitif de son environnement et de suivre l'évolution de ses structures morphologique et microbiologique.

Pour réaliser ces travaux, deux colonnes à bulles sont utilisées, chacune présentant une condition hydrodynamique donnée. A différents moments dans le développement du biofilm, les supports de colonisation sont intervertis d'une colonne à bulles à l'autre, assurant ainsi le changement dans les conditions environnementales s'appliquant aux biofilms. Nous avons opté pour une caractérisation macroscopique du biofilm. En effet, les étapes de développement et de maturation du biofilm sont ici scrutées, et les structures ont donc des dimensions caractéristiques de l'ordre de la centaine de micromètres voire plus. La stéréomicroscopie couplée à une analyse d'image multi-échelle permet un suivi de la morphologie du biofilm, âgé de quelques jours à quelques semaines. L'analyse d'image réalisée consiste à s'intéresser à la distribution des niveaux de gris et s'effectue concomitamment pour différentes échelles (de quelques micromètres à plus d'un millimètre). En parallèle, une caractérisation par empreintes moléculaires autorise le suivi microbiologique de la flore microbienne du biofilm au cours du temps.

III.2.2 Memory effect in mature biofilms: growth history and conservation of morphology and community structure

D'après l'article en cours de soumission.

T. SAUR, R. ESCUDIÉ, G.SANTA-CATALINA, N. BERNET, K.MILFERSTEDT*
INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-
11100 Narbonne, France

* Corresponding author: kim.milferstedt@supagro.inra.fr

III.2.2.1 Abstract

Growth history is an important parameter for biofilm morphology and microbial community structure. To better understand the impact of growth history, biofilms were exposed to a change in hydrodynamic conditions at different growth stages and we observed how the change affected morphology and bacterial community structure. Biofilms were developed in two bubble column reactors, one operated under constant shear and one under variable shear. Biofilms were transferred from one reactor to the other at days 6, 13 and 33 by withdrawing and inserting the carrier material (polyethylene coupons). The developments of morphology and microbial community structure were followed. Biofilms grown under the two different hydrodynamic conditions developed unique morphologies and biofilm community structures. When transferred early on in biofilm development (days 6 and 13), biofilms adapted to the new hydrodynamic conditions and adopted features of the biofilm in the receiving reactor. Biofilms transferred at a late state of biofilm development (day 33) continued their initial trajectories of morphology and community development even in a new environment. These biofilm did not adapt to their new environment and kept features acquired during their early growth phase: this property was called memory effect.

Keywords: Biofilm, growth history, memory effect, morphology, microbial community structure, hydrodynamic

Highlights

- A memory effect was observed for morphology and microbial community structure.
- A hydrodynamic change after 33 days of growth did not affect mature biofilm structures.
- Non mature-biofilms submitted to a hydrodynamic change adapted their structures.
- Memory effect acquisition might go along with differentiation of biofilm over time.

III.2.2.2 **Introduction**

Understanding the development of biofilm is of great interest for industrial processes. On the one hand, biofilms can be seen as an unwanted contamination that has to be prevented for example in food industry or drinking water technologies (Lelièvre et al., 2002; Mangalappalli-Illathu et al., 2008; Revetta et al., 2013). On the other hand, they can be seen as a useful microbiological tool for depollution and wastewater treatment (Elenter et al., 2007; Lazarova and Manem, 1995; Nicolella et al., 2000). But in addition to detecting the mere presence of biofilms, knowledge about the temporal and spatial development of biofilm structure may yield important information when preventing detrimental biofilms or optimizing the performance of biofilm-based processes.

As discussed in Battin et al. (2007), biofilms can be compared to a landscape whose shape and community structure are given in response to multiple physical and biological factors. The interest of understanding the mechanisms involved in structuring biofilms is highlighted by the large body of literature available for both morphology (Garny et al., 2008; Paul et al., 2012; van Loosdrecht et al., 2002) and microbial community structure (Elenter et al., 2007; Nadell et al., 2009; Rochex et al., 2008). Growth history is known to play an important role in further development and structuration of biofilm (Elenter et al., 2007; Laspidou and Rittmann, 2004; Ohashi et al., 1995; Stoodley et al., 1999; Telgmann et al., 2004). It was demonstrated biofilms with different growth histories did not develop the same biofilm structures when exposed to identical operating conditions. Thus past events such as detachment (Lewandowski et al., 2004; Telgmann et al., 2004), shear applied during growth (Laspidou and Rittmann, 2004; Stoodley et al., 1999) or the already acquired community dynamics (Elenter et al., 2007; Ohashi et al., 1995) have a predominant role on the future development of biofilm structures. Telgmann et al. (2004) compared biofilms subjected to conditions favoring detachment. They demonstrated that biofilm structures, days after the detachment event, did not adapt to acquire the same structure as the control biofilm, where detachment was not favored. This highlights once more the impact of biofilm history and memorized structures for its own further structuring process.

It is assumed that the change in the structure triggered a change in local hydrodynamic parameters, affecting biofilm development. Indeed, structures acquired during development have an impact on the different factors shaping the biofilm like mass transport, substrate

access or detachment probability (Picioreanu et al., 2000). A detachment event for example can modify local shear and flow regime, impacting the structures to be of the biofilm. Thus there is a link between hydrodynamic and growth history impacts. Knowledge concerning effect of hydrodynamic conditions on biofilm can hence be valuable to explain growth history impact on biofilm structuring.

The hydrodynamic conditions in a reactor are key in structuring biofilms (Liu and Tay, 2002; Stewart, 2012). This parameter directly affects the ratio transport of substrate to microbial growth which is critical in biofilm structure acquisition. This ratio helps explain the appearance of finger-like to homogeneous structures (van Loosdrecht et al., 2002). Detachment, erosion and sloughing events are also function of hydrodynamic parameters (Garny et al., 2008; Picioreanu et al., 2000). Turbulent flow is known to trigger notable architectural phenomenon such as filamentous growth and streamers formation (Besemer et al., 2009a). This also impacts microbial community as populations in streamers are different from populations in basal biofilm layer. Rochex et al. (2008) demonstrated that high stresses decreased biofilm community diversity and might slow down biofilm maturation.

In the present work, hydrodynamics was used as a way to obtain different biofilm structures. The aim is to investigate growth history through comparison of these structures and their developments. The wide knowledge concerning impact of hydrodynamics on biofilms may be used to better understand growth history influence on biofilm development. Two bubble column reactors with different hydrodynamic conditions were used to obtain distinct biofilm structures. At different stages in their development, biofilms were subjected to a permanent change in hydrodynamic conditions. Both morphology and microbial community structure were then characterized over time to investigate impact of growth history on further development of these biofilms.

III.2.2.3 ***Materials and methods***

III.2.2.3.1 ***Reactor setups***

Two experimental runs of the experiment were conducted, and for each run, two reactors were operated in parallel. The experimental set-up is described in Milferstedt et al. (2013). Briefly, each bubble column reactor consisted of a 1.5 m high polycarbonate column with a volume of approximately 5 liters. Laboratory air was injected at a flow rate of 1 L.min⁻¹

through pores in a neoprene membrane at the bottom of the reactor. This air flow rate ensured oxygen saturation in the liquid phase, good mixing and homogeneous hydrodynamic constraints on the reactor wall. The reactors were submerged in a water bath to maintain a constant temperature of 25°C.

In each reactor, biofilm developed on exposed surfaces on the inside of the reactor. A part of the interior surfaces was lined with up to eight stainless steel rings onto which polyethylene coupons with a surface of 5cm² each were glued. Biofilm developed also on these coupons. The stainless steel rings with the coupons can be transferred from one reactor to another. Each ring initially harbored 19 coupons. Slides were made of two separable layers (ibidi GmbH Integrated BioDiagnostics, Martinsried, Germany). One side was used for biofilm growth while the other side was used to glue the slide on the ring. This design allowed the removal of the protective glued layer and the conservation of a clean biofilm-colonized slide.

A hydrodynamically perturbed reactor was carried out by an 8-fold increase of the base air flow of 1L.min⁻¹ for 12 minutes every 60 minutes. These more extreme conditions compared to the control reactor with constant shear (air flow rate of 1L.min⁻¹) were chosen to obtain the development of different biofilm structures between the control and perturbed reactors. Generation of these perturbations is described in more detail by Saur et al. (2014).

III.2.2.3.2 **Reactor operation**

III.2.2.3.2.1 *Continuous operation*

In both experiments, a fresh aerobic activated sludge inoculum collected from the Armissan wastewater treatment plant was used. A volume of 250 ml of inoculum was used in a nutrient solution with the same composition as the continuous mode but with concentrations six times higher. After an initial batch phase of 24 hours, reactors were run in continuous mode as presented in Figure III-11a. They were continuously fed with a sterile feeding solution made of equivalent amounts of yeast extract, meat extract, peptones and then oligo-elements were added. The solution containing yeast and meat extracts and peptones was first autoclaved. Then a sterile 0.2 µm filtered oligo-elements solution was added in sterile conditions. The solution was kept sterile during the continuous mode by using a 0.2µm filter. At the reactor inlet, this concentrated substrate solution was diluted with tap water to obtain a final inlet concentration of 27 mgCOD.L⁻¹. The dilution water was first softened with an ion-

exchanger to avoid calcium carbonate precipitations. Dilution water was then preheated at 25°C in a tank shared by both reactors. A hydraulic retention time of 65 min was maintained in reactors to wash out planktonic biomass and favor biofilm growth. To prevent formation of flocs and development of suspended biomass, an aspiration system at the top of the column was placed. Both reactors were supplied in air by Laboport N 86 KN.18 (KNF, Village-Neuf, France). Air flow meters plugged in the system allowed adapting air flow rates.

Many parameters were checked twice a week to ensure a good reactor functioning. The dissolved oxygen concentration was stable over time for all conditions and close to saturation value of $7.7 \text{ mg}[\text{O}_2] \cdot \text{L}^{-1}$. pH was ranged from 7.6 to 8.2, and pH values in the reactor with hydrodynamic perturbations were always 0.2 unit higher than in the other reactor. This is explained by carbon dioxide stripping due to high air flow rate in the water column. Air flow rates were also checked – and adjusted if necessary – weekly. Quantity of attached biomass on slides was also assessed. A linear correlation presented on Figure III-17 (Supplementary materials) was determined between the gray level of recorded biofilm images and dry matter allowing biomass estimation for every picture recorded.

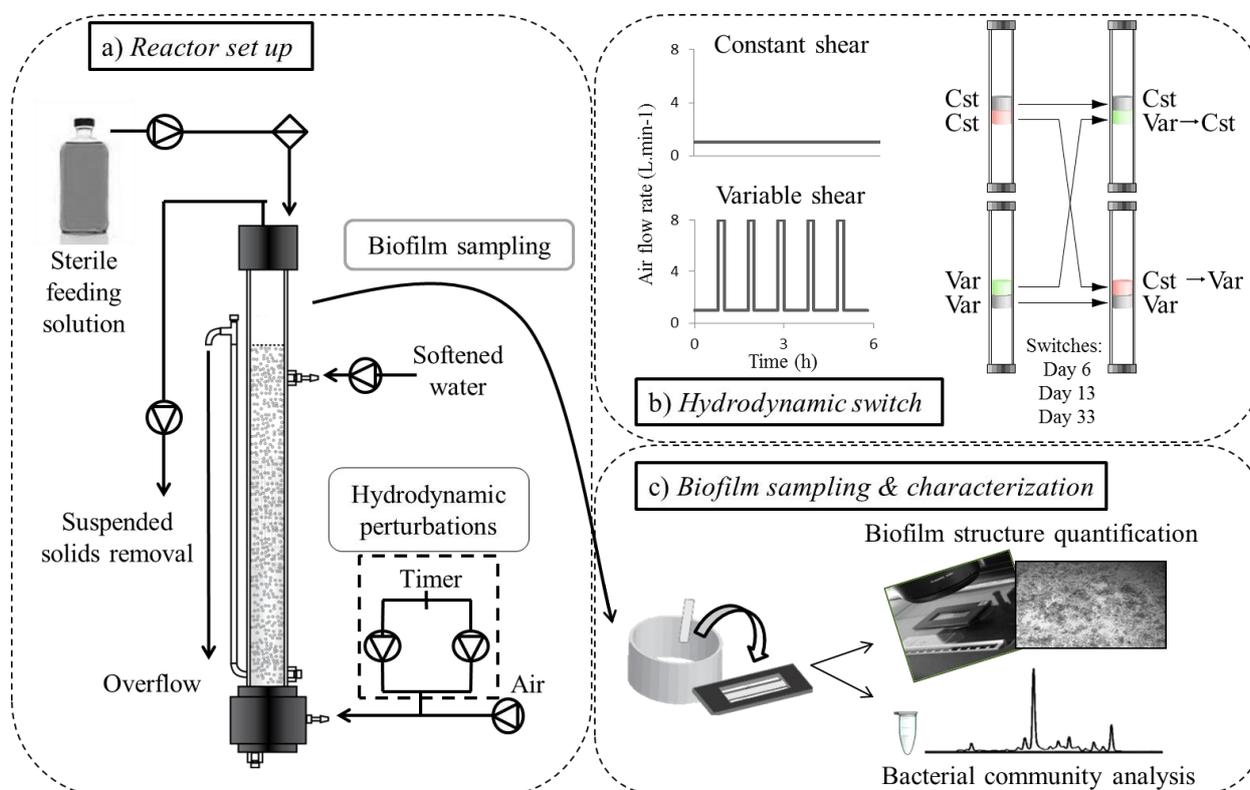


Figure III-11 : Experimental setup and operation. (a) Operation of reactors in continuous mode. The dotted frame corresponds to hydrodynamic perturbations generation

system, only present on one reactor. (b) Hydrodynamic conditions, switch strategy and naming scheme. Rings were changed from one reactor to another at different times of the biofilm development. (c) Description of sampling and biofilm characterization. Rings were temporarily removed from the reactor and biofilm were analyzed for morphology and microbial community structure.

III.2.2.3.2.2 Ring operation: switch strategy and sampling method

Two runs were carried out. For each run, two reactors were followed: one with constant hydrodynamic condition and one reactor with variable hydrodynamic condition. In the second reactor, hydrodynamic perturbations were generated as described previously. Switches from one reactor to another were performed in both experiments (Figure. III-11b). These switches simply consisted of the removal of one ring from a reactor – whatever the hydrodynamic conditions – to be placed in the other reactor. The first experiment, named Short Time experiment, was operated with switches performed on non-mature biofilms so at short time of development – 6 and 13 days. Switch of the second experiment, named Long Time experiment, was operated on mature biofilms so with a longer time of biofilm development – 33 days. The first experiment lasted 21 days and had to stop for technical reasons. Two switches were performed, one at day 6 and one at day 13, switch 1 and 2 respectively. In the second experiment, 47 days were followed and one switch, switch 3, was performed at day 33. The experimental nomenclature is as follow: Initial reactor→Receiving reactor (Switch time). For example, the biofilm called Cst→Var (33) corresponds to the biofilm grown at first under constant shear and then placed in the variable shear reactor at the third switch (day 33).

The sampling methodology is summed up in Figure III-11c. The time interval between two samples ranged from 24 hours to 72 hours. Rings were removed for only a few minutes from the reactor. This short amount of time prevented biofilms to dry out. Desired slides were detached from rings with tweezers and rings were placed back in the reactor. The glue-fouled protective layer was removed from the slide leaving the second layer with one perfectly clean side and one biofilm-colonized side. Each slide was placed in an aluminum holder filled with 600 µl of particle-free reactor outlet. By doing so, biofilms were submerged and did not dry out during image acquisition. The bottom of the holder was a thin glass slide making it suitable for transmission microscopy. After imaging, slide were removed from holders and cut in two equal parts. Each half was placed in a 2 ml screw-cap vial and immediately stored at -20°C until DNA extraction. Usually, only one half was required for DNA extraction.

III.2.2.3.3 ***Morphological characterization***

III.2.2.3.3.1 *Image acquisition*

The acquisition procedure was similar to the one described by Saur et al. (2014). Briefly, images were acquired with a Leica stereomicroscope M205 FA (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), equipped with a 0.63× planapochromatic objective and a Peltier-cooled Leica DFC495 camera. Recorded images were 2176 x 1632 pixels corresponding to 6.4 x 4.8 mm². All pictures were saved in 8-bit tif format as grayscale images with the software Leica Application Suite (LAS) core V3.5.0 (October 2009). Illumination settings were calibrated and homogeneous for both experiments. To cover the whole biofilm area of the slide, fourteen images were required.

III.2.2.3.3.2 *Image processing*

Images were analyzed with Spatial Gray Level Dependence Method (SGLDM). This method uses directly the gray level information. It is not necessary to process images as black and white pictures, avoiding the approximation done for the usual binarization treatment. Binarization also triggers a loss of information as only two pixel values are possible. With SGLDM, the 256-value range is used as variation in the gray level is considered. A description of the approach is given by Milferstedt et al. (2008). To sum up, each pixel on the picture was compared with the pixel placed at a given combination of one angle and one distance from it. We used 48 angle-distance combinations (0°, 30°, 60°, 90°, 120°, 150° x 30, 75, 150, 300, 450, 600, 900, 1200 µm). Dependence matrices were built from these pixels comparisons and then 15 textural descriptors characterized the image structure (Haralick et al., 1973). Each image was described by 48 combinations x 15 descriptors so 720 variables. Each respective variable was averaged over the 14 images per slide so that each slide was described by a dataset of 720 mean descriptors. Data were then processed with the statistical software R 2.15. Principal Component Analyses (PCA) with the package ade4 were performed to compare and graphically represent datasets.

III.2.2.3.4 ***Microbiological characterization***

Biomass was recovered from slides by bead beating. DNA extractions were performed as described by Rochex et al. (2008). V3 regions of the 16S rRNA were amplified with the following mix: 36.9 µl molecular grade water, 5 µl of 10 × pfu turbo buffer, 4 µl of 2.5 mM dNTP mixture, 1.3 µl of forward primer (426 nM) (ACGGTCCAGACTCCTACGGG,

Escherichia coli position F331) and reverse primer (412 nM) (TTACCGCGGCTGCTGGCAC, *E. coli* position R533), 0.5 µl of 2.5 U/µl Stratagene PfuTurbo DNA Polymerase (Stratagene). Thermal amplification cycling was as described in Milferstedt 2013. PCR products were analyzed by Capillary Electrophoresis - Single Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) in an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) as described by Rochex et al. (2008). Thus a fingerprint of the community was obtained with number of species and their relative abundance.

Obtained community profiles were aligned based on the ROX internal size standards and normalized with the package Statfingerprints (Michelland et al., 2009) implemented in the software R 2.12 (R Development Core Team, 2010). Statistical analyses such as dissimilarity indices and analysis of variance were performed with the package vegan 2.0-0 and the functions `vegdist` and `anosim`, respectively, designed for community ecology studies (Oksanen et al., 2011).

III.2.2.4 **Results**

III.2.2.4.1 ***Biofilm structures depend on hydrodynamic conditions***

We hypothesize that a possible memory effect can be seen in a conservation of features (e.g. morphology and community structure) even when the biofilm is exposed to a modification of environmental conditions that would typically favor the development of another morphology and community structure. To demonstrate this, it is first necessary to generate two biofilms that can be differentiated from each other in morphology and community structure. We used two sets of hydrodynamic conditions to generate these biofilms starting from identical inocula. These biofilms can then be used as references to determine whether biofilms subjected to new hydrodynamic conditions will adapt to the new environmental conditions or in contrary will keep their initial features.

III.2.2.4.1.1 *Morphology*

To characterize biofilm morphology, image analysis based on acquired stereomicroscopic pictures was performed. Figure III-17 (Supplementary materials) shows the linear relationship between the attached dry matter and the gray level of the image. This highlights the consistency of using image analysis to obtain a morphological characterization of biofilm. A set of 720 structural descriptors obtained from gray level distribution analysis (SGLM) were

processed with Principal Component Analysis (PCA). Figure III-12 represents results of the PCA performed on data obtained from the four controls, i.e. two control conditions (constant or variable shear) per run (Short Time and Long Time experiments). The y-axis corresponds to the first Principal Component (PC1) which summed up 73.3% of the variability in the datasets. Data were widely scattered along PC1 highlighting the diversity of morphologies obtained (Figure III-12). It can be noticed that biofilms in the short and long experiments have developed different structures because different inocula were used (sampled from the same wastewater treatment plant but at a different time). For both experiments, the differentiation between biofilms grown under constant or variable shear occurred after 15 days. Before that, both hydrodynamic conditions generated similar structures. For short and long experiments, the difference between controls was maintained until reactors were stopped. This means that switches performed at days 6 and 13 in short experiment occurred when biofilm structures were still similar. In contrary, for the day-33 switch in long experiment, different morphologies were already acquired between the two controls. As a consequence, different morphologies were obtained over time between controls and can be used as references to characterize morphology of switched biofilms.

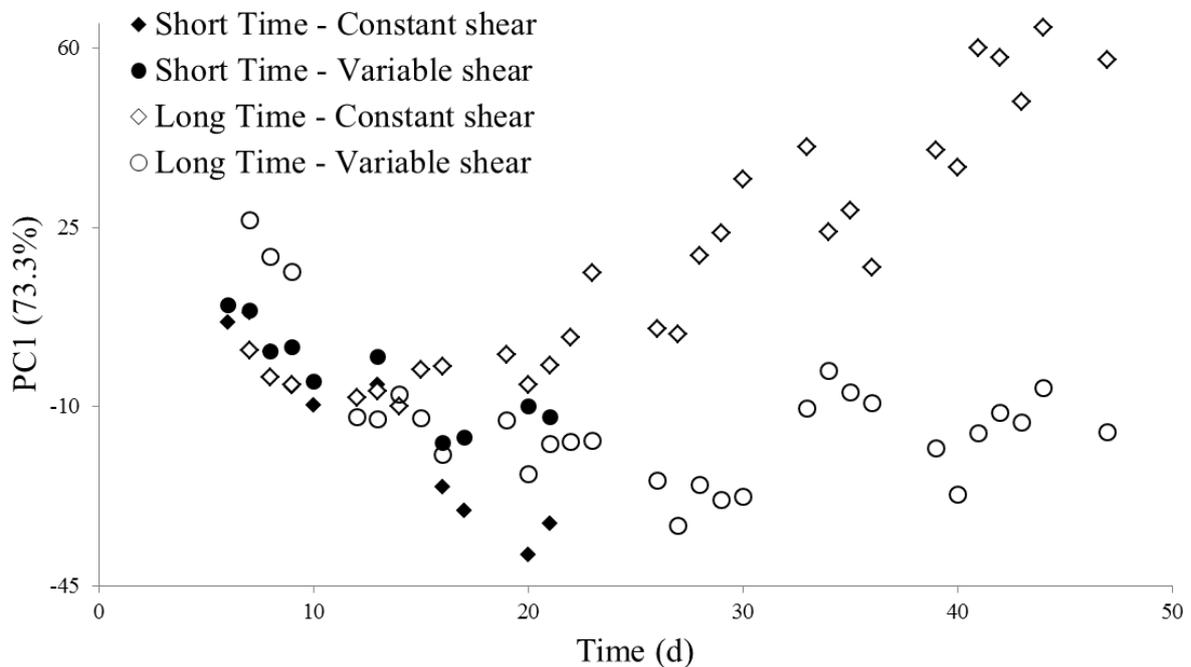


Figure III-12 : PC plot of both controls – constant and variable shear – for both Short Time and Long Time experiments. PCA was performed on all four datasets together.

Only the first Principal Component is represented versus experimental time.

III.2.2.4.1.2 *Community structures*

Analyses of variance were performed. Calculations were based on multiple pair-wise comparisons of SSCP profiles. Biofilms grown under constant or variable shear were compared for both runs and p-values are presented in Tableau III-4. The difference between microbial communities in the two hydrodynamic conditions became statistically significant after the week 3 (p-values <0.05) but the global trend showed a decrease over time. Indeed, it can be seen that differentiation was gradual as shown by the decrease of p-values over time, from 0.65 to 0.121 and from 0.168 to 0.007 for Short Time and Long Time experiments, respectively.

Week	1	2	3	4	5	6	7
Short Time	0.650	0.198	0.121	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Long Time	N.A.	0.168		0.004		0.007	

Tableau III-4 : Results, as p-values, of variance analysis of bacterial communities between the two controls – constant and variable shear

III.2.2.4.2 *Consequence of switch on biofilm structure*

III.2.2.4.2.1 *Morphology*

A PCA was performed on all switched and control biofilms using image analysis data. A representation of the PC1 with time is available in the Supplementary Materials (Figure III-18). In Figure III-13, we introduce the differences between biofilm morphology of switched biofilms and the respective reference biofilms that stayed in the initial or in the receiving reactors. To do so, coordinates resulting from the PCA were used to calculate a distance matrix of pair-wise comparisons between the different biofilms. Then distances were normalized by the distance between the controls at the same experimental time. By doing so, obtained normalized morphological distances can be compared over time and between the different switches. These distances profiles give the evolution of the switched biofilms morphologies toward either the initial or the receiving reactor biofilms morphologies. In other terms, Figure III-13 shows the evolution of morphologies of switched biofilms either by conservation of initial features or by acquisition of morphologies similar to ones of biofilms in the receiving reactor. Results highlighted here have also been compared to raw

stereomicroscopic pictures in order to check the consistency of the method and the interpretations.

The biggest differences between morphologies are observed between reference morphologies in receiving reactors and the morphologies of switched biofilms (Figure III-13c) when switching occurred late in the experiment. For 14 days, normalized distances between switched biofilms and biofilms from the receiving reactor – “Cst→Var vs Var” and “Var→Cst vs Cst” – were close to 1. At the same time, the differences between reference morphologies in the initial reactors and the switched biofilms – “Cst→Var vs Cst” and “Var→Cst vs Var” – stayed small. Switched biofilms kept their initial morphological features, and they did not adopt the morphology of biofilms grown in their receiving reactor.

For the first switch (Figure III-13a), comparisons of both switched biofilms with biofilms from the receiving reactor showed a progressive decrease of the distance over time down to approximately 0.3. In parallel, the differences between reference morphologies in the initial reactors and the switched biofilms were higher and stabilized around 1. As a consequence, differences between the switched biofilms and native biofilms from their receiving reactor strongly decreased while the distance with biofilms from their initial reactor was close to the distance between the two control biofilms. This highlights the change of switched biofilms to the biofilm characteristics of their receiving reactor. This behavior is similar for both hydrodynamic switches, from the variable to the constant shear and from the constant to the variable shear, both non-mature switched biofilms adopted similar development as biofilms from their receiving reactor.

For biofilms switched at day 13 (Figure III-13b), an intermediate behavior was observed. For the Var→Cst biofilm, it can be hypothesized that adaptation started. Distances between switched biofilms and biofilms from initial reactors increased. On the other hand, distances between switched biofilms and biofilms from the receiving reactors decreased although this was not as clear as for switch at day 6. Concerning Cst→Var biofilm, a different evolution was observed. Seven days after the switch, both distances – with biofilms from receiving and from initial reactors – were still at the same values as at the moment of the switch, respectively. No adaptation to the new hydrodynamic environment arose.

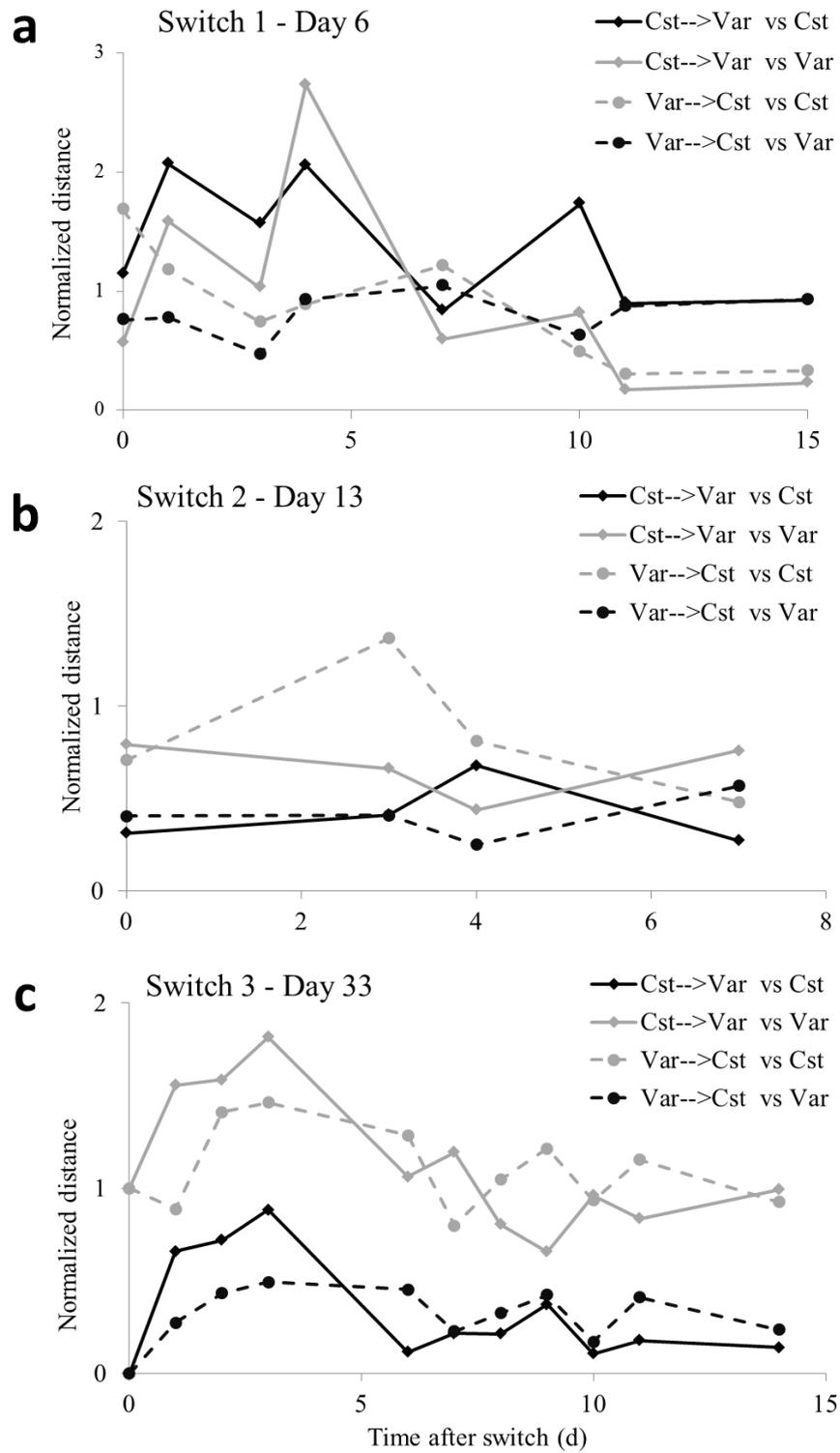


Figure III-13: Differences in morphology between switched biofilms and either the biofilm in the initial reactor or the receiving reactor. Differences are given by the morphological normalized distance between the two considered biofilms. Each graph corresponds to given switched biofilms. Naming scheme is as given on Figure III-11b.

Same data can be used differently to highlight another point: the impact of the moment of the switch on this morphological evolution (Figure III-14). Normalized distances of the six switched biofilms are plotted over time with respect to the reference biofilms in the initial reactors. By focusing the data on the comparison with biofilm stayed in the initial reactor, it highlights that the conservation of morphological traits depended on the biofilm age.

For both kinds of switch (Cst→Var and Var→Cst), a decrease in morphological distances between switched biofilms and biofilms of the initial reactors was noted from switch 1 to 3. For both biofilms switched at day 6, high normalized distance values were obtained, close to 1 or higher. We observed that even at the moment of the switch, values close to 1 were obtained. This was due to the very small differences between both control biofilms at that time as differentiation did not occur yet; small heterogeneities between biofilms were overestimated because of that. For mature biofilms of the third switch, lower values were obtained. So for a given switched biofilm, its distance with reference morphologies in its initial reactor was maintained at a low values if the switch was performed at day 33. No adaptation to the new hydrodynamic environment occurred for mature biofilms; morphologies were still similar to ones in the initial reactors. For sooner switches, an adaptation of non-mature biofilms to the new environment and acquisition of receiving reactor morphological features arose.

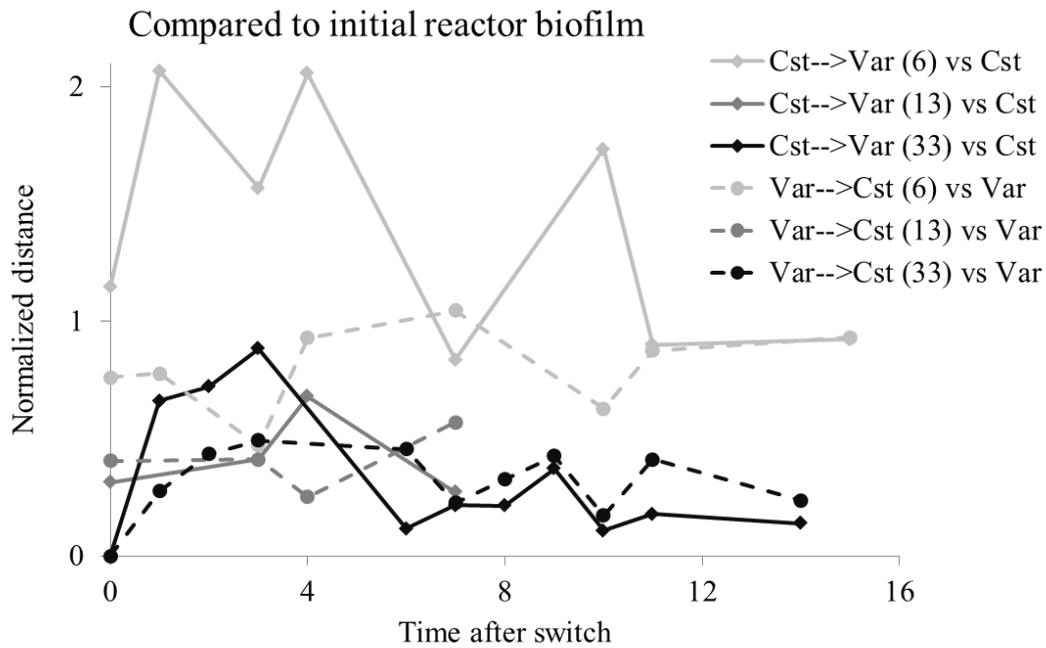


Figure III-14: Differences in morphology between switched biofilms and their respective initial reactor. Differences are given by the morphological normalized distance between the two considered biofilms. Naming scheme is as given on Figure III-11b.

III.2.2.4.2.2 Microbiological community structure

The same strategy of distances matrix analysis and pair-wise comparisons was used for microbiological structures characterization. Distances between CE-SSCP profiles were calculated and normalized for each date by the distance between both control biofilms. In Figure III-15, we present the normalized distance between microbial communities of switched and control biofilms. Similarly as with Figure III-13 and morphological characterization, Figure III-15 gives the development of bacterial communities after being switched, either toward conservation of initial traits or toward adaptation to their new environment. Results highlighted here have also been checked and confirmed by a direct observation to SSCP profiles.

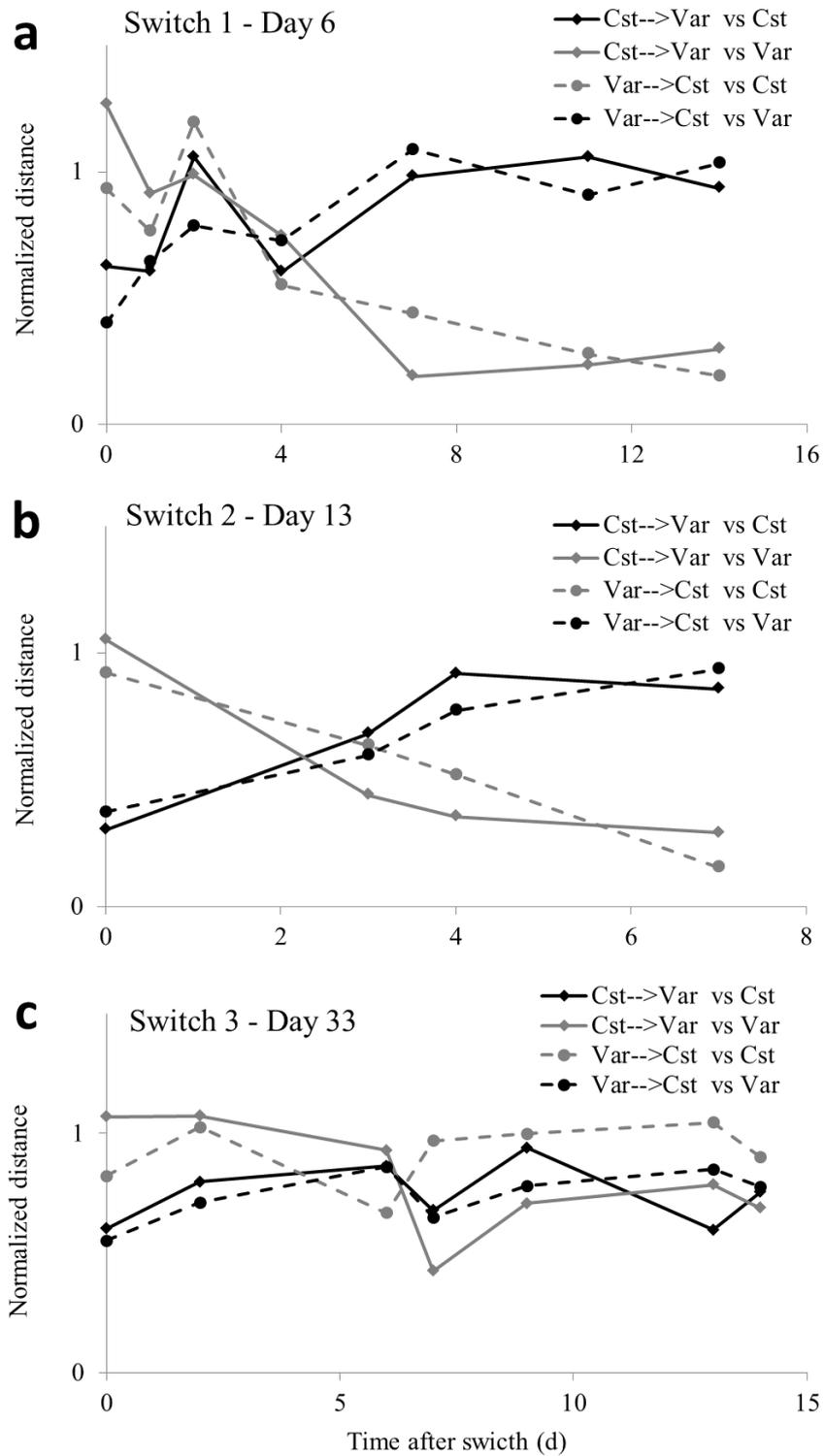


Figure III-15 : Differences in bacterial community between switched biofilms and either the biofilm in the initial reactor or the receiving reactor. Differences are given by the microbiological normalized distance between the two considered biofilms. Each graph corresponds to given switched biofilms. Naming scheme is as given on Figure.III-11b.

For switches 1 and 2 (Figure III-15 a and b), an adaption of the microbial community structure of switched biofilms was observed. Indeed, normalized differences between switched biofilms and reference bacterial community in their initial reactor increased and reached. In the same time, microbiological distances with biofilms from receiving reactors decreased and reached values of approximately 0.3. Switched biofilms thus adopted development of biofilms from their receiving reactor and acquired the same microbiological community structures.

However, for switch 3 at day 33 (Figure III-15c), a different behavior was observed. If for previous switches a clear development was identified, here communities did not change their dynamics. Distances between switched biofilms and biofilms from the initial reactors slightly increased from 0.55 to 0.77. In the same time, distances with biofilms from the receiving reactors were either slightly decreasing – for Cst→Var biofilms – or stable – for Var→Cst biofilms. The microbiological adaptation of mature biofilms to new hydrodynamic conditions either occurred at very low rate compared to non-mature biofilms or did not occur.

This is confirmed by Figure III-16 where distances between switched biofilms and reference bacterial communities in the initial reactors are represented for each of the six switched biofilms. For the first two switches, clear and rapid adaptations to their receiving reactor were identified. Six days after the switch, normalized distances with their initial reactor were included between 0.86 and 1.09, so very similar to distances between both control biofilms. Nevertheless, biofilms switched at day 33 presented less difference with their initial reactor even at 14 days after the switch. A partial conservation of initial microbiological features was identified and the adaptation was not complete as it was for sooner switches.

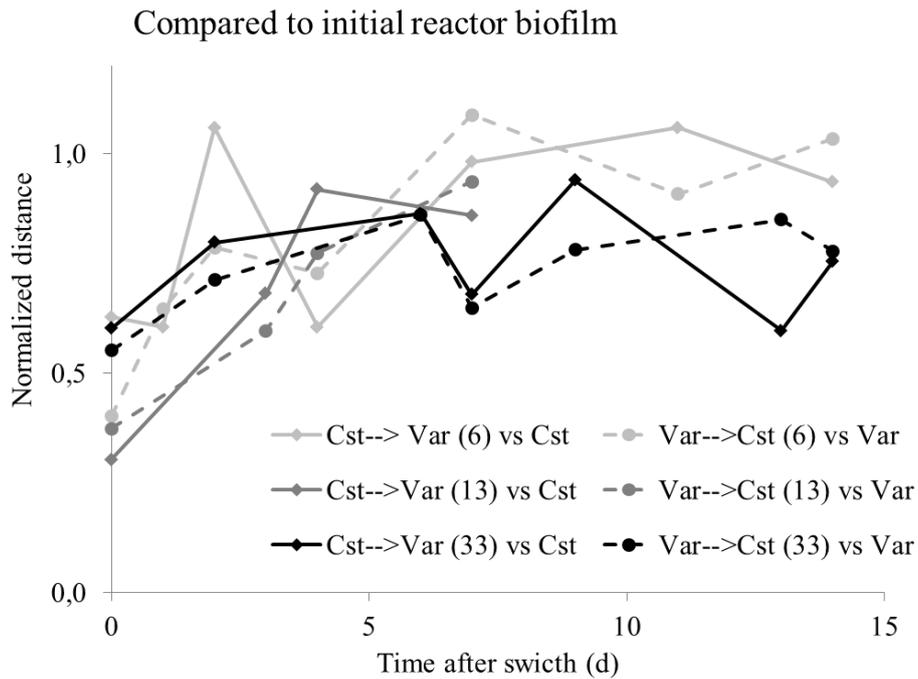


Figure III-16 : Differences in bacterial community between switched biofilms and their respective initial reactor. Differences are given by the microbiological normalized distance between the two considered biofilms. Naming scheme is as given on Figure.III-11b.

III.2.2.5 Discussion

The objective of the present work was to investigate whether the biofilm history (i.e. its age at the moment of a hydrodynamic change was operated) had a role on its further development. We tested whether bacterial biofilms conserve traits (e.g. morphology or community structure) even though newly induced environmental conditions would favor the development of another morphology or community structure. We investigated how long a biofilm needs to develop in order to acquire traits that are memorized when conditions are changed. Thus change in biofilm environment – here hydrodynamic conditions – were triggered at different moments of the biofilm development. Molecular fingerprinting as well as image analysis of biofilms allowed us to describe modifications of both microbial community structure and morphology.

Data presented here identified either adaptation or the lack of adaptation to the new hydrodynamic environment depending on the age of the biofilm at the moment the hydrodynamic change took place. We called this lack of adaptation “memory effect”. More precisely, we defined the memory effect as the conservation of morphological and

microbiological native features of biofilms after changing environmental (here hydrodynamic) conditions. Figure III-19 (Supplementary materials). represents theoretical evolutions of biofilms acquiring a memory effect. Comparing Figures III-13 and 16 to these theoretical developments, a morphological memory effect can be identified. Biofilms switched at day 6 adapted to new environmental conditions, while mature biofilms of the third switch kept the structure of biofilms grown in their native reactor. The microbial community structure shows a memory effect after day 33 but the overall development decoupled from the morphological development. It is seen on Figure III-16 that kinetics of adaptation to the new environment was impacted by the date of the switch. Slopes of the curves corresponding to biofilms switched at day 6 were higher than ones of biofilms switched at day 33. Memory effect might be starting but complete memory was not yet acquired.

Both morphology and microbial community structure are the results of different processes occurring in the biofilm. These processes are impacted by hydrodynamic conditions but it seems that once biofilms were mature and acquired reactor-dependent structures, memory effect allowed these structures to be conserved. Although quite poorly reviewed, growth history has already been reported as an important factor for biofilm structuration (Elenter et al., 2007; Lapidou and Rittmann, 2004; Ohashi et al., 1995; Stoodley et al., 1999; Telgmann et al., 2004). For instance, mechanical studies performed by Stoodley et al. (1999) identified the impact of shear applied during biofilm growth. Deformation behavior of biofilms changed whether the applied shear was below or higher than the shear applied during growth. In addition, Telgmann et al. (2004) investigated biofilm morphology and sloughing events. Results showed the importance of previous detachment events on acquisition and evolution of future morphologies. Growth history has also been investigated for microbial communities. Ohashi et al. (1995) studied nitrification in a biofilm reactor and demonstrated the influence of growth history on nitrogen removal and associated bacterial populations. A memory effect of mature biofilms could constitute one more clue highlighting the important role of growth history.

However, it remains unclear when and how the acquisition of this effect occurs. In the present case, morphological data suggest that at least 13 days were necessary to develop properties that were memorized when the biofilm was exposed to changed conditions. But this time was not sufficient to completely acquire it. 33 days were enough for acquisition and the conservation of memory over at least two weeks. It is interesting to note that the

differentiation between the two control biofilms happened around 15 days (Figure III-18). Both phenomena – the acquisition of memory effect and differentiated structures acquisition – might be linked. Many studies identified this order of time scale as a characteristic time for morphology and microbial community structure development (Besemer et al., 2007; Garny et al., 2009; Lewandowski et al., 2004; Telgmann et al., 2004). Lewandowski et al. (2004) showed that biofilms placed in two reactors operated in the same way had similar morphologies before the first sloughing event – after around 20 days. Then different structures arose guided by cycles of growth – sloughing – regrowth. This also corroborates results of Telgmann et al. (2004) presented above on the impact of sloughing event and growth history on biofilm structure. Besemer et al. (2007) also demonstrated a community differentiation in stream biofilms after 15 days. It is also proposed that a shift from physical flow-driven to a coupled biophysical control of communities appeared. Thus this morphological and microbiological differentiation might also be the starting point of the memory effect acquisition.

A memory effect seems counter intuitive as we expect biofilms to adapt to its new environment (Cresson et al., 2008). But as said previously, the question of the degree of maturation – before, during or after differentiation of biofilm structures – when the exposure to the new environment is performed has never been treated. Besides, some studies demonstrated the impact of a change in the structure or an already acquired structure on the further structuration process. For instance, van Loosdrecht et al. (2002) demonstrated the impact of hydrodynamic conditions on biofilm development via their role in the substrate availability. But it is also mentioned that biofilm structure has an impact on local shear force and liquid flow. After a detachment event or due to biofilm growth, local hydrodynamic conditions can be altered. Then, following this change of local flow parameters, many structuring factors can be altered such as detachment force or substrate access (Picioreanu et al., 2000). These mechanisms point towards the impact of memorized structure on further development and thus represent an interesting lead for explaining the observed memory effect.

In addition, some other parameters directly involved in morphology and bacterial community structuring might have long term effects explaining memory acquisition. For instance extracellular polymeric substances (EPS) and cohesiveness of biofilms may be involved. The role of hydrodynamics on EPS composition is widely investigated in the

literature (Garny et al., 2008; Liu and Tay, 2002; Mangalappalli-Illathu et al., 2008; Ras et al., 2013; Simões et al., 2008). It is known that different compositions such as polysaccharides – proteins ratio, hydrophobic EPS content, inert material content can be obtained in function of shear stress applied during growth. Stoodley et al. (1999) postulated that EPS properties might be responsible for compliance of biofilms, their ability to deform and return to their initial state and their viscoelastic behaviors. It is also assumed that, in some cases, biofilms were able to repair themselves after deformation. It is likely that EPS matrix, influenced and shaped by hydrodynamics, gives the biofilm its differentiated and memorized structure. Then deformation properties could also confer biofilms the ability to resist a longer hydrodynamic change and then conserve memorized morphological traits.

EPS composition as well as bacterial community structures have also been found to change as function of biofilm stratification (Ras et al., 2013). A basal layer of biofilm was more cohesive and able to resist high shear stress during erosion test (Derlon et al., 2008; Paul et al., 2012). This is known as biofilm stratification. EPS production and associated bacteria are responsible for EPS content and composition that bestow biofilm its ability to deform and its resistance to mechanical strength. It is likely that same mechanisms are involved in memory effect.

It is usually admitted that architectural and microbiological structures are directly correlated. For instance, Besemer et al. (2009) demonstrated that different communities were found in biofilm basal layer and in streamers. But our data suggested a decoupling between morphology and microbial community structure. A complete memory effect was not established for community structure while it was observed for biofilm morphology. Our results go along with Milferstedt et al. (2013) who demonstrated that correlation between morphology and community was not systematic, especially for variable reactor operations. This decoupling can be explained by the different characteristic times of mechanisms driving both structures. For instance, sloughing and detachment events are sudden, unpredictable and change immediately the morphology whereas regrowth characteristic times are in the order of hours or days (Elenter et al., 2007).

III.2.2.6 Conclusion

The present work highlights the impact of growth history on both morphology and microbial community structure of biofilms. Biofilms were grown in two reactors under

different hydrodynamic conditions. After a given time of development in a first reactor, biofilms were moved to the second reactor and their further development was observed. Following conclusions can be drawn:

- The initially acquired biofilm morphology and community structure did not converge towards the morphology and community structure in the receiving reactor. A non-adaptation behavior was identified in mature biofilms subjected to a hydrodynamic change. A conservation of native morphology and microbial community structure was highlighted. We defined this mechanism as a memory effect.
- If the hydrodynamic change was performed early in biofilm formation – before both control structures were different from each other – a long term memory effect was not observed and the newly exposed biofilms cannot be differentiated from biofilms always grown in the new conditions. The characteristic time for the acquisition of a memory effect is likely to be on the same order as characteristic times for the acquisition of hydrodynamic-dependent mature structures, in the present case approximately 15 days.
- The development of biofilm morphology was decoupled from the microbiological community structure, despite similar trends. This can be explained by the different mechanisms sculpting both structures, their respective characteristic times and their way of actions on both structures.

Mastering the memory effect of biofilm morphology and community structure presents a remarkable opportunity in biofilm engineering. Biofilms could for example be imprinted with a desired morphology and community structure before transferring them to industrial processes. But yet many challenging questions remain such as how long it takes to acquire a memorized structure, how long the structure will be conserved and how drastic the change not to break the memory effect.

III.2.2.7 *Supplementary materials*

Figure III.17:

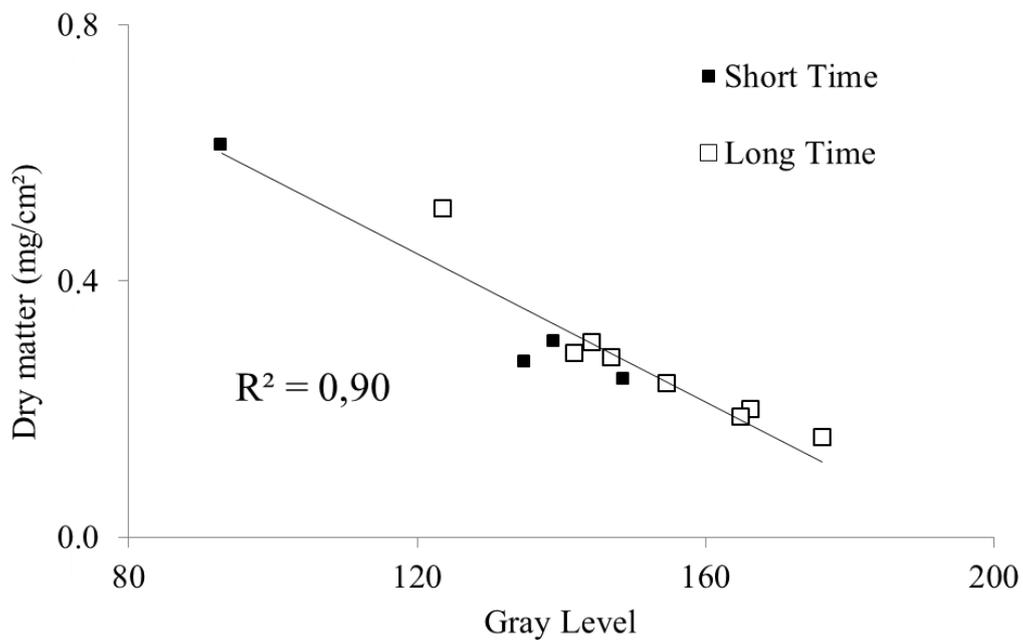


Figure III-17 : Linear correlation between gray level obtained on acquired images and dry matter harvested on slides. R^2 is calculated from both Short and Long Time experiments.

After biofilm image acquisition, biofilms were scrapped and placed at 105°C for 24 hours and then weighted. A correlation between the mean gray level of the picture and the weighted mass is then possible. Thanks to this relationship, an estimation of the dry matter weight was obtained for every samples observed on microscopy. Besides, this demonstrates a strong link between morphologies of biofilms and the corresponding pictures and legitimates the use of image analysis for biofilms morphological characterization.

Figure III.18:

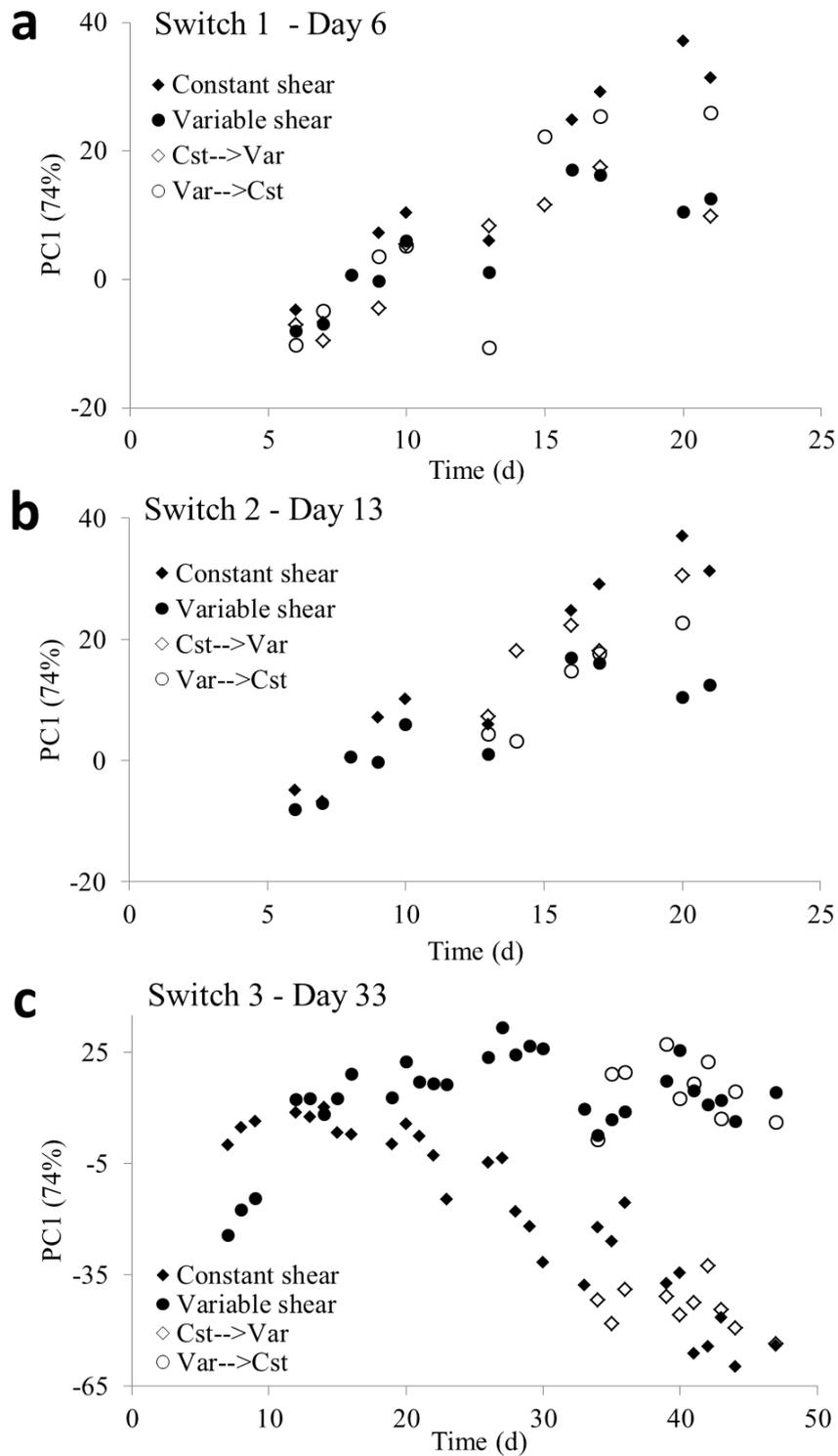


Figure III-18 : PC plots of controls – constant and variable shear – and switched biofilms. PCA was performed on all datasets, only the displayed points change from one panel to another. Only the first Principal Component is represented versus experimental time. (a) Switch 1 – day 6. (b) Switch 2 – day 13. (c) Switch 3 – day 33.

Same conclusions as in the text can be drawn from the PCA. For young early biofilms (Figure III-18a), a gradual morphological adaptation arose. In contrary, for mature biofilms (Figure III-18c), it appeared that morphologies of switched biofilms did not evolve after the switch and stayed steady. Their morphologies were still very similar to reference morphologies in their initial reactor. A conservation of memorized morphologies was highlighted. For a switch at day 13 (Figure III-18b), an intermediate situation occurred. For one switched biofilm (Cst→Var), a conservation of morphologies seemed to be acquired. But for the second switched biofilm (Var→Cst), seven days after the switch the morphology was intermediate between morphologies of both control biofilms.

Figure III.19:

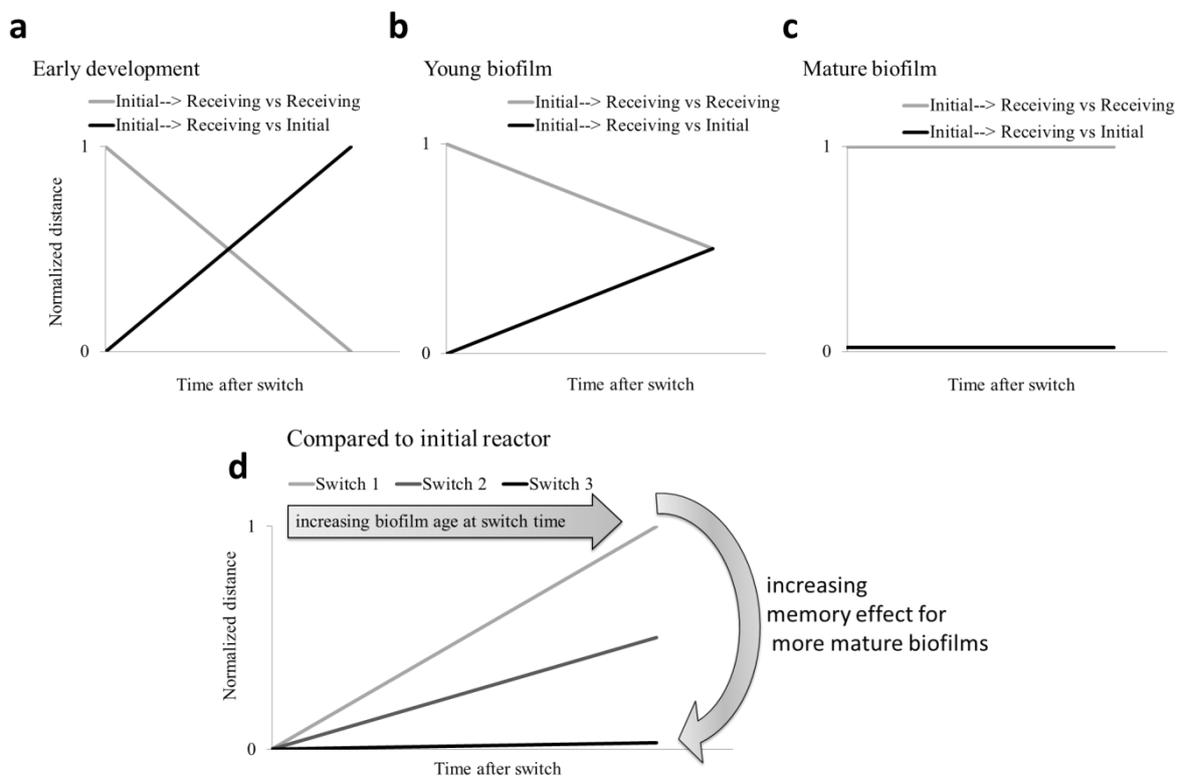


Figure III-19 : Theoretical behaviors of biofilms acquiring memory effect depending on the age of the biofilm at moment of the switch. a = Early biofilm, b = Young biofilm, c = mature biofilm. Panel d highlights the increasing memory effect with the increasing age of the biofilm when the switch is performed.

For a switch performed on early biofilms (Figure III-19a), a more or less gradual evolution toward reference traits in the receiving reactors is expected. An adaptation to new

environmental conditions occurs. For later switch (Figure III-19c), memorized structure do not adapt to the new conditions. Normalized distances between switched biofilms and biofilms in the initial reactor are kept small after the switch event. So an improvement in the memory effect acquisition is noticed for later switches (Figure III-19d). Distances between switched biofilms and reference traits in the initial reactor decrease with an increasing age of biofilm at the moment the switch is performed.

III.2.3 Discussion

L'objectif de ces travaux consiste à mieux comprendre le comportement du biofilm lorsque celui-ci est soumis à un changement de conditions environnementales. L'originalité réside essentiellement dans le fait de soumettre le biofilm au dit changement à différents moments dans son développement. En effet, l'hypothèse de départ stipulait qu'un biofilm jeune – ici six jours – ne réagira pas systématiquement de la même façon qu'un biofilm dont les structures matures sont d'ores et déjà acquises.

Ces travaux démontrent le bien-fondé de cette hypothèse. Ils mettent en effet en évidence une conservation des structures morphologique et microbiologique natives d'un biofilm mature, cette propriété étant appelée ici effet mémoire. Au contraire, un biofilm trop jeune, dont les structures ne sont pas encore différenciées, s'adapte à son nouvel environnement et adopte les structures associées. Cette dernière affirmation est d'ailleurs retrouvée dans la littérature (Casey, 2007; Laspidou and Rittmann, 2004). Par conséquent, il existe donc bien un impact de l'histoire et de l'âge du biofilm sur sa propre structuration. Quelques travaux ont permis de mettre en exergue l'importance des conditions de croissance sur la suite de développement, aussi bien d'un point de vue morphologique (Stoodley et al., 1999; Telgmann et al., 2004) que microbiologique (Elenter et al., 2007; Ohashi et al., 1995). Mais ici, un élément nouveau est apporté en mettant au centre de l'investigation l'âge du biofilm. La démarche, consistant à maintenir le biofilm dans son nouvel environnement hydrodynamique et à suivre l'évolution de ces structures, a permis de mettre en évidence ces phénomènes de mémoire des structures.

Néanmoins il est légitime de se questionner sur le rôle spécifique de l'hydrodynamique dans la mise en place de l'effet mémoire. En effet, nous expliquons ici l'acquisition de l'effet mémoire par des mécanismes liés à l'hydrodynamique. Il a été démontré que l'hydrodynamique bénéficie d'une place tout à fait singulière dans les phénomènes de structuration du biofilm (Liu and Tay, 2002; Rochex et al., 2008; van Loosdrecht et al., 2002). De plus, dans nos travaux, c'est ce paramètre qui permet de discriminer les deux conditions environnementales, avant et après la modification. Il est donc cohérent de penser que l'effet mémoire observé est corrélé aux effets de l'hydrodynamique sur la structuration du biofilm. Mais il est intéressant de se demander si un effet mémoire aurait également été observé si une

modification d'une autre nature avait été opérée. Répondre à cette question permettrait de mieux comprendre l'origine de l'effet mémoire.

Maîtriser un tel outil ouvre des opportunités intéressantes dans le domaine des biotechnologies de l'environnement. La possibilité de laisser une empreinte sur le biofilm, de le sculpter à façon et de conserver ces structures acquises pourrait s'avérer très utile. Il serait possible de faire croître des biofilms répondant à un objectif donné (traitement préférentiel d'une pollution donnée, morphologie permettant une sédimentation rapide...) dont la morphologie et la communauté sont standardisées et stables pour un certain temps. Cependant, là encore des questions abondent, notamment en ce qui concerne l'amplitude de la modification à laquelle le biofilm sera soumise.

Nous avons identifié ici la robustesse des biofilms matures face à un changement de nature hydrodynamique des conditions environnementales. Cependant les biofilms matures restent des systèmes biologiques dynamiques en interaction avec leur milieu. Ils sont la résultante d'une accumulation et d'une perte concomitantes de biomasse (Characklis and Marshall, 1990). Leur dynamique interne peut en effet se résumer par la succession de cycles croissance-détachement-recroissance (Lewandowski et al., 2007). Un des paramètres clés pouvant expliquer, entretenir et/ou perturber cette dynamique des biofilms matures est l'intensité des phénomènes de prédation.

III.3 Quantification des prédateurs mobiles dans les biofilms matures

III.3.1 Avant-propos

Les phénomènes de prédation font partie intégrante de la vie et de la dynamique du biofilm. Ils représentent un facteur structurant important et sculptent le biofilm. Que cela soit directement par leur activité de prédation ou par le biais de leurs déplacements au sein de la matrice du biofilm, ces organismes peuvent accroître la porosité du biofilm, créer un réseau de canaux de circulation et influencer le nombre et la taille des microcolonies (Böhme et al., 2009; Derlon et al., 2012; Paris et al., 2007).

Le nombre de prédateurs va directement influencer et être influencé par la structure du biofilm. Ils viennent donc compléter avec un niveau d'intrication supplémentaire les processus de structuration des biofilms. La Figure I-25 peut être réaménagée pour mieux expliciter l'objectif et l'enjeu de cette partie du projet (Figure III-20).

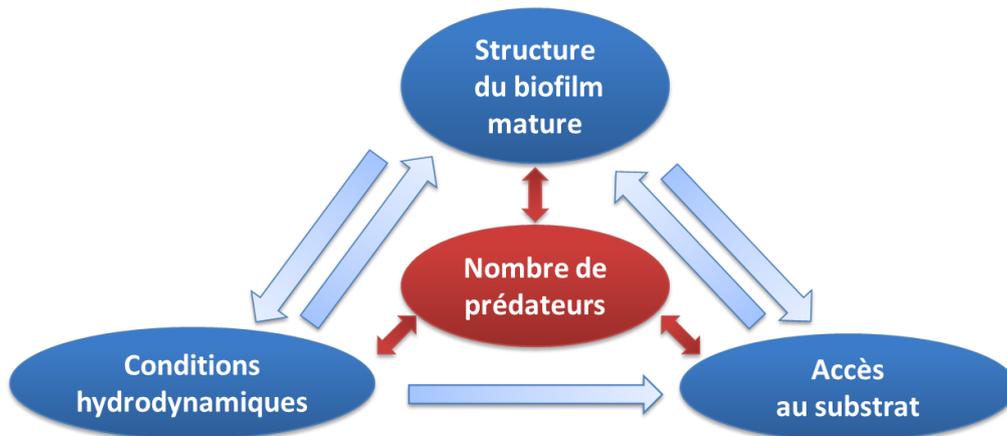


Figure III-20 : Mise en évidence de la problématique de la prédation dans les biofilms

La structure du biofilm mature va conditionner l'accessibilité des prédateurs aux microorganismes et en échange les prédateurs vont sculpter le biofilm. Ce faisant, ils vont modifier les conditions hydrodynamiques locales, à la fois via la création de canaux mais aussi par leur mécanisme d'ingestion qui peut générer des écoulements locaux. Les conditions hydrodynamiques du milieu vont aussi influencer sur le nombre de prédateurs dans le biofilm, ceux-ci étant plus susceptibles d'être lessivés du biofilm en cas de fortes contraintes hydrodynamiques. Ils vont aussi rendre le biofilm plus sensible au détachement via une

diminution de la cohésion du biofilm et un accroissement de sa porosité (Garny et al., 2008). Enfin, pouvant ingérer une quantité significative de biomasse bactérienne, ils vont aussi participer à la régulation de l'accès au substrat.

Néanmoins, en dépit de l'impact important de la prédation sur les biofilms matures et leur participation active au cycle de croissance-détachement-décroissance (Garny et al., 2009; Lewandowski et al., 2007), la littérature ne présente pas de moyen fiable pour leur quantification, en particulier concernant les prédateurs mobiles. Le fait qu'ils soient en mouvement au sein du biofilm rend difficile une estimation de leur nombre. L'objectif de cette section est donc de proposer une méthode de quantification des prédateurs mobiles dans les biofilms (Figure III-21).

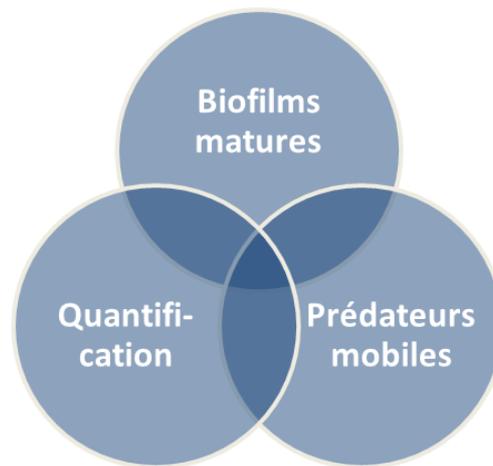


Figure III-21 : Originalité de l'étude de la prédation dans les biofilms matures

Pour ce faire, nous nous sommes focalisés sur des organismes métazoaires appelés rotifères, naturellement présent dans l'inoculum utilisé (boues activées). Leur quantification est d'autant plus utile qu'ils démontrent des intérêts dans le domaine du traitement de l'eau. Ils sont en effet utilisés en tant que bioindicateurs et favorisent le processus de décantation des boues granulaires (Hu et al., 2013; J. Li et al., 2013). Des techniques d'analyse d'image réalisées sur les acquisitions obtenues par stéréomicroscopie ont été développées pour mener à bien cette étude. Comme précédemment, deux colonnes à bulles présentant des conditions hydrodynamiques différentes ont été utilisées. Une plus large gamme de morphologies de biofilm est ainsi disponible pour tester la méthode.

III.3.2 An automated method for the quantification of moving predators such as rotifers in biofilms by image analysis

D'après l'article publié dans le Journal of Microbiological Methods

T. SAUR^a, K. MILFERSTEDT^a, N. BERNET^a, R. ESCUDIÉ^{a*}

^a INRA, UR0050, Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement, Avenue des Etangs, F-11100 Narbonne, France

* Corresponding author: renaud.escudie@supagro.inra.fr; (+33) (0)4 68 42 51 73

III.3.2.1 Abstract

In natural environments as well as in industrial processes, microorganisms form biofilms. Eukaryotic microorganisms, like metazoans and protozoans, can shape the microbial communities because of their grazing activity. However, their influence on biofilm structure is often neglected because of the lack of appropriate methods to quantify their presence. In the present work, a method has been developed to quantify moving population of rotifers within a biofilm. We developed an automated approach to characterize the rotifer population density. Two time lapse images are recorded per biofilm location at an interval of one second. By subtracting the two images from each other, rotifer displacements that occurred between the two images acquisition can be quantified. A comparison of the image analysis approach with manually counted rotifers showed a correlation of $R^2 = 0.90$, validating the automated method. We verified our method with two biofilms of different superficial and community structures and measured rotifer densities of up to 1700 per cm². The method can be adapted for other types of moving organisms in biofilms like nematodes and ciliates.

Keywords: Biofilm, predation, image analysis, rotifer, wastewater, hydrodynamic

Highlights

- Automated image-based method was developed to quantify displacements in biofilms
- The number of detected objects was used to estimate rotifer population density
- The method was validated by comparison with manual counting of rotifers
- Two different biofilms were grown to test the quantification method

III.3.2.2 **Introduction**

It has recently been demonstrated that the physical structure of a biofilm can be strongly affected by predation from eukaryotic members of the microbial community creating channels or enhancing micro-colonies formation (Böhme et al., 2009; Derlon et al., 2012). As biofilm systems are used in various applications in environmental biotechnology (Nicolella et al., 2000), the often neglected activity of eukaryotes (e.g. protozoa and metazoa), in addition to the activity of Bacteria and Archaea, may be a critical point to understand the performance of a unit process. Eukaryotic communities are already used as performance bioindicators in wastewater treatment plants (Hu et al., 2013; Pérez-Uz et al., 2010). Several studies focused on the identification of eukaryotic microorganisms in activated sludge by image analysis (Amaral et al., 2004; Ginoris et al., 2007) or enumeration of these organisms in water and soil systems (Lindquist et al., 1999; Lindström et al., 2002). Despite the interest of studying those eukaryotic communities, fewer investigations have been done on biofilms.

The present work focuses on moving organisms such as rotifers in biofilms. Rotifers are metazoan grazers widespread in aquatic environments (Wallace, 2002) and in wastewater treatment plants where they can improve sludge settling or suspended solids removal (Lapinski and Tunnacliffe, 2003; J. Li et al., 2013). Rotifers continually move in order to find their substrate. As they move, the estimation of rotifer abundance is difficult and usually neglected in activated sludge and biofilm systems. The aim here was to automatically quantify grazer's displacements on microscopic images. The displacements were used to calculate their population density. Images of biofilms were used for automated method testing and manual counting of rotifers for its validation.

III.3.2.3 **Methods**

III.3.2.3.1 **Experimental setup**

Biofilms were grown in two bubble column reactors as described in Milferstedt et al. (2013). Each 5-liter reactor contained 70 polyethylene coupons with a size of 5 cm². The coupons were glued on seven stainless steel rings. The reactors were inoculated with aerobic activated sludge, collected from the Armissan wastewater treatment plant. They were continuously fed with a concentrated sterilized substrate solution that was diluted with unsterilized, softened tap water. The substrate solution contained meat extract, yeast extract

and peptone at 1071 mg/L each, NH₄Cl 46 mg/L, K₂HPO₄ 150 mg/L, KH₂PO₄ 75 mg/L, MgSO₄·7H₂O 15 mg/L, Na₂HPO₄·2H₂O 157 mg/L and oligo-elements. A hydraulic retention time of 65 minutes was maintained to favor biofilm growth against growth of suspended cells. Mixing and oxygen supply were carried out by continuous aeration with ambient air.

III.3.2.3.2 *Hydrodynamic perturbations*

In order to develop a robust method valid for different biofilm structures, structurally dissimilar biofilms were grown under two different shear stresses. In fact, hydrodynamic conditions, such as shear stress, are a key parameter (Busscher and van der Mei, 2006) acting on both the physical structure (Stewart, 2012; van Loosdrecht et al., 2002) and the community structure (Rochex et al., 2008) of biofilms. In this work, a growing biofilm was subjected to variable hydrodynamic conditions, because these conditions approximate industrial environments where variable shear stresses are applied on the biofilm system. A first reactor was operated under stable hydrodynamic conditions by maintaining an air flow rate of 1 L/min throughout the experiment. In a second reactor, hydrodynamic perturbations were generated by an 8-fold increase of the air flow rate for 12 min every 60 min. For each condition, 1 and 8 L/min, the flow regime is described as a bubbly flow regime (Kantarci et al., 2005). This is a turbulent flow regime characterized by a homogeneous bubble size and velocity. In our experiments, a uniform cross-sectional bubble distribution was observed and no coalescence was noticed.

III.3.2.3.3 *Image acquisition and processing*

Figure III-22 presents the key steps of biofilm sampling, image acquisition and processing. Microscopic images of the biofilm were acquired with a Leica stereomicroscope M205 FA, equipped with a 0.63 × planapochromatic objective. Images at 22x magnification of the dimensions 2176 × 1632 pixels were acquired using a Peltier-cooled Leica DFC495 camera with the software Leica ApplicationSuite (LAS) core V3.5.0 (October 2009). The illumination settings of the microscope were calibrated before each use. Each image corresponded to a biofilm surface of 6.4 × 4.8 mm² and was saved as 8-bit gray level image in uncompressed “tif” format. 14 images of this area were necessary to describe the total surface of one coupon. Two time-lapse images of the same biofilm location were acquired at an interval of one second. The two images were subtracted from each other. After subtraction, only pixels differing on the two initial images remained on a differential image. These pixels

corresponded to the displacements of objects that moved, in our case rotifers, during the one second time interval. The differential image was then Otsu-thresholded (Otsu, 1979) and opened. After the automated image processing, two parameters can be calculated:

- (1) the global displacement response, defined here as the fraction of black pixels remaining after image processing of the total pixels (black and white pixels).
- (2) the number of moving objects which corresponded to the number of detected individual objects on the processed image

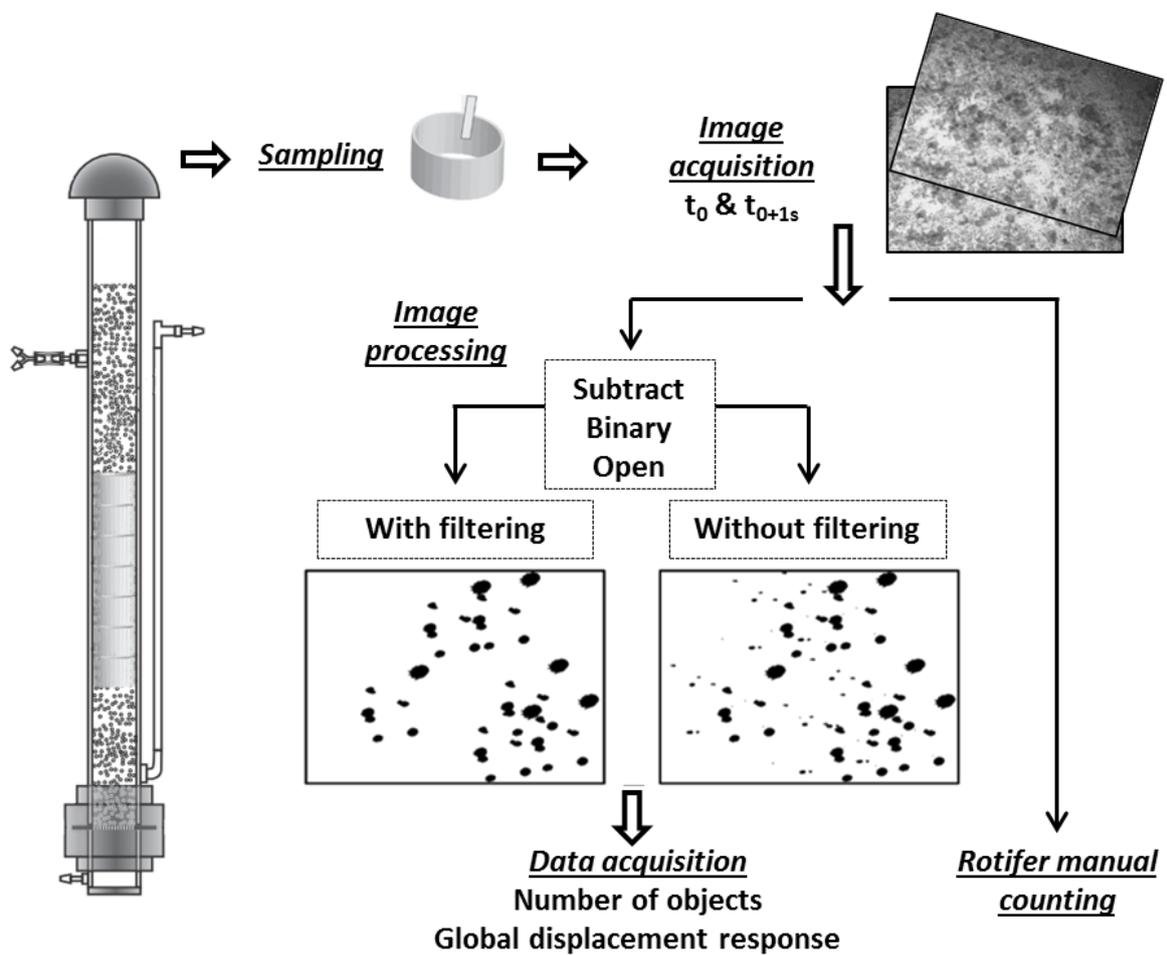


Figure III-22 : Method of sampling, image acquisition and processing.

III.3.2.4 ***Results and discussion***

III.3.2.4.1 ***Microscopic observations***

Those two hydrodynamic conditions, constant or variable shear, led to the development of different biofilm structures as observed by stereomicroscopy. Biofilms grown in the hydrodynamically perturbed reactor were characterized by the presence of filamentous structures, like small streamers (approximately 1 mm long). These results are consistent with recent studies, attributing the presence of streamers to variable hydrodynamic conditions (Rusconi et al., 2011). We also observed in this reactor a decrease in the quantity of rotifers whereas sessile ciliates were more abundant. The superficial structure of biofilms grown in the stable hydrodynamic conditions was more homogeneous and streamers were absent. In addition, a higher density of rotifer populations was observed. In order to characterize the difference of rotifer abundance, the proposed automated method was applied.

III.3.2.4.2 ***Quantification of rotifers***

In Figure III-23 we present the average global displacement responses obtained at days 29, 30 and 31 for both reactors. A feeding problem occurred at day 32 explaining why only these three dates are available. These average values were calculated from 14 pairs of images per experimental condition that covered the entire surface of a given coupon. On images from the hourly-perturbed reactor (variable shear), the global displacement response was approximately two times lower than on images from the reactor under constant shear. This difference in population density is consistent with the qualitative visual impression during microscopy. The next step was then to test if this method was also suitable for a quantitative estimation of the number of rotifers.

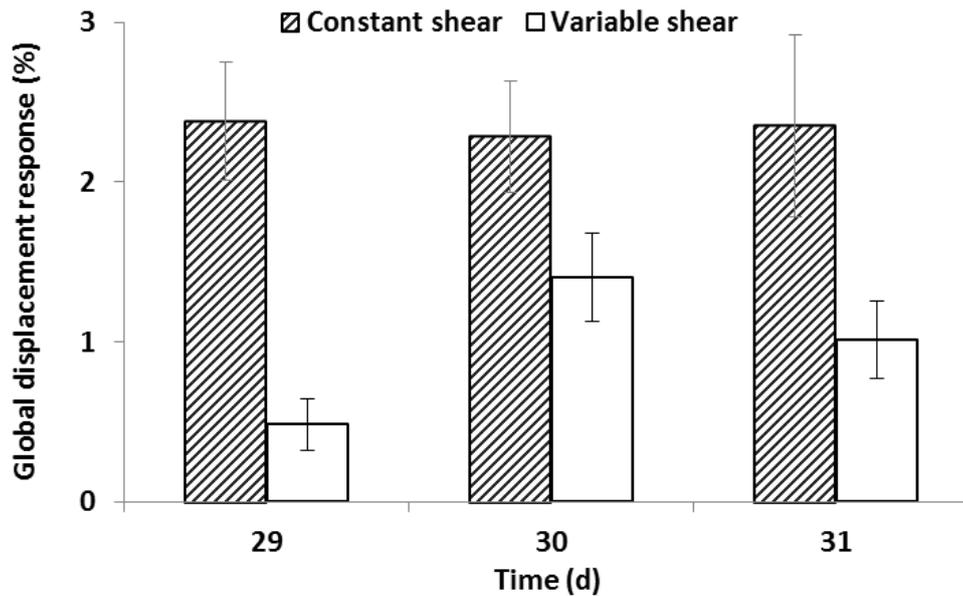


Figure III-23 : Comparison of the global displacement responses in both reactors.

Each bar represents the mean global displacement response of one coupon. The 14 images pairs describing the total area of each coupon are processed with the automated method without the final filtering step. The 14 resulting global displacement responses are then averaged and presented with their standard deviations

We compared the number of moving objects obtained from automated image analysis to the number of manually counted rotifers. Rotifers were manually counted on each biofilm location with the multi-point tool of the Image J software (Rasband, 1997). We show in Figures III-24 a and b the linear correlations of manual rotifer count with the global displacement response and with the number of moving objects, respectively. Each point corresponds to the manual and automated quantifications of grazing rotifers on one image pair. Altogether, 14 pairs of images were recorded for each biofilm structure and day. The data in the figures were obtained after a final filtering step in which objects smaller than $500 \mu\text{m}^2$ were removed. The goodness of fit for the linear models were $R^2_G = 0.81$ for the global displacement response (Figure III-24a) and $R^2_N = 0.90$ for the number of moving objects (Figure III-24b). We manually counted between 700 and 1700 rotifers per cm^2 in biofilms grown under stable hydrodynamic conditions, whereas the maximum number of rotifers was 410 per cm^2 under variable shear. Rotifer population density thus differentiates the two biofilm systems equally well as the global displacement response in Figure III-23. The high correlations in Figures III-24 a and b indicate that rotifer population density can be quantitatively measured from biofilm images using the proposed method.

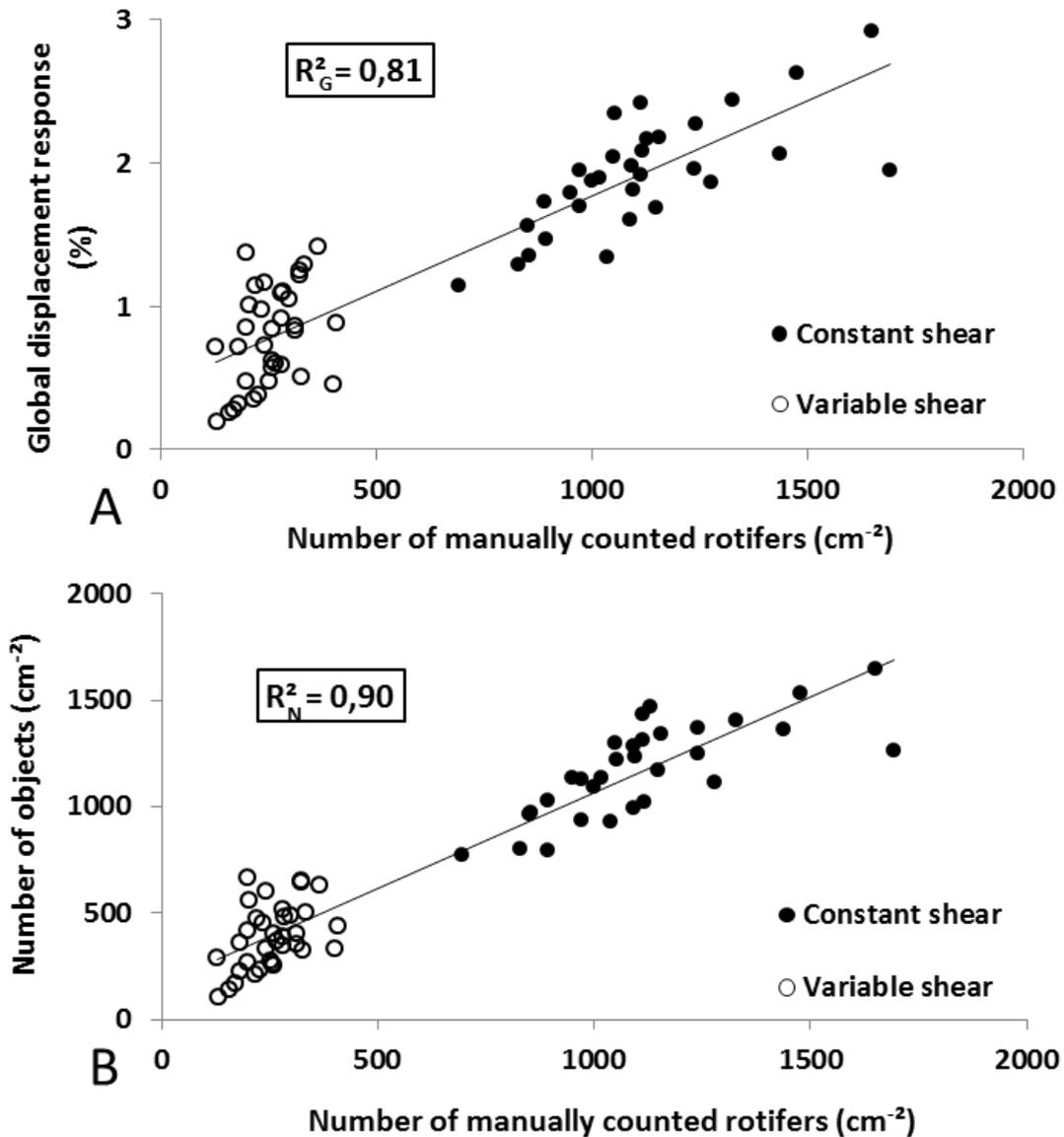


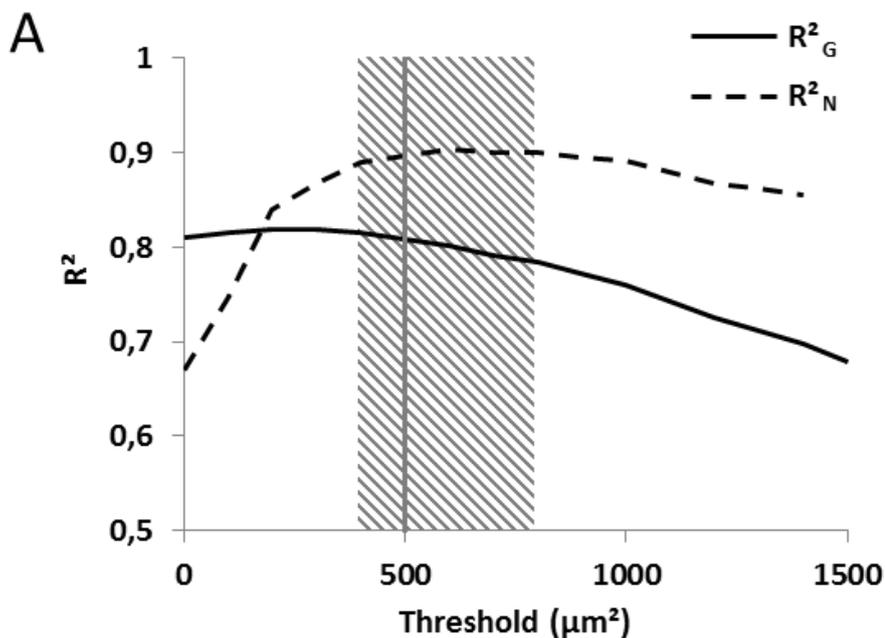
Figure III-24 : Comparison of manually and automated methods of quantification.

Correlations between the number of manually counted rotifers per image (x axis) and either the automatically calculated global displacement response (A) or the number of objects per cm² (B). Objects smaller than 500 μ m² were disregarded in this figure.

III.3.2.4.3 *Impact of the filtering step*

The sensitivity of our method to the threshold for removing objects during filtering was investigated. In Figure III-25a, we present the goodness of a linear fit to the manually and automatically determined data as a function of the filtering threshold. High and stable values of both R_G^2 and R_N^2 were observed over a wide range of filtering thresholds. An optimum zone (see hatched area in Figure III-25a) was obtained between 400 μ m² and 800 μ m² where

R^2_G and R^2_N were approximately 0.8 and 0.9, respectively. It can be concluded from Figure III-25 that a filtering step is necessary: with no filtering, R^2_G was not strongly impacted but R^2_N dropped to 0.67. A threshold at $500 \mu\text{m}^2$, as chosen for the data in Figure III-24, resulted in an average decrease of 19% for the global displacement response – from 1.62% to 1.32% - whereas the number of moving objects was reduced by 68% with a drop from 2631 to 758 objects·cm⁻². This demonstrates that a high number of small moving objects were disregarded that had no significant impact on the global displacement response. These small moving objects may be caused by the displacements of more slowly moving organisms compared to rotifers, e.g. netomades. At the given optical resolution of the microscope objective at the magnification, it is even more likely that these objects represent inherent noise, generated by image acquisition, Otsu-thresholding and image processing. The use of a filtering step is able to reduce this noise. Figure III-25a shows that both R^2_G and R^2_N decreased by applying high thresholds. This is related to the loss of information with the removal of moving objects that are part of our target group. The optimum zone is a good compromise between loss of valuable information and noise reduction.



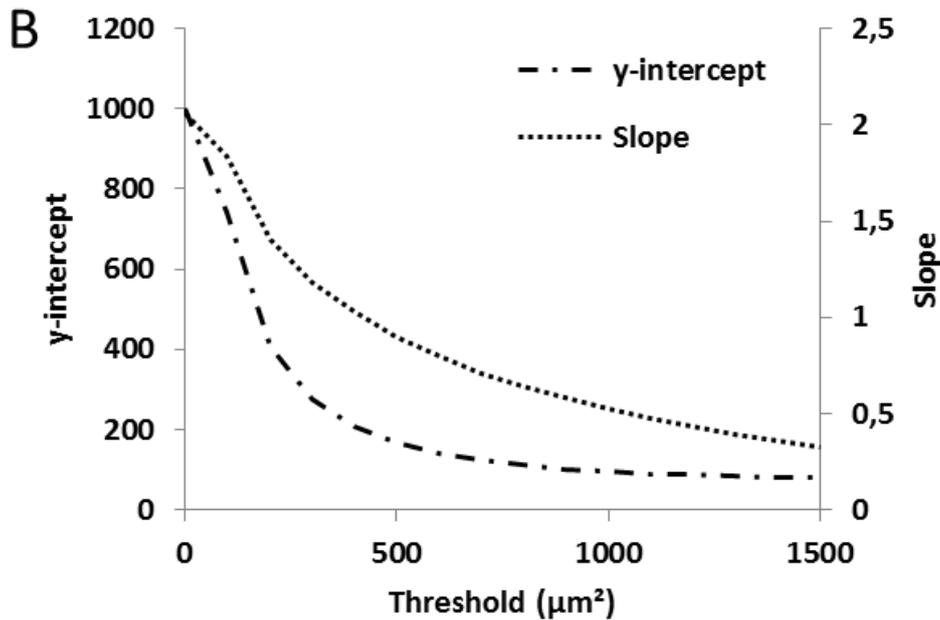


Figure III-25 : Impact of the filtering step of the correlations. (A) Relations between the R^2 of the rotifer manual counting and either the global displacement response (R^2G) and the number of objects (R^2N) correlations with the filtering threshold. The hatched area corresponds to an optimum zone of filtering thresholds. The vertical line corresponds to the threshold ($500\mu\text{m}^2$) used for Figure III-24. (B) Relationship between filtering threshold and slope and y-intercept of the linear regressions that fit the rotifer manual counting and the number of objects.

In Figure III-25b, the slope and y-intercept of the correlation between the number of moving objects and the number of rotifers are represented as a function of the filtering threshold. First, it can be noticed that the y-intercept was always positive and never equaled zero. As it has been said previously, other displacements and noise can interfere with our quantification. This generates the appearance of unwanted moving objects as the y-intercept indicates. A filtering step reduces this noise, since the higher the threshold is set, the lower the y-intercept is. In addition, the slope of the correlation between the number of moving objects and the number of rotifers decreased by increasing the threshold level. It is interesting to observe that the slope equaled one for a threshold at $400 \mu\text{m}^2$. But this does not mean that one rotifer corresponded to one object since the y-intercept equaled 200. Even though a slope of one may appear a reasonable criterion to select a threshold, we decided to use a threshold of $500 \mu\text{m}^2$ for Figure III-24 because a higher R^2N value was obtained.

Altogether, these data demonstrate the possibility to reliably determine the number of moving rotifers by image analysis. The proposed automated method developed can also be applied to other microbiological non-biofilm systems, for example suspended microorganisms in a liquid phase and other moving microorganisms such as nematodes, ciliates or even bacteria as it was used by Ojima et al. (1998). For other applications, only the image acquisition protocol needs to be adapted. First, the time interval between the acquisitions of two images needs to be adapted to the displacement speed of the target organisms. Also the investigated surface area and the image resolution must match the size of the moving organisms in order to obtain meaningful results. A calibration step is required to define the linear relationship between the image processing data and the number of target microorganisms. By using appropriate parameters for image acquisition, this approach can be suitable for quantifying every moving microorganism in a wide range of environments.

III.3.2.5 ***Conclusion***

In conclusion, our automated method was validated for estimating the density of populations of moving organisms, i.e. rotifers, in different biofilms. The removal of objects using a threshold is critical to improve the accuracy of the correlations but this method is effective for a wide range of filtering threshold. The aim of the filtering step is to find the good compromise between noise reduction and loss of information. An optimal zone can be determined. With this approach, it is possible to characterize a range of moving organisms that actively shape biofilm structure or serve as bioindicators and improve performance in wastewater treatment plants.

III.3.3 Discussion

Ce travail méthodologique a pour objectif de proposer un moyen de quantification des prédateurs mobiles au sein de biofilms matures. Ces organismes participent de manière significative à la structuration du biofilm. Ils ajoutent une couche de complexité supplémentaire dans les interactions déjà difficiles à appréhender entre la structure du biofilm, l'accès au substrat et les conditions hydrodynamiques. Ils ont en effet un impact double puisque les deux structures, morphologique et microbiologique, sont altérées par leur présence (Böhme et al., 2009; Derlon et al., 2012; Paris et al., 2007). La littérature témoigne du peu de moyens disponibles pour la quantification de ce type de prédateurs dans les biofilms (Garny et al., 2009; Pons et al., 2009). L'implémentation d'une telle méthodologie peut donc s'avérer précieuse pour le contrôle des procédés à biofilms. Il est de plus à noter que si la quantification de ces organismes ne décrit pas directement la structure morphologique du biofilm, elle informe néanmoins sur la structure microbiologique. Le nombre de prédateurs est en effet une information à part entière sur la communauté qui compose le biofilm et le cas présent, elle suffit à démontrer des structures différentes d'une condition hydrodynamique à l'autre.

Dans nos travaux, les conditions hydrodynamiques sont utilisées comme un outil pour obtenir deux biofilms structurellement distincts. De ce fait, la méthode de quantification a été testée sur une plus large gamme d'hétérogénéités du biofilm. Les travaux témoignent de la robustesse importante du traitement d'image, le rendant d'autant plus facile à mettre en œuvre de manière fiable. Il est démontré que la seule condition réellement importante est de calibrer un filtrage adéquat. Ce filtrage permet de largement épurer l'image du bruit inhérent à son traitement. Mais là encore, une large gamme de seuil de coupure du filtrage est possible.

L'intérêt applicatif de cette étude de quantification est multiple. D'une part, la quantification des prédateurs au sein des biofilms représente une information précieuse car ils sont un facteur important des phénomènes de structuration du biofilm. Grandement impliqués dans les événements de détachement, ces organismes sont des acteurs cruciaux des cycles de croissance-détachement-recroissance des biofilms matures. D'autre part, les rotifères sont aussi une population pertinente à étudier dans le cadre du traitement de l'eau. Ils sont tout d'abord des indicateurs de la santé de la biomasse et leur abondance témoigne de conditions opératoires adéquates (Duchene and Cotteux, 1993). En outre, leur présence permet

d'optimiser les performances du procédé, notamment via des temps de décantation secondaire plus courts et par de meilleurs rendements épuratoires des matières en suspension (Lapinski and Tunnacliffe, 2003; J. Li et al., 2013). Cette méthodologie, pensée pour les biofilms matures, peut s'appliquer pour tout type de procédé, que les biofilms aient acquis leurs structures différenciées ou non. Sa mise en œuvre permettrait de suivre et contrôler le biofilm indirectement en estimant le nombre de prédateurs mobiles. La simplicité et la rapidité de la méthode permettrait une réactivité plus grande. Enfin cette méthode par analyse d'image peut être facilement transposable à un autre système, qu'il s'agisse de biofilms ou non, pour la quantification de métazoaires, de protozoaires ou de tout autre organisme mobile. Les paramètres d'acquisition devront cependant être redéfinis de manière appropriée en fonction de la vitesse et de la taille de l'organisme ciblé. Une fois bien paramétrée, cette méthode dispose d'un vaste champ d'applications.

III.4 Discussion générale et perspectives

Ce projet de thèse avait pour ambition de mieux comprendre les processus de structuration des biofilms. Nous avons opté pour une étude répartie tout au long du cycle de vie du biofilm, de l'adhésion jusqu'aux biofilms matures. Déclinés en trois parties, ces travaux s'intéressent pour chacune d'elle à un paramètre structurant donné. Néanmoins, les conditions hydrodynamiques ont été choisies comme fil conducteur des travaux de recherche. Elles représentent un facteur clé, quelle que soit l'étape du cycle de vie du biofilm considérée, aussi bien pour la structuration morphologique que microbiologique, comme en témoigne la vaste littérature.

Nous avons d'abord étudié l'impact du cisaillement sur l'adhésion microbienne. Nous avons observé un effet significatif de ce paramètre sur la quantité et la distribution spatiale des microorganismes ainsi que sur la composition de la flore fixée. La question d'un effet à plus long terme s'est alors posée. Nous avons donc analysé les effets d'un changement de régime hydrodynamique sur la structure du biofilm. Cette perturbation hydrodynamique a été testée à différents moments dans le développement du biofilm. Il est apparu qu'un effet mémoire se met en place, le biofilm conservant ses propriétés initiales si le changement intervient à partir d'un certain degré de maturité du biofilm. Cette partie met en avant l'impact de l'histoire du biofilm sur sa propre structuration à venir. Enfin, sur les biofilms matures, nous avons développé une méthode pour la quantification des prédateurs mobiles. Cette méthode permet de dénombrer des organismes d'intérêt qui non seulement structurent et sculptent le biofilm mature mais peuvent être directement utilisés comme bioindicateurs.

Ainsi ces travaux offrent une vision plus globale de la structuration du biofilm. L'objectif est aussi de prendre en compte un aspect de temporalité à la fois des structures et des facteurs structurants. En s'intéressant au biofilm depuis les étapes initiatrices de sa formation et jusqu'au biofilm mature, nous avons caractérisé une large gamme de morphologies et de flores microbiennes. Nous nous sommes intéressés à l'évolution des structures dans le temps et à l'impact d'une structure donnée à un moment donné sur la suite du processus de structuration. Par ailleurs, par temporalité des facteurs structurants, il est entendu l'observation de leur impact à différents moments du développement du biofilm. Le biofilm est en effet en perpétuelle interaction avec son milieu et les conséquences d'une modification

d'un paramètre à un moment donné du cycle de vie du biofilm ne seront pas systématiquement identiques.

En étudiant de près ces considérations temporelles, ces travaux permettent d'alimenter une discussion qui anime la littérature du domaine. En effet, Hall-Stoodley et al. (2004) rapportent qu'il existe un débat au sein de la communauté scientifique au sujet de la contribution respective d'une structuration passive et d'une structuration active. La première consiste en une réponse physique ou physico-chimique du biofilm aux conditions environnementales (Picioareanu et al., 1998). Il peut s'agir de la compaction du biofilm sous l'effet d'une contrainte hydrodynamique (Laspidou and Rittmann, 2004; Paul et al., 2012), d'une affinité préférentielle pour un type de matériau (Habouzit et al., 2011; Meylheuc et al., 2006), de systèmes de résistance mécanique face au détachement (Stoodley et al., 1999; Thomas et al., 2002), etc. Le second type de structuration, dit actif, implique des interactions microbiennes et des régulations génétiques. L'équilibre entre la compétition et la coopération entre les individus constituant le biofilm permet alors d'expliquer les structures résultantes (Nadell et al., 2009). Ces mécanismes sous-entendent une véritable organisation au sein du biofilm. Des exemples sont fréquemment trouvés dans la littérature, que cela concerne les problématiques d'adhésion (Davies et al., 1993; Stoodley et al., 2002), de stratification (Gupta et al., 1997; Ohashi et al., 1995) ou encore les phénomènes de détachement (Hall-Stoodley et al., 2004). La structure du biofilm est donc la résultante d'une structuration active, déterminée par des facteurs biologiques, et d'une structuration passive, directement conditionnée par les facteurs physico-chimiques donnés par le milieu.

Nos travaux contribuent à ce débat et viennent mettre en lumière un aspect temporel jusqu'à maintenant très peu étudié. Ils suggèrent en effet un passage d'une structuration essentiellement régie par des phénomènes physiques et physico-chimiques à une structuration où la part des interactions biologiques devient de plus en plus importante. La Figure III-26 résume cette analyse.

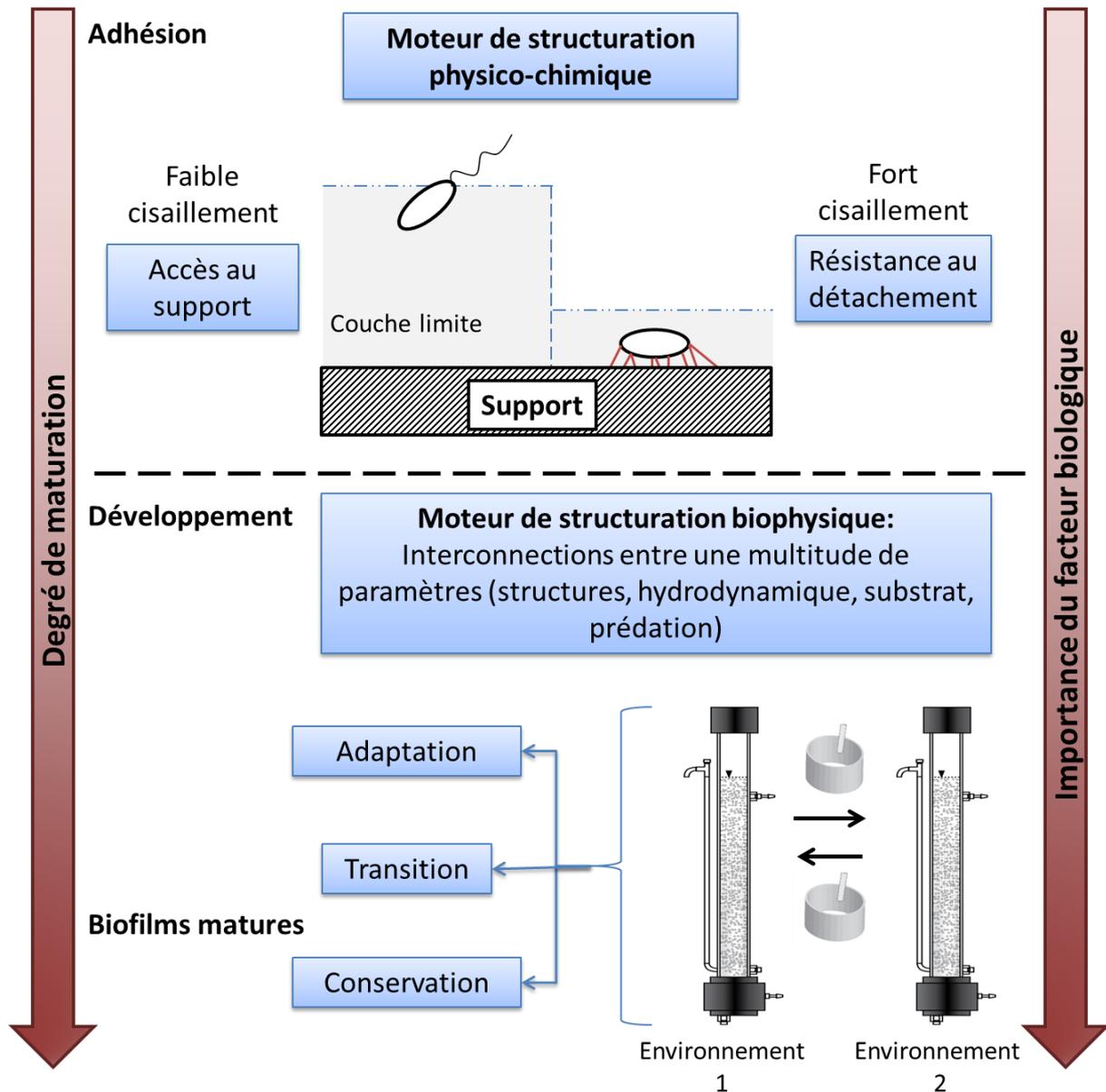


Figure III-26 : L'évolution des phénomènes de structuration du biofilm au cours de son cycle de vie

Tout d'abord pour les travaux d'adhésion, il est constaté un effet très fort de l'augmentation du cisaillement. La communauté microbienne fixée est directement dépendante du cisaillement imposé. Il en va de même pour la distribution spatiale des microorganismes sur la surface de support, une formation de clusters de plus en plus nette apparaissant avec l'augmentation du cisaillement. Les mécanismes moteurs de cette structuration sont intimement liés aux processus physiques et physico-chimiques mis en jeu. A faible cisaillement, l'accès au support est l'obstacle principal (Bakker et al., 2002). Les

microorganismes dotés d'une motilité propre sont plus à même de franchir la couche limite et d'accéder au support. A fort cisaillement, la couche limite se réduit sensiblement – d'un facteur six dans notre cas, passant de 750 μm et 125 μm (Lathrop et al., 1992). L'accès au support est donc grandement facilité mais les forces de détachement quant à elles augmentent. C'est désormais la contrainte de cisaillement et l'aptitude des microorganismes à résister à cette contrainte qui devient le facteur structurant. Sont alors avantagés les microorganismes sujets à la co-adhésion (Bos et al., 1994) ou encore ceux possédant de bonnes affinités pour le support (Habimana et al., 2014; Wang et al., 2011). Et ainsi, guidé par un équilibre entre ces deux phénomènes physiques, l'accès au support ou la force d'adhésion permettant de résister au détachement, le biofilm va se structurer morphologiquement et microbiologiquement. La structuration intervenant lors des étapes d'adhésion est donc clairement – mais non exclusivement – soumise à une structuration passive.

Dans les étapes ultérieures, lors du développement du biofilm, nos travaux suggèrent un passage progressif vers une importance de plus en plus prépondérante d'un facteur biologique dans le contrôle de la structuration du biofilm. Des changements de conditions hydrodynamiques effectués tôt dans le processus de maturation du biofilm – six jours en l'occurrence – engendrent une adaptation des structures au nouvel environnement. Ceci témoigne de l'importance de la structuration passive menée par les conditions opératoires. Cependant si le changement est réalisé plus tard, lorsque le biofilm est mature, les structures morphologique et microbiologique n'évoluent pas et ne s'adaptent pas aux nouveaux paramètres environnementaux. La structuration passive s'avère donc dans ce cas inopérante. Le facteur biologique, représenté ici par l'histoire du biofilm et les structures acquises auparavant, va être prépondérant. Les structures sont conservées malgré un changement de l'environnement hydrodynamique qui, si seule une structuration passive existait, devrait entraîner une adaptation du biofilm. Il est donc mis en évidence une part de plus en plus importante d'un facteur biologique dans les phénomènes de structuration morphologique et microbiologique. Dans notre cas, il n'est cependant pas possible de parler de structuration active comme défini par Hall-Stoodley et al. (2004) dans la mesure où nous ne nous sommes pas intéressés aux régulations et interactions moléculaires à proprement parler. Néanmoins notre étude contribue à mettre en exergue que la structuration passive seule ne permet pas d'expliquer les structures résultantes. Une contribution croissante d'un facteur biologique ou biophysique avec l'âge du biofilm est donc mise en évidence.

Reprenant les travaux de Besemer et al. (2007), nous parlons en effet de moteur de structuration biophysique. Les auteurs suivent l'évolution de la flore du biofilm sous différentes contraintes hydrodynamiques. Des différences microbiologiques sont constatées dans les premières semaines et mises en lien avec le régime hydrodynamique. Progressivement, avec la maturation du biofilm, les auteurs notent un fort développement de microalgues qui vont modifier l'architecture du biofilm. Se faisant, les autres paramètres et en particulier les conditions hydrodynamiques locales, vont être altérés. Cela va progressivement résulter en un lissage des différences obtenues précédemment. Les auteurs parlent alors d'un contrôle biophysique car il s'agit de modifications des paramètres physiques – hydrodynamiques – causées par des phénomènes biologiques. Nos travaux témoignent exactement du même type de processus : l'impact de la structure sur la structure elle-même. Dans l'étude précédente, des microalgues sont impliquées. Il est à noter que leur influence est plus forte que l'impact de l'histoire du biofilm puisque leur présence va lisser les différences microbiologiques au cours du temps. Dans d'autres types de biofilms, des prédateurs tels que les rotifères pourraient jouer exactement le même rôle. Comme nous l'avons dit, il est évident que tous ces phénomènes sont intimement corrélés et interdépendants. Les régulations génétiques observées peuvent en effet être la réponse à un stimulus environnemental (Stoodley et al., 2002) et peuvent en retour modifier les paramètres physiques locaux (Picioreanu et al., 2000; Telgmann et al., 2004). Dissocier une structuration purement passive de la contribution purement biologique est donc extrêmement délicat. Les récents travaux de Hödl et al. (2014) vont dans le même sens. Les modèles mis au point dans l'étude permettent en effet d'expliquer les morphologies du biofilm à partir de deux éléments : les conditions hydrodynamiques et certains paramètres d'écologie microbienne (croissance microbienne, fusion de microcolonies, attachement, taux d'immigration), les deux facteurs étant en interactions.

Notre étude ouvre des perspectives scientifiques intéressantes même si des travaux supplémentaires sont nécessaires pour véritablement envisager des applications concrètes. Concernant la problématique de l'adhésion, il serait judicieux de continuer à explorer les phénomènes de structuration du biofilm, en particulier en régime turbulent et avec des inocula complexes. Pour aller plus loin dans la réflexion sur le rapport entre la structuration physique et biophysique, différentes concentrations en microorganismes pourraient être testées. La question d'un « effet dose » des microorganismes sur les caractéristiques d'adhésion est

pertinente. L'équilibre entre l'accès au support et les événements de décrochement est-il dose-dépendant ? Et surtout les structures observées diffèrent-elles alors ?

Pour prolonger cette question, la durée de l'expérience peut aussi être augmentée. Si nous partons de l'hypothèse d'une structuration de cette étape d'adhésion gouvernée par des mécanismes purement physiques, les temps caractéristiques devraient être très courts. Une durée prolongée ne devrait donc pas nécessairement avoir un impact significatif, les structures étant supposément acquises rapidement. Néanmoins, si cette problématique de prolongement de la durée est approfondie jusqu'à l'étude du développement du biofilm (durée de plusieurs jours), il serait très intéressant de suivre l'évolution des structures du biofilm. L'enjeu est de déterminer si les différences observées au moment de l'adhésion se lissent ou s'amplifient et de quelles manières. Des travaux de ce type sont déjà répertoriés dans la littérature mais se cantonnent généralement à des souches pures en régime laminaire et/ou ne s'intéressent pas aux toutes premières structures (1 à 3 heures) (Park et al., 2011; Pereira et al., 2002; Perni et al., 2006).

D'un point de vue procédé, ces travaux sont aussi encourageants. Notre étude sur l'adhésion démontre qu'une sélection des communautés microbiennes contrôlée par les forces de cisaillement est possible. D'autre part, les travaux sur le développement du biofilm ont permis d'identifier la conservation des structures matures malgré des changements environnementaux et ce grâce à l'effet mémoire du biofilm et l'émergence d'un contrôle biophysique de la structuration. Réunis, ces deux travaux ouvrent des perspectives prometteuses pour l'ingénierie des biofilms et des procédés associés. Ils laissent supposer que des communautés microbiennes pourraient être sélectionnées, choisies grâce à une contrainte hydrodynamique appropriée. Dans un second temps, après maturation de ce biofilm, la contrainte hydrodynamique appliquée initialement pourrait être modifiée sans que le biofilm et sa communauté soient altérés. Si le raisonnement est mené jusqu'au bout, il serait donc possible de façonner les biofilms au moyen de contraintes physiques, notamment hydrodynamiques, selon des objectifs donnés dans un premier réacteur de culture. Les biofilms matures sculptés à façon pourraient alors dans un second temps être exploités dans un procédé où l'environnement hydrodynamique serait différent sans que cela n'influence les structures mémorisées par le biofilm. D'innombrables points restent à éclaircir pour aboutir à un tel résultat, néanmoins la perspective est stimulante.

Un des aspects extrêmement intéressants à approfondir est l'interaction entre les structurations active et passive, entre les contrôles physique et biophysique. Cette problématique complexe est la clé pour une compréhension réelle de la structuration des biofilms. En ce sens, des travaux similaires à ceux que nous avons menés sur l'effet mémoire pourraient être entrepris mais en changeant la nature de la perturbation. Nous avons soumis les biofilms à une modification des contraintes hydrodynamiques. Mais les mêmes résultats auraient-ils été obtenus dans le cas d'un changement de la concentration ou de la composition du substrat ? L'influence de la disponibilité en substrat sur la structure du biofilm est bien documentée (Teodósio et al., 2011; van Loosdrecht et al., 2002). Néanmoins la question d'un effet mémoire pour de telles perturbations environnementales reste entière.

Un autre facteur biologique dont l'influence sur la structure du biofilm n'est plus à prouver réside dans la prédation. Le remarque peut être étendue à l'ensemble des organismes eucaryotes qui, par leur mode de nutrition ou leur simple présence, vont participer à un contrôle biophysique de la structuration des biofilms (Besemer et al., 2007; Böhme et al., 2009; Garny et al., 2009; Paris et al., 2007). Le développement des techniques de quantification de ces organismes peut permettre une meilleure prise en compte de leur influence. Il est même tout à fait imaginable de favoriser la présence de ces organismes et de les utiliser comme outils biologiques pour sculpter le biofilm. Derlon et al. (2012) démontrent par exemple l'impact bénéfique de la prédation sur les performances de filtration membranaire gravitaire.

IV. CONCLUSION

L'objectif de ce projet de thèse a consisté à identifier les phénomènes de structuration des biofilms. Une meilleure compréhension de ces mécanismes a un enjeu applicatif double. Tout d'abord cela concerne les biofilms positifs en ouvrant des perspectives pour l'optimisation des procédés à biofilm, dans les domaines du traitement des eaux et des biotechnologies environnementales par exemple. D'autre part, cela peut permettre une lutte plus efficace contre le développement des biofilms négatifs et ainsi aboutir à un meilleur fonctionnement de procédés industriels et à une plus grande sécurité sanitaire dans le milieu médical.

Le travail a porté sur trois étapes du cycle de vie du biofilm : l'adhésion, le développement et le biofilm mature. Ce faisant, nous avons couvert une large gamme de structures possiblement rencontrées dans les procédés. De plus, nous avons choisi de travailler en régime turbulent et avec des consortia complexes, conditions retrouvées fréquemment en milieu industriel.

Ainsi, nous avons dans un premier temps démontré que les contraintes de cisaillement exerçaient une influence importante sur la structuration des étapes d'adhésion des microorganismes. A forts cisaillements, nous avons noté la formation de regroupements microbiens, ou clusters, dont la taille augmente avec la contrainte hydrodynamique. Par ailleurs, nous avons observé une modification progressive de la structure microbiologique avec le cisaillement appliqué.

Nous nous sommes ensuite intéressés au développement du biofilm. Nous avons soumis les biofilms à un changement de régime hydrodynamique à différents moments dans leur développement. Ceci a permis de constater l'influence de l'histoire du biofilm sur sa propre structuration à venir. En effet, nous avons démontré que si le changement est opéré sur un biofilm jeune, celui-ci va s'adapter à son nouvel environnement. Mais un changement opéré sur des biofilms matures génère une conservation des structures morphologiques et microbiologiques mémorisées lors de leur développement : ce phénomène a été appelé effet mémoire.

Enfin ce projet de thèse s'est focalisé sur les biofilms matures. Une méthode de quantification de prédateurs mobiles par analyse d'image a été développée. Ces microorganismes jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de structuration des biofilms. Une meilleure prise en compte de ce type de population va renforcer notre compréhension des structures de biofilm rencontrées. La méthode a été testée sur une large gamme de

morphologies. Un regard critique est apporté sur l'analyse d'image en s'intéressant à sa sensibilité et sa possible extrapolation à d'autres systèmes biologiques.

Prises une à une, chacune de ces parties vient répondre à des questions que la littérature avait laissées en suspens. Les travaux d'adhésion viennent compléter une littérature essentiellement tournée vers des régimes laminaires et en souche pure. Notre étude sur le développement des biofilms trouve son originalité dans l'aspect de temporalité, à la fois dans le fait d'imposer une perturbation environnementale sur le long terme mais aussi en prenant en considération l'âge du biofilm. Enfin notre contribution sur les biofilms matures et les prédateurs mobiles offre la possibilité de quantifier des organismes d'intérêt jusqu'à alors souvent ignorés faute de moyen pour caractériser ces populations. Regardé dans son ensemble, ce projet permet d'étudier les contributions respectives des phénomènes physiques et des phénomènes biophysiques dans la structuration du biofilm. Il suggère qu'au fur et à mesure que le biofilm se développe, le contrôle biophysique de la structuration du biofilm prend de l'importance, le biofilm ne répondant plus uniquement aux contraintes environnementales.

Ce projet apporte donc des informations précieuses sur des processus complexes et pas encore maîtrisés. De nombreux travaux restent néanmoins nécessaires pour mieux appréhender la structuration morphologique et microbiologique des biofilms. Trop souvent, les études se focalisent sur une étape précise du cycle de vie du biofilm. L'approche temporelle globale abordée ici gagnerait à être encore approfondie. Les processus régissant la structuration du biofilm évoluent au cours du cycle de vie de celui, il est donc crucial de considérer cet aspect avec plus d'intérêt. De plus, si nous avons pris les conditions hydrodynamiques comme point central de notre étude, bien d'autres paramètres influents peuvent être étudiés, comme la concentration et la composition du substrat, la prédation, la compétition microbienne, etc. Les interactions multiples entre tous les paramètres gouvernant la structuration des biofilms sont extrêmement complexes à appréhender et anticiper. De plus amples travaux doivent être menés afin d'améliorer notre compréhension de ces interactions et leurs effets sur le biofilm. La réflexion sur les contributions respectives des structurations passive et active, des contrôles physique et biophysique de celles-ci s'en verra enrichie.

Enfin, les objectifs développés ici, consistant à étudier le biofilm dans des conditions opératoires directement inspirées des procédés, doivent être perpétués. Ils permettent de

donner une dimension applicative à nos travaux. Cette thèse a en effet pour ambition de s'insérer dans une dynamique plus globale de minimisation de l'impact de l'homme sur son environnement en optimisant l'utilisation des ressources et de l'énergie. Elle contribue ainsi à nourrir une réflexion environnementale d'actualité et plus que jamais opportune.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR, 1999. La qualité de l'eau. Paris.
- Amaral, A.L., da Motta, M., Pons, M.N., Vivier, H., Roche, N., Mota, M., Ferreira, E.C., 2004. Survey of Protozoa and Metazoa populations in wastewater treatment plants by image analysis and discriminant analysis. *Environmetrics* 15, 381–390.
- Andereck, C.D., Liu, S.S., Swinney, H.L., 1986. Flow regimes in a circular Couette system with independently rotating cylinders. *Journal of Fluid Mechanics* 164, 155–183.
- Andrews, C.S., Denyer, S.P., Hall, B., Hanlon, G.W., Lloyd, a W., 2001. A comparison of the use of an ATP-based bioluminescent assay and image analysis for the assessment of bacterial adhesion to standard HEMA and biomimetic soft contact lenses. *Biomaterials* 22, 3225–33.
- Azeredo, J., Visser, J., Oliveira, R., 1999. Exopolymers in bacterial adhesion: interpretation in terms of DLVO and XDLVO theories. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 141–148.
- Bakke, R., Trulear, M.G., Robinson, J.A., Characklis, W.G., 1984. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: Steady state. *Biotechnology and bioengineering* 26, 1418–24.
- Bakker, D., Van der Plaats, A., Verkerke, G., Busscher, H., Van der Mei, H., 2003. Comparison of velocity profiles for different flow chamber designs used in studies of microbial adhesion to surfaces. *Applied and environmental microbiology* 69, 6280–6287.
- Bakker, D.P., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., 2002. Bacterial deposition in a parallel plate and a stagnation point flow chamber: microbial adhesion mechanisms depend on the mass transport conditions. *Microbiology (Reading, England)* 148, 597–603.
- Batstone, D.J., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., 2006. Multidimensional modelling to investigate interspecies hydrogen transfer in anaerobic biofilms. *Water research* 40, 3099–108.
- Battin, T.J., Sloan, W.T., Kjelleberg, S., Daims, H., Head, I.M., Curtis, T.P., Eberl, L., 2007. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature reviews. Microbiology* 5, 76–81.
- Beaussart, A., Herman, P., El-Kirat-Chatel, S., Lipke, P.N., Kucharíková, S., Van Dijck, P., Dufrière, Y.F., 2013. Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis*-*Candida albicans* interaction. *Nanoscale* 5, 10894–900.
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., van Oss, C.J., 1996. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47–53.
- Besemer, K., Hödl, I., Singer, G., Battin, T.J., 2009a. Architectural differentiation reflects bacterial community structure in stream biofilms. *The ISME journal* 3, 1318–24.

- Besemer, K., Singer, G., Hödl, I., Battin, T.J., 2009b. Bacterial community composition of stream biofilms in spatially variable-flow environments. *Applied and environmental microbiology* 75, 7189–95.
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.-K., Hochedlinger, G., Hödl, I., Baranyi, C., Battin, T.J., 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Applied and environmental microbiology* 73, 4966–74.
- Böhme, A., Risse-Buhl, U., Küsel, K., 2009. Protists with different feeding modes change biofilm morphology. *FEMS Microbiology Ecology* 69, 158–69.
- Bos, R., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1995. A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber. II: Analysis of the kinetics of co-adhesion. *Journal of Microbiological Methods* 23, 169–182.
- Bos, R., van der Mei, H.C., Meinders, J.M., Busscher, H.J., 1994. A quantitative method to study co-adhesion of microorganisms in a parallel plate flow chamber: basic principles of the analysis. *Journal of Microbiological Methods* 20, 289–305.
- Brandstätter, A., Swift, J., Swinney, H.L., Wolf, A., Farmer, J.D., Jen, E., Crutchfield, P., 1983. Low-dimensional chaos in a hydrodynamic system. *Physical review letters* 51, 1442–1445.
- Brugnoni, L., Cubitto, M., Lozano, J., 2012. *Candida krusei* development on turbulent flow regimes: Biofilm formation and efficiency of cleaning and disinfection program. *Journal of Food Engineering*.
- Brugnoni, L.I., Cubitto, M.A., Lozano, J.E., 2011. Role of shear stress on biofilm formation of *Candida krusei* in a rotating disk system. *Journal of Food Engineering* 102, 266–271.
- Bryers, J.D., 1988. Modeling of Biofilm Accumulation, in: *Physiological Models in Microbiology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 109–144.
- Busscher, H.J., van der Mei, H.C., 2006. Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clinical Microbiology Reviews* 19, 127–141.
- Casey, E., 2007. Tracer measurements reveal experimental evidence of biofilm consolidation. *Biotechnology and bioengineering* 98, 913–8.
- Characklis, W.G., Marshall, K.C., 1990. *Biofilms*. John Wiley and Sons.
- Chessel, D., Dufour, A.B., Thioulouse, J., 2004. The ade4 package-I- One-table methods. *R News* 4, pp 5–10.
- Cornillon, P.A., 2008. *Statistiques avec R*, PU Rennes.
- Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of microbiology* 41, 435–64.

- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J., 1978. How bacteria stick. *Scientific American* 238, 86–95.
- Coufort, C., 2004. Analyse expérimentale de la floculation en réacteur de Taylor-Couette : Influence de l'hydrodynamique sur les phénomènes d'agglomération et de rupture. INSA Toulouse.
- Coufort, C., Bouyer, D., Liné, a., 2005. Flocculation related to local hydrodynamics in a Taylor–Couette reactor and in a jar. *Chemical Engineering Science* 60, 2179–2192.
- Cresson, R., Escudié, R., Steyer, J.-P., Delgenès, J.-P., Bernet, N., 2008. Competition between planktonic and fixed microorganisms during the start-up of methanogenic biofilm reactors. *Water research* 42, 792–800.
- Davies, D., Geesey, G., 1995. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and environmental microbiology* 61.
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M., Geesey, G.G., 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology* 59, 1181–6.
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science (New York, N.Y.)* 280, 295–8.
- Derjaguin, B., Landau, L., 1941. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochimica U.R.S.S.* 14, 633–62.
- Derlon, N., 2008. Analyse de la compétition microbienne entre bactéries autotrophes et hétérotrophes au sein d'un biofilm éliminant l'azote. INSA Toulouse.
- Derlon, N., Massé, A., Escudié, R., Bernet, N., Paul, E., 2008. Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water research* 42, 2102–10.
- Derlon, N., Peter-Varbanets, M., Scheidegger, A., Pronk, W., Morgenroth, E., 2012. Predation influences the structure of biofilm developed on ultrafiltration membranes. *Water Research* 46, 3323–33.
- Desmet, G., Verelst, H., Baron, G., 1996. Local and global dispersion effects in Couette-Taylor flow—I. Description and modeling of the dispersion effects. *Chemical engineering science* 51, 1287–1298.
- Dickinson, R.B., Cooper, S.L., 1995. Analysis of shear-dependent bacterial adhesion kinetics to biomaterial surfaces. *AIChE Journal* 41, 2160–2174.
- Duchene, P., Cotteux, E., 1993. Les éléments les plus significatifs de la microfaune des boues activées. *Techniques Sciences Méthodes* 9, p. 471–477.

- Elenter, D., Milferstedt, K., Zhang, W., Hausner, M., Morgenroth, E., 2007. Influence of detachment on substrate removal and microbial ecology in a heterotrophic/autotrophic biofilm. *Water research* 41, 4657–71.
- Elimelech, M., 1994. Particle deposition on ideal collectors from dilute flowing suspensions : Mathematical formulation , numerical solution , and. *Sep. Technol.* 4.
- Feldner, J., Bredt, W., Kahane, I., 1983. Influence of cell shape and surface charge on attachment of *Mycoplasma pneumoniae* to glass surfaces. *Journal of bacteriology* 153, 1–5.
- Fenstermacher, P., Swinney, H.L., Gollub, J., 1979. Dynamical instabilities and the transition to chaotic Taylor vortex flow. *Journal of fluid mechanics* 94, 103–128.
- Flemming, H.C., Wingender, J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)--Part II: Technical aspects. *Water science and technology* 43, 9–16.
- Florjanič, M., Kristl, J., 2011. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. *International journal of pharmaceutics* 405, 16–22.
- Gagnon, G. a, Slawson, R.M., 1999. An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water. *Journal of Microbiological Methods* 34, 203–214.
- Garny, K., Horn, H., Neu, T.R., 2008. Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. *Bioprocess and biosystems engineering* 31, 619–29.
- Garny, K., Neu, T.R., Horn, H., 2009. Sloughing and limited substrate conditions trigger filamentous growth in heterotrophic biofilms—Measurements in flow-through tube reactor. *Chemical Engineering Science* 64, 2723–2732.
- Gerke, C., Kraft, a., Sussmuth, R., Schweitzer, O., Gotz, F., 1998. Characterization of the N-Acetylglucosaminyltransferase Activity Involved in the Biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis Polysaccharide Intercellular Adhesin. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18586–18593.
- Ghigo, J.M., 2003. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Research in microbiology* 154, 1–8.
- Ginoris, Y.P., Amaral, A.L., Nicolau, A., Coelho, M.A.Z., Ferreira, E.C., 2007. Development of an image analysis procedure for identifying protozoa and metazoa typical of activated sludge system. *Water Research* 41, 2581–9.
- Gomes, L.C., Moreira, J.M.R., Miranda, J.M., Simões, M., Melo, L.F., Mergulhão, F.J., 2013. Macroscale versus microscale methods for physiological analysis of biofilms formed in 96-well microtiter plates. *Journal of microbiological methods* 95, 342–9.

- Guo, L., He, X., Shi, W., 2014. Intercellular communications in multispecies oral microbial communities. *Frontiers in Microbiology* 5, 1–13.
- Gupta, N., Gupta, S., Ramachandran, K., 1997. Modelling and simulation of anaerobic stratified biofilm for methane production and prediction of multiple steady states. *The Chemical Engineering Journal* 65, 37–46.
- Habimana, O., Semião, a. J.C., Casey, E., 2014. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation on nanofiltration/reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science* 454, 82–96.
- Habouzit, 2010. Rôle des matériaux-soutports sur la mise en place du biofilm : Application au démarrage d'un procédé de méthanisation. Université Montpellier 2.
- Habouzit, F., Gévaudan, G., Hamelin, J., Steyer, J.-P., Bernet, N., 2011. Influence of support material properties on the potential selection of Archaea during initial adhesion of a methanogenic consortium. *Bioresource technology* 102, 4054–60.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology* 2, 95–108.
- Haralick, R.M., Shanmugam, K., Dinstein, I., 1973. Textural Features for Image Classification. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 3, 610–621.
- Hermansson, M., 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14, 105–119.
- Hödl, I., Mari, L., Bertuzzo, E., Suweis, S., Besemer, K., Rinaldo, A., Battin, T.J., 2014. Biophysical controls on cluster dynamics and architectural differentiation of microbial biofilms in contrasting flow environments. *Environmental microbiology* 16, 802–12.
- Hong, Y., Brown, D.G., 2008. Electrostatic behavior of the charge-regulated bacterial cell surface. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 24, 5003–9.
- Horn, H., 2012. Biofilm growth devices and reactors, in: 7th Advanced Biofilm Course, KIT. Karlsruhe, p. 39.
- Horn, H., Hempel, D., 1997a. Growth and decay in an auto-/heterotrophic biofilm. *Water Research* 31, 2243–2252.
- Horn, H., Hempel, D.C., 1997b. Substrate utilization and mass transfer in an autotrophic biofilm system: Experimental results and numerical simulation. *Biotechnology and bioengineering* 53, 363–71.
- Horn, H., Reiff, H., Morgenroth, E., 2003. Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. *Biotechnology and bioengineering* 81, 607–17.

- Hu, B., Qi, R., Yang, M., 2013. Systematic analysis of microfauna indicator values for treatment performance in a full-scale municipal wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Sciences* 25, 1379–1385.
- Kantarci, N., Borak, F., Ulgen, K.O., 2005. Bubble column reactors. *Process Biochemistry* 40, 2263–2283.
- Kapur, J.N.J., Sahoo, P.P.K., Wong, A.A.K.C., 1985. A new method for gray-level picture thresholding using the entropy of the histogram. *Computer Vision, Graphics, and Image Processing* 29, 140.
- Kataoka, K., 1986. Chapter 9 - Taylor vortices and instabilities in circular Couette flows, in: *Encyclopedia of Fluid Mechanics, Vol1. Flow Phenomena and Measurements*. Houston, p. pp 236 – 274 (sur 1521).
- Kaya, R., Deveci, G., Turken, T., Sengur, R., Guclu, S., Koseoglu-Imer, D.Y., Koyuncu, I., 2014. Analysis of wall shear stress on the outside-in type hollow fiber membrane modules by CFD simulation. *Desalination* 351, 109–119.
- Kühl, M., 2012. Microenvironmental Analysis of Biofilms, in: 7th Advanced Biofilm Course, KIT. Karlsruhe, p. 168.
- Lackner, S., Holmberg, M., Terada, A., Kingshott, P., Smets, B.F., 2009. Enhancing the formation and shear resistance of nitrifying biofilms on membranes by surface modification. *Water Research* 43, 3469–3478.
- Lapinski, J., Tunnacliffe, A., 2003. Reduction of suspended biomass in municipal wastewater using bdelloid rotifers. *Water Research* 37, 2027–34.
- Lapidou, C.S., Rittmann, B.E., 2004. Modeling the development of biofilm density including active bacteria, inert biomass, and extracellular polymeric substances. *Water research* 38, 3349–61.
- Lathrop, D., Fineberg, J., Swinney, H., 1992. Transition to shear-driven turbulence in Couette-Taylor flow. *Physical Review A* 46, 6390–6405.
- Lauvvik, T., Bakke, R., 1994. Biofilm thickness measurements by variance analysis of optical images. *Journal of Microbiological Methods* 20, 219–224.
- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D., Neu, T.R., 2000. A simple rotating annular reactor for replicated biofilm studies. *Journal of microbiological methods*.
- Lazarova, V., Manem, J., 1995. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water research* 29, 2227–2245.
- Lecuyer, S., Rusconi, R., Shen, Y., Forsyth, A., Vlamakis, H., Kolter, R., Stone, H.A., 2011. Shear stress increases the residence time of adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal* 100, 341–350.

- LeGuen, M., 2002. La boîte à moustaches de TUKEY un outil pour initier à la Statistique.
- Lelièvre, C., Legentilhomme, P., Gaucher, C., Legrand, J., Faille, C., Bénézech, T., 2002. Cleaning in place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment. *Chemical Engineering Science* 57, 1287–1297.
- Lewandowski, Z., Beyenal, H., Myers, J., Stookey, D., 2007. The effect of detachment on biofilm structure and activity: the oscillating pattern of biofilm accumulation. *Water Science & Technology* 55, 429–436.
- Lewandowski, Z., Beyenal, H., Stookey, D., 2004. Reproducibility of biofilm processes and the meaning of steady state in biofilm reactors. *Water science and technology : a journal of the International Association on Water Pollution Research* 49, 359–64.
- Li, J., Ma, L., Wei, S., Horn, H., 2013. Aerobic granules dwelling vorticella and rotifers in an SBR fed with domestic wastewater. *Separation and Purification Technology* 110, 127–131.
- Li, M., Nakhla, G., Zhu, J., 2013. Impact of worm predation on pseudo-steady-state of the circulating fluidized bed biofilm reactor. *Bioresource technology* 128, 281–9.
- Lindquist, H.D., Dufour, a P., Wymer, L.J., Schaefer, F.W., 1999. Criteria for evaluation of proposed protozoan detection methods. *Journal of microbiological methods* 37, 33–43.
- Lindström, E.S., Weisse, T., Stadler, P., 2002. Enumeration of small ciliates in culture by flow cytometry and nucleic acid staining. *Journal of microbiological methods* 49, 173–82.
- Liu, Y., Tay, J.-H., 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research* 36, 1653–1665.
- Losick, R., Desplan, C., 2008. Stochasticity and cell fate. *Science (New York, N.Y.)* 320, 65–8.
- Lu, H., Koo, L.Y., Wang, W.M., Lauffenburger, D. a, Griffith, L.G., Jensen, K.F., 2004. Microfluidic shear devices for quantitative analysis of cell adhesion. *Analytical chemistry* 76, 5257–64.
- Macfarlane, S., Bahrami, B., Macfarlane, G.T., 2011. Mucosal biofilm communities in the human intestinal tract. *Advances in applied microbiology* 75, 111–43.
- Mack, W.N., Mack, J.P., Ackerson, A.O., 1975. Microbial film development in a trickling filter. *Microbial ecology* 2, 215–26.
- Mangalappalli-Illathu, A.K., Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Korber, D.R., 2008. Architectural adaptation and protein expression patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilms under laminar flow conditions. *International journal of food microbiology* 123, 109–20.

- Martin, K.J., Nerenberg, R., 2012. The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: principles, applications, and recent developments. *Bioresource technology* 122, 83–94.
- Meinders, J., Mei, H. Van der, Busscher, H., 1995. Deposition efficiency and reversibility of bacterial adhesion under flow. *Journal of Colloid and ...* 341, 329–341.
- Meylheuc, T., Methivier, C., Renault, M., Herry, J.-M., Pradier, C.-M., Bellon-Fontaine, M.N., 2006. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 52, 128–37.
- Michelland, R.J., Dejean, S., Combes, S., Fortun-Lamothe, L., Cauquil, L., 2009. StatFingerprints: a friendly graphical interface program for processing and analysis of microbial fingerprint profiles. *Molecular ecology resources* 9, 1359–63.
- Milferstedt, K., Pons, M.-N., Morgenroth, E., 2008. Textural fingerprints: a comprehensive descriptor for biofilm structure development. *Biotechnology and bioengineering* 100, 889–901.
- Milferstedt, K., Pons, M.-N., Morgenroth, E., 2009. Analyzing characteristic length scales in biofilm structures. *Biotechnology and bioengineering* 102, 368–79.
- Milferstedt, K., Santa-Catalina, G., Godon, J.-J., Escudié, R., Bernet, N., 2013. Disturbance frequency determines morphology and community development in multi-species biofilm at the landscape scale. *PloS one* 8, e80692.
- Miller, R.M., Tomaras, A.P., Barker, A.P., Voelker, D.R., Chan, E.D., Vasil, A.I., Vasil, M.L., 2008. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility-mediated chemotaxis towards phospholipids and fatty acids: specificity and metabolic requirements. *Journal of bacteriology* 190, 4038–49.
- Monds, R.D., O’Toole, G. a, 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology* 17, 73–87.
- Morin, E., 2013. Etude de l’impact des conditions hydrodynamiques sur l’adhésion de bactéries en vue de la formation de biofilms. Montpellier SupAgro.
- Motte, J., 2013. Digestion anaérobie par voie sèche de résidus lignocellulosiques : Etude dynamique des relations entre paramètres de procédés, caractéristiques du substrat et écosystème microbien. Université de Montpellier II.
- Myint, A.A., Lee, W., Mun, S., Ahn, C.H., Lee, S., Yoon, J., 2010. Influence of membrane surface properties on the behavior of initial bacterial adhesion and biofilm development onto nanofiltration membranes. *Biofouling* 26, 313–21.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Foster, K.R., 2009. The sociobiology of biofilms. *FEMS microbiology reviews* 33, 206–24.

- Neu, T., Swerhone, G.D., Lawrence, J.R., 2001. Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology (Reading, England)* 147, 299–313.
- Neu, T.R., 2012. Laser Scanning Microscopy, in: 7th Advanced Biofilm Course, KIT. Karlsruhe, p. 29.
- Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 2000. Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of Biotechnology* 80, 1–33.
- O’Toole, G. a, Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology* 30, 295–304.
- Ochoa, J.-C., Coufort, C., Escudié, R., Liné, A., Paul, E., Escudie, R., Line, A., 2007. Influence of non-uniform distribution of shear stress on aerobic biofilms. *Chemical Engineering Science* 62, 3672–3684.
- Ohashi, a, Virajdesilva, D., Mobarry, B., Manem, J., Stahl, D., Rittmann, B., 1995. Influence of substrate c/n ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs. *Water Science and Technology* 32, 75–84.
- Ojima, M., Tamagawa, H., Hayashi, N., Hanioka, T., Shizukuishi, S., 1998. Semi-automated measurement of motility of human subgingival microflora by image analysis. *Journal of Clinical Periodontology* 25, 612–6.
- Okabe, S., Hiratia, K., Ozawa, Y., Watanabe, Y., 1996. Spatial microbial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms. *Biotechnology and bioengineering* 50, 24–35.
- Oksanen, J., Blanchet, G.F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O’Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., 2011. *vegan: Community Ecology Package*.
- Otsu, N., 1979. A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9, 62–66.
- Paris, T., Skali-lami, S., Block, J., 2007. Effect of Wall Shear Rate on Biofilm Deposition and Grazing in Drinking Water Flow Chambers 97, 1550–1561.
- Park, A., Jeong, H.-H., Lee, J., Kim, K.P., Lee, C.-S., 2011. Effect of shear stress on the formation of bacterial biofilm in a microfluidic channel. *BioChip Journal* 5, 236–241.
- Paul, E., Ochoa, J.C., Pechaud, Y., Liu, Y., Liné, A., 2012. Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water research* 46, 5499–508.
- Pechaud, Y., Marcato-Romain, C.E., Girbal-Neuhauser, E., Queinnec, I., Bessiere, Y., Paul, E., 2012. Combining hydrodynamic and enzymatic treatments to improve multi-species thick biofilm removal. *Chemical Engineering Science* 80, 109–118.

- Percival, S.L., Emanuel, C., Cutting, K.F., Williams, D.W., 2012. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *International wound journal* 9, 14–32.
- Pereira, M.O., Kuehn, M., Wuertz, S., Neu, T., Melo, L.F., 2002. Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Biotechnology and bioengineering* 78, 164–71.
- Pérez-Uz, B., Arregui, L., Calvo, P., Salvadó, H., Fernández, N., Rodríguez, E., Zornoza, A., Serrano, S., 2010. Assessment of plausible bioindicators for plant performance in advanced wastewater treatment systems. *Water Research* 44, 5059–69.
- Perni, S., Jordan, S., Andrew, P., Shama, G., 2006. Biofilm development by *Listeria innocua* in turbulent flow regimes. *Food Control* 17, 875–883.
- Piciooreanu, C., van Loosdrecht, M.C., Heijnen, J.J., 1998. Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnology and bioengineering* 58, 101–16.
- Piciooreanu, C., Van Loosdrecht, M.C., Heijnen, J.J., 2000. Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: a two-dimensional modeling study. *Biotechnology and bioengineering* 69, 504–15.
- Pierra, M., Trably, E., Godon, J.-J., Bernet, N., 2014. Fermentative hydrogen production under moderate halophilic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy* 39, 7508–7517.
- Pons, M.-N., Milferstedt, K., Morgenroth, E., 2009. Biofilm monitoring on rotating discs by image analysis. *Biotechnology and bioengineering* 103, 105–16.
- Pratt, L. a, Kolter, R., 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology* 30, 285–93.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P., 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 181, 5993–6002.
- R Development Core Team, 2010. R: a language and environment for statistical computing.
- Racina, A., Kind, M., 2006. Specific power input and local micromixing times in turbulent Taylor–Couette flow. *Experiments in Fluids* 41, 513–522.
- Ras, M., Lefebvre, D., Derlon, N., Hamelin, J., Bernet, N., Paul, E., Girbal-Neuhauser, E., 2013. Distribution and hydrophobic properties of Extracellular Polymeric Substances in biofilms in relation towards cohesion. *Journal of biotechnology* 165, 85–92.
- Rasband, W., 1997. ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- Renslow, R., Lewandowski, Z., Beyenal, H., 2011. Biofilm image reconstruction for assessing structural parameters. *Biotechnology and bioengineering* 108, 1383–94.

- Revetta, R.P., Gomez-Alvarez, V., Gerke, T.L., Curioso, C., Santo Domingo, J.W., Ashbolt, N.J., 2013. Establishment and early succession of bacterial communities in monochloramine-treated drinking water biofilms. *FEMS microbiology ecology* 86, 404–14.
- Rochex, A., Godon, J.-J., Bernet, N., Escudié, R., 2008. Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water Research* 42, 4915–4922.
- Rochex, A., Massé, A., Escudié, R., Godon, J.-J., Bernet, N., 2009. Influence of abrasion on biofilm detachment: evidence for stratification of the biofilm. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 36, 467–70.
- Roosjen, A., Boks, N.P., Mei, H.C. van der, Busscher, H.J., Norde, W., 2005. Influence of shear on microbial adhesion to PEO-brushes and glass by convective-diffusion and sedimentation in a parallel plate flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46, 1–6.
- Rusconi, R., Lecuyer, S., Autrusson, N., Guglielmini, L., Stone, H.A., 2011. Secondary flow as a mechanism for the formation of biofilm streamers. *Biophysical Journal* 100, 1392–9.
- Sauer, K., Camper, A.K., 2001. Characterization of Phenotypic Changes in *Pseudomonas putida* in Response to Surface-Associated Growth Characterization of Phenotypic Changes in *Pseudomonas putida* in Response to Surface-Associated Growth 183.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* 184, 1140–1154.
- Saur, T., Milferstedt, K., Bernet, N., Escudié, R., 2014. An automated method for the quantification of moving predators such as rotifers in biofilms by image analysis. *Journal of microbiological methods* 103, 40–3.
- Sen, B., Hamelin, J., Bru-Adan, V., Godon, J.-J., Chandra, T.S., 2008. Structural divergence of bacterial communities from functionally similar laboratory-scale vermicomposts assessed by PCR-CE-SSCP. *Journal of applied microbiology* 105, 2123–32.
- Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., 2008. Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. *International journal of food microbiology* 128, 309–16.
- Slater, M., Schaechter, M., 1974. Control of cell division in bacteria. *Bacteriological reviews* 38, 199–221.
- Stewart, P.S., 2012. Mini-review: convection around biofilms. *Biofouling* 28, 187–98.
- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., 1998. Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop. *Biotechnology and bioengineering* 57, 536–44.

- Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., 1999. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnology and bioengineering* 65, 83–92.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology* 56, 187–209.
- Taherzadeh, D., Picioreanu, C., Horn, H., 2012. Mass transfer enhancement in moving biofilm structures. *Biophysical journal* 102, 1483–92.
- Taherzadeh, D., Picioreanu, C., Küttler, U., Simone, A., Wall, W. a, Horn, H., 2010. Computational study of the drag and oscillatory movement of biofilm streamers in fast flows. *Biotechnology and bioengineering* 105, 600–10.
- Taylor, G.I., 1923. Stability of a Viscous Liquid Contained between Two Rotating Cylinders. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 223, 289–343.
- Telgmann, U., Horn, H., Morgenroth, E., 2004. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water research* 38, 3671–84.
- Teodósio, J.S., Simões, M., Melo, L.F., Mergulhão, F.J., 2011. Flow cell hydrodynamics and their effects on *E. coli* biofilm formation under different nutrient conditions and turbulent flow. *Biofouling* 27, 1–11.
- Terada, A., Yuasa, A., Tsuneda, S., Hirata, A., Katakai, A., Tamada, M., 2005. Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 43, 99–107.
- Thomas, W.E., Trintchina, E., Forero, M., Vogel, V., Sokurenko, E. V., 2002. Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell* 109, 913–923.
- Tsai, Y., Pai, T., Qiu, J., 2004. The impacts of the AOC concentration on biofilm formation under higher shear force condition. *Journal of Biotechnology* 111, 155–167.
- Tukey, J.W., 1977. *Exploratory Data Analysis*. Pearson
- Van Loosdrecht, M., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., Zehnder, A., 1987. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measure to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and environmental microbiology* 53, 1898–1901.
- Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., Eberl, H., Kreft, J., Picioreanu, C., 2002. Mathematical modelling of biofilm structures. *Antonie van Leeuwenhoek* 81, 245–56.
- Van Merode, A.E.J., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Krom, B.P., Merode, A. van, 2006. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* 188, 2421–6.

- Van Oss, C., Good, R., Chaudhury, M., 1986. The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in “hydrophobic interactions” between biopolymers and low energy surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 111, 378–390.
- Van Oss, C.J., 1995. Hydrophobicity of biosurfaces — Origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5, 91–110.
- Verwey, E.J.W., Overbeek, J.T.G., 1948. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids: The Interaction of Sol Particles Having an Electric Double Layer*. Elsevier Publishing Company.
- Wagner, M., 2012. Optical Coherence Tomography, in: 7th Advanced Biofilm Course, KIT. Karlsruhe, p. 35.
- Wagner, M., Taherzadeh, D., Haisch, C., Horn, H., 2010. Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using optical coherence tomography. *Biotechnology and bioengineering* 107, 844–53.
- Wallace, R.L., 2002. Rotifers: Exquisite Metazoans. *Integrative and Comparative Biology* 42, 660–667.
- Walter, M., Safari, A., Ivankovic, A., Casey, E., 2013. Detachment characteristics of a mixed culture biofilm using particle size analysis. *Chemical Engineering Journal* 228, 1140–1147.
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2003. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 317–323.
- Wang, H., Sodagari, M., Chen, Y., He, X., Newby, B.-M.Z., Ju, L.-K., 2011. Initial bacterial attachment in slow flowing systems: Effects of cell and substrate surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 87, 415–22.
- Wéry, N., Bru-Adan, V., Minervini, C., Delgènes, J.-P., Garrelly, L., Godon, J.-J., 2008. Dynamics of *Legionella* spp. and bacterial populations during the proliferation of *L. pneumophila* in a cooling tower facility. *Applied and environmental microbiology* 74, 3030–7.
- West, S. a., Diggle, S.P., Buckling, A., Gardner, A., Griffin, A.S., 2007. The Social Lives of Microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38, 53–77.
- Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G., Lewandowski, Z., 2000. Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of microbiological methods* 39, 109–19.
- Yau, C., 2013. *R Tutorial with Bayesian Statistics Using OpenBUGS*.
- Young, K.D., 2006. The selective value of bacterial shape. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70, 660–703.

Yu, H., Chen, S., Cao, P., 2012. Synergistic bactericidal effects and mechanisms of low intensity ultrasound and antibiotics against bacteria: a review. *Ultrasonics sonochemistry* 19, 377–82.

ANNEXES

Annexe 1 : Modification sur le réacteur de Couette-Taylor

Nous avons utilisé le modèle 1320LJ de la société Biosurface Technologies Corp., Bozeman, Etats-Unis. Celui-ci est normalement muni d'une double-enveloppe. Le réacteur se compose alors de trois cylindres concentriques : le cylindre interne rotatif, le cylindre externe, la double-enveloppe. Le volume utile est d'environ 1L, l'entrefer de 8mm et le rayon externe de 78mm. Nous avons procédé au retrait du cylindre externe. C'est donc la double-enveloppe qui fait office de cylindre externe. Le volume est porté à 3L, l'entrefer à 28mm et le rayon externe 98mm. Comme le présente la Figure A-1, cette modification du rayon externe a un impact sur le cisaillement.

$$\tau = [2,13 * (R_i/R_e)^{3/2} * Re^{1,445} * \rho v^2] / [2\pi R_i^2 * (1-R_i/R_e)^{1,75}] \text{ pour } Re > 800$$

$$\tau = [0,113 * (R_i/R_e)^{3/2} * Re^{1,764} * \rho v^2] / [2\pi R_i^2 * (1-R_i/R_e)^{1,75}] \text{ pour } Re > 10^4$$

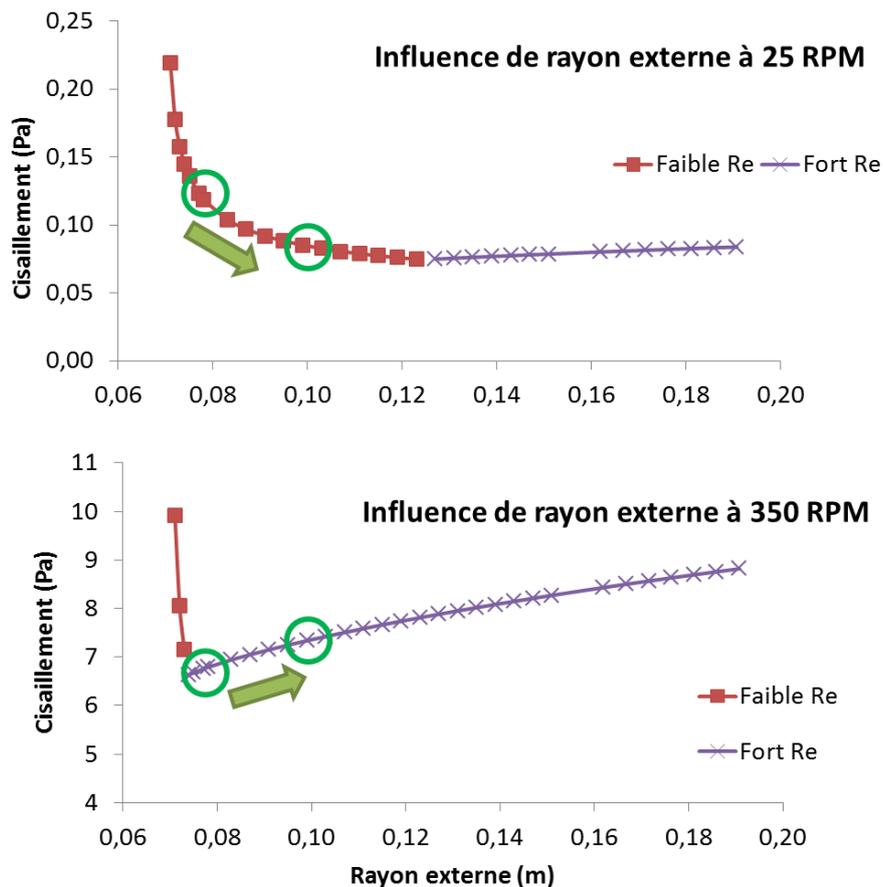


Figure A-1 : Mise en évidence de l'effet du rayon externe sur le cisaillement.

Le cisaillement ne s'exprime pas avec la même corrélation en fonction du nombre de Reynolds Re . A faible vitesse de rotation, Re est inférieur à 10^4 et la corrélation donnant le cisaillement est décroissante avec le rayon externe (représenté en rouge). A fort cisaillement, la seconde corrélation est utilisée et le cisaillement augmente avec le rayon externe (représenté en violet). L'augmentation du rayon externe (symbolisé par les ronds et flèches verts sur la Figure A-1) permet donc de diminuer le cisaillement à 25 rpm (de 0,12 à 0,09 Pa) et de l'augmenter à 350 rpm (de 6,8 à 7,3 Pa). Le retrait du cylindre externe et l'augmentation du rayon externe ont donc permis de diminuer la valeur de la borne inférieure et d'augmenter la valeur de la borne supérieure. Cette modification du CTR permet ainsi de passer d'un rapport 57 à un rapport 87 entre les deux bornes testées.

Annexe 2 : Test sur l'inoculum des essais d'adhésion

Plusieurs essais ont été réalisés concernant l'inoculum des travaux d'adhésion. L'enjeu est d'adhérer assez de microorganismes pour qu'un signal analysable soit obtenu, que cela au niveau de la fluorescence en microscopie ou au niveau de l'extraction d'ADN.

Des boues congelées ont d'abord été testées, mais cette solution a très vite été abandonnée en raison de la très faible quantité de microorganismes adhérents. Des boues fraîches ont donc été utilisées mais, sans décantation préalable, de nombreux flocons déposés sur les coupons rendent impossible l'observation microscopique. Nous avons donc testé plusieurs solutions impliquant le surnageant (Figure A-2).

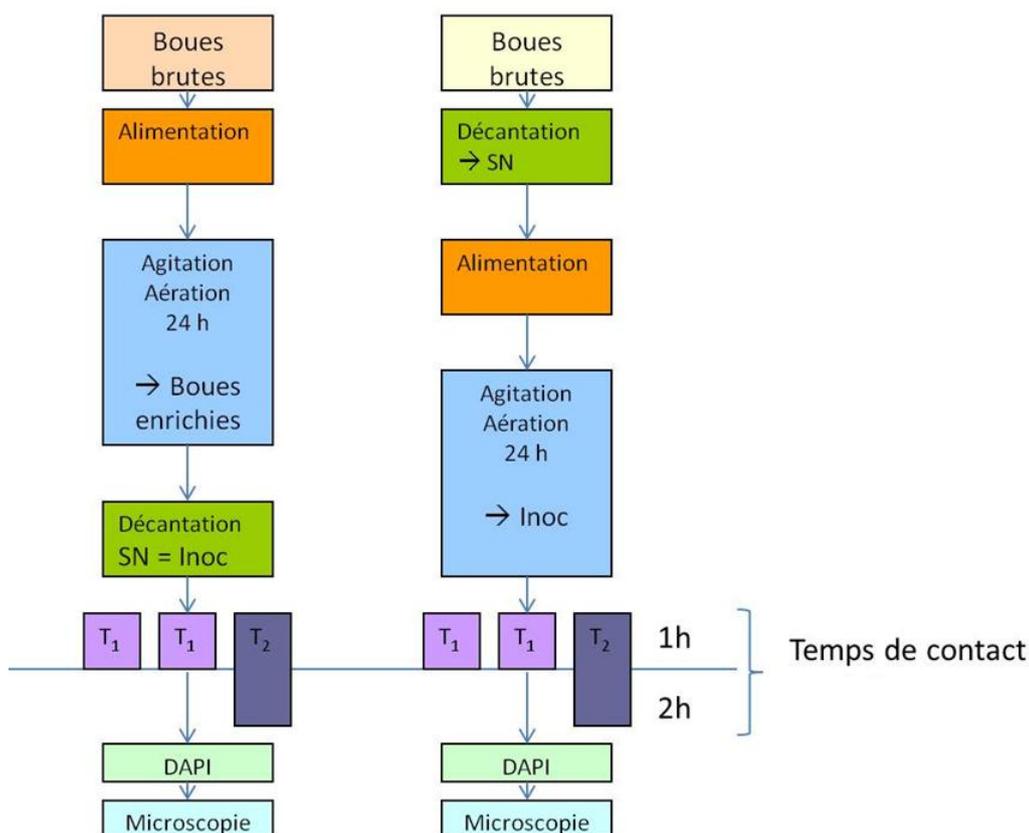


Figure A-2 : Description des essais réalisés sur la décantation et l'alimentation des boues activées servant d'inoculum (adaptée de Morin (2013))(Inoc : Inoculum finale, SN : Surnageant).

Des boues activées sont donc prélevées puis :

- soit alimentées puis aérées 24 heures puis décantées avant l'inoculation
- soit décantées puis alimentées puis aérées 24 heures avant l'inoculation.

Dans les deux cas, des temps de contact d'une ou deux heures ont été opérés. La Figure A-3 présente les observations microscopiques obtenues.

Culture Temps de contact	Boues alimentées 24 heures puis décantées	Surnageant alimenté 24 heures
1h		
2h		

Figure A-3 : Résultats des essais d'enrichissement de l'inoculum sur la microscopie à épifluorescence. (adaptée de Morin (2013))

Il apparaît donc une nette amélioration en termes d'abondance de microorganismes fixés entre les deux solutions testées. Néanmoins, aucune de différence majeure n'est apparue entre des temps de contact d'une heure et deux heures. Nous avons donc opté pour un enrichissement des boues activées par décantation puis alimentation et un temps de contact d'une heure.

Annexe 3 : Les différents descripteurs associés à la méthode SGLDM

Une image 8-bit en niveau de gris peut être considérée comme une matrice de pixels dont chacun d'eux à un niveau de gris i donné. Cette matrice a une dimension $L_x \times L_y$ (lignes x colonnes). Le nombre de valeurs de niveaux de gris possible est N_g et vaut 256 pour une image 8-bit. Un pixel peut alors être défini par ses coordonnées (k,l) sur l'image et son niveau de gris i :

$$(k,l,i) \rightarrow 1 \leq k \leq L_x, 1 \leq l \leq L_y, 0 \leq i \leq N_g - 1$$

La méthode SGLDM va donc, pour un opérateur de position (d, θ) avec d la distance et θ l'angle, produire une matrice de comparaison des niveaux de gris des pixels de l'image. Les valeurs i et j des pixels (k,l,i) et (m,n,j) vont être comparées et le nombre d'occurrence d'égalité est reporté dans la matrice de comparaison. Cette matrice a une dimension $N_g \times N_g$. Il est défini $P(i,j)$ l'entrée située à la $i^{\text{ème}}$ ligne et la $j^{\text{ème}}$ colonne de cette matrice et $p(i,j)$ l'entrée située à la $i^{\text{ème}}$ ligne et la $j^{\text{ème}}$ colonne pour la même matrice rapportée au nombre total d'occurrence d'égalité.

La description de cette matrice de comparaison des niveaux de gris est faite par les 15 descripteurs suivants (tels que définis par Haralick et al. (1973) et Milferstedt et al. (2008)) :

$$Energy = \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p(i,j)^2$$

$$Contrast = \sum_{k=0}^{N_g-1} k^2 \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p(i,j) \quad \text{pour } k = |i - j|$$

$$Correlation = \frac{\sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} (i,j)p(i,j) - \mu_i \mu_j}{\sigma_i \sigma_j}$$

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} (1 - \mu)^2 p(i,j)$$

$$\text{Homogeneity} = \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} \left(\frac{p(i,j)}{1 + (i+j)^2} \right)$$

$$\mu_n = \sum_{n=2}^{2N_g} \sum_{j=1}^{N_g} \left(\frac{p(i,j)}{1 + (i+j)^2} \right)$$

$$\sigma_n^2 = \sum_{n=2}^{2N_g} (n - \mu_n)^2 p_n(n) \quad \text{avec } n = i + j$$

$$TE_n = - \sum_{n=2}^{2N_g} p_n(n) \log_{10} p_n(n) \quad \text{avec } TE \text{ signifiant "Textural Entropy"}$$

$$TE_{i,j} = - \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p(i,j) \log_{10} p(i,j)$$

$$\sigma_k^2 = \sum_{k=0}^{N_g-1} (k - \mu_k)^2 p_k(k) \quad \text{avec } k = |i - j|$$

$$TE_k = - \sum_{k=0}^{N_g-1} p_k(k) \log_{10} p_k(k)$$

$$f_{12} = \frac{TE_{i,j} - TE_{HXY1}}{\max(TE_i, TE_j)}$$

$$f_{13} = (1 - \exp[-2 (TE_{HXY2} - TE_{i,j})])^{1/2}$$

$$\text{Inertia} = \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} (i - j)^2 p(i,j)$$

$$P_{max} = \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p(i,j)_{max}$$

Avec :

$$\mu_i = \sum_{i=1}^{N_g} i p_i(i)$$

$$\mu_j = \sum_{j=1}^{N_g} j p_j(j)$$

$$\sigma_i^2 = \sum_{i=1}^{N_g} (i - \mu_i) p_i(i)$$

$$\sigma_j^2 = \sum_{j=1}^{N_g} (j - \mu_j) p_j(j)$$

$$TE_i = - \sum_{i=1}^{N_g} p_i(i) \log_{10} p_i(i)$$

$$TE_j = - \sum_{j=1}^{N_g} p_j(j) \log_{10} p_j(j)$$

$$TE_{HXY1} = - \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p(i,j) \log_{10}(p_i(i)p_j(j))$$

$$TE_{HXY2} = - \sum_{i=1}^{N_g} \sum_{j=1}^{N_g} p_i(i)p_j(j) \log_{10}(p_i(i)p_j(j))$$

Annexe 4 : Clichés de stéréomicroscopie obtenus lors des différents travaux

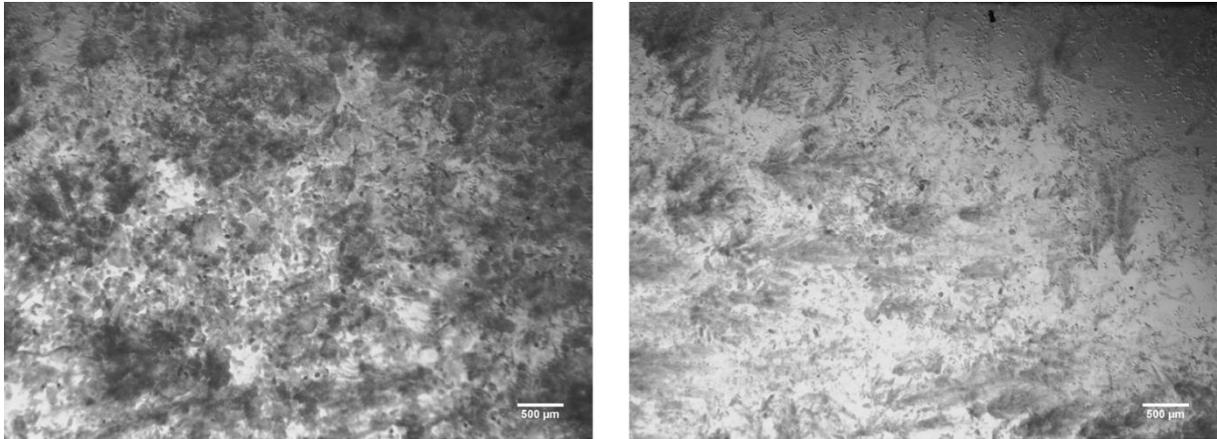


Figure A-4 : Images acquises par stéréomicroscopie lors des travaux sur les biofilms matures et la prédation. Il s'agit de biofilm de 30 jours exposé à des conditions hydrodynamiques stables (à gauche) ou variables (à droite).

Sur la Figure A-4, nous retrouvons les caractéristiques évoquées dans le texte. Le biofilm placé dans les conditions hydrodynamiques stables est beaucoup plus homogène et dépourvu de streamers. Le second biofilm, soumis à des conditions hydrodynamiques variables, présente une structure plus hétérogène avec des architectures duveteuses et filamenteuses, les streamers.

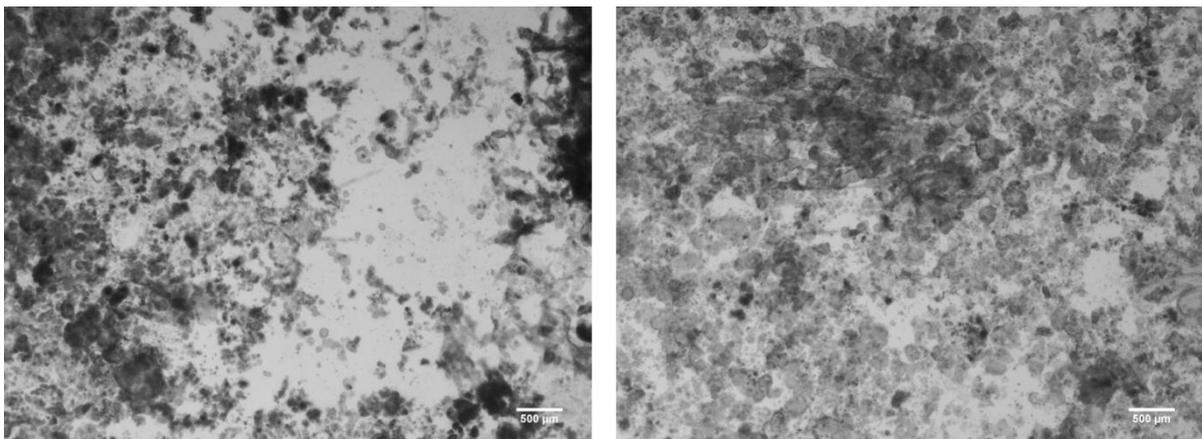


Figure A-5 : Images acquises par stéréomicroscopie lors des travaux sur l'histoire des biofilms. Il s'agit de biofilm de 20 jours exposé à des conditions hydrodynamiques stables (à gauche) ou variables (à droite).

La Figure A-5 présente les clichés typiques utilisés pour l'analyse SGLDM durant nos travaux sur le développement du biofilm. Il s'agit des mêmes paramètres d'acquisition pour

les travaux de prédation, le traitement et la finalité est néanmoins différentes. Dans le cas de ces images, la méthode SGLDM suivie d'une ACP sur les descripteurs des matrices obtenues permet de traduire les différences morphologiques des biofilms en distances euclidiennes.

La Figure A-6 quant à elle a pour ambition d'illustrer quelques observations typiques des biofilms obtenus au cours de ces travaux. Tout d'abord, nous avons noté la présence de microorganismes eucaryotes, en plus ou moins grande quantité selon les expériences et les conditions hydrodynamiques (A, B, C). La photographie A présente des protozoaires ciliés sessiles, fréquemment retrouvés en bouquet dans les biofilms de plusieurs jours. Les clichés B et C témoignent d'une prédation effectuée par des nématodes et des rotifères avec des densités de populations parfois impressionnantes. L'image D représente la trace d'un détachement par sloughing récent. Au centre de l'image, le film microbiologique dont un lambeau est encore visible s'est détaché laissant un trou évident dans le biofilm. Enfin, l'image E représente un streamer devant mesurer de 1 à 2 mm voire plus pour les filaments les plus fins et longs.

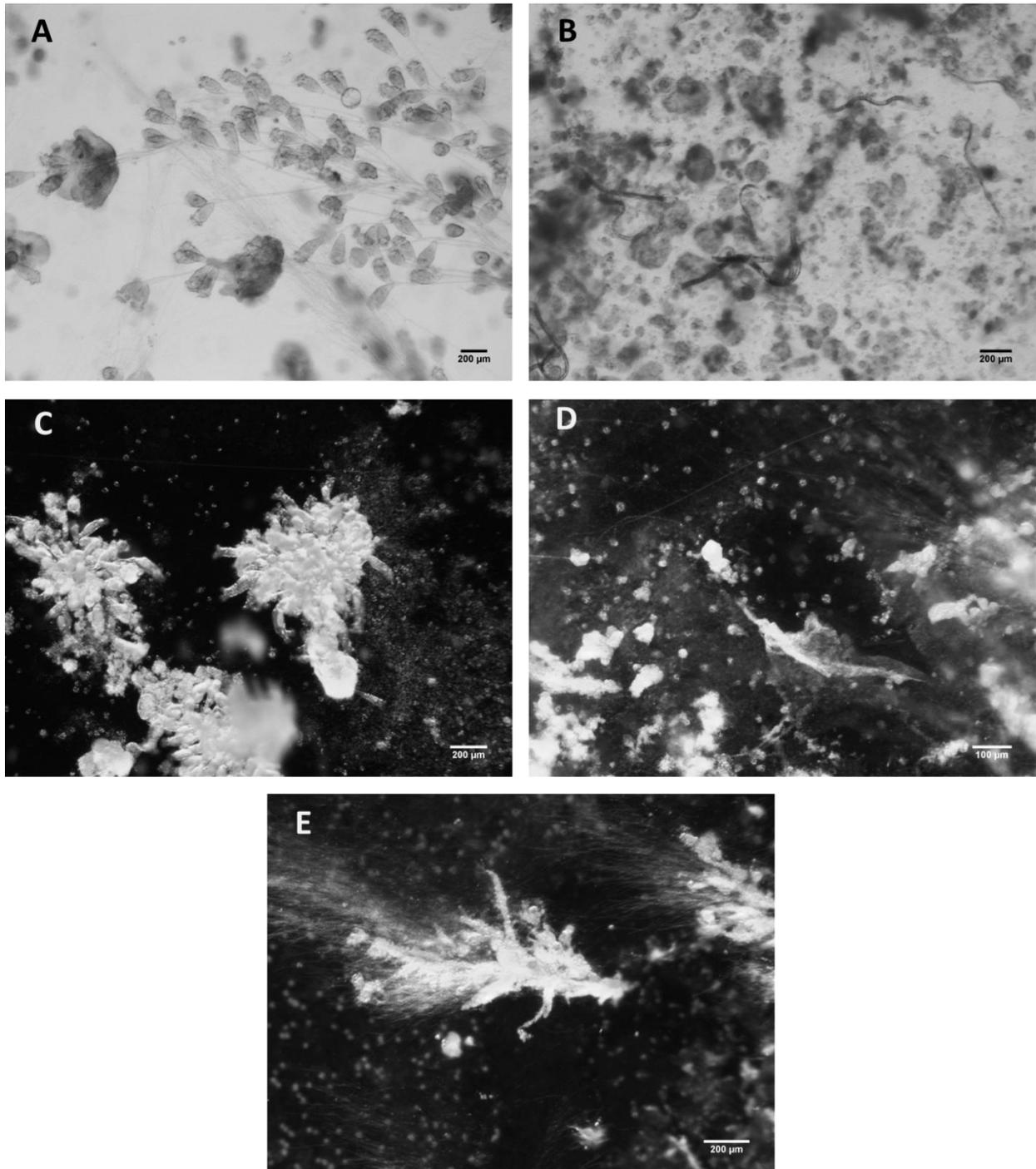
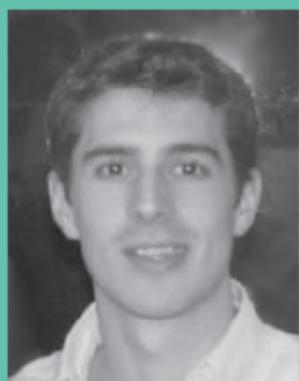


Figure A-6 : Quelques photographies de stéréomicroscopie (en fond clair pour A et B ou fond noir pour C,D,E) représentatives des biofilms obtenus au cours des différents travaux. A) Ciliés sessiles se nourrissant de bactéries (prédation). B) Présence en abondance de nématodes au sein du biofilm. C) Rotifères encerclant une microcolonie. D) Vestige d'un décrochement de type sloughing. E) Présence de streamers de taille millimétrique.



MORPHOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL STRUCTURING OF MULTI-SPECIES BIOFILMS: FROM ADHESION TO MATURE BIOFILMS

Biofilms are a biological mode of life widely spread in both natural and engineered environments. In the last case, whether the biofilm is beneficial or detrimental for the process under consideration, both **morphology** and **microbial community** of the biofilm determine its impact. The objective of this thesis is to deepen our knowledge of biofilm structuring and, as a further goal, optimize a given process. Turbulent flows and multi-species consortia were used in order to better mimic industrial conditions. The first part of the project focused on the impact of shear stress on microbial **adhesion**. Results have demonstrated a gradual shift in bacterial communities with shear and a change in the spatial distribution of adhered microorganisms. Secondly, the work dealt with biofilm development. A memory effect, defined as the conservation of initial morphological and microbiological features despite a change in the environmental conditions, has been observed. Finally, a method for quantification of moving predators in mature biofilms has been developed. These **predators** actively shape the biofilm and their quantification is valuable, especially for **wastewater treatment**.

DÉFENDU LE 1^{ER} DÉCEMBRE 2014 AT :



WITH THE FINANCIAL SUPPORT OF :



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Unité de recherche (UR0050) - Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement

Avenue des Etangs
F 11100 - Narbonne
France

Tél. : +33 4 68 42 51 51
Courriel: lbe-contact@supagro.inra.fr
www.montpellier.inra.fr/narbonne

