

Chapitre 5 : Effet de la géométrie de la surface d'attache sur la croissance des biofilms

5.1 Introduction

La croissance des biofilms se produit majoritairement à partir des interfaces solide/liquide. La microfluidique est de plus en plus utilisée pour l'étude *in situ* des biofilms [55]. Cette technique est un outil efficace pour contrôler leur environnement chimique et physique. Dans un microcanal, la proportion entre l'aire des surfaces par rapport au volume est très grande en comparaison avec des canaux de plus grandes dimensions. Cet effet a un impact sur la croissance des biofilms. La Figure 5-1 représente la section transversale d'un microcanal d'une largeur l et hauteur h . Deux portions de cercles sont représentées afin de démontrer la différence de rapport aire/volume entre le centre et les coins d'un microcanal. Pour une partie de biofilm placée dans un coin, la surface d'un biofilm est moins exposée à l'écoulement qu'au milieu. L'écoulement laminaire dans le microcanal provoque la formation de forces de cisaillement qui peuvent être importantes à proximité des murs [59]. À la jonction de deux murs, une bactérie ou un biofilm sera affecté par l'effet combiné des deux surfaces. En plus d'avoir un impact sur les forces de cisaillement, la vitesse moyenne locale pour une particule à la jonction des deux murs sera plus faible que celle pour une particule au milieu du mur du fond du microcanal (identifiées respectivement par a et b à la Figure 5-1).

La présence d'une vitesse locale et de forces de cisaillement différentes peut avoir plusieurs effets sur la croissance des biofilms. Pour cette raison, il est important de bien comprendre leur impact pour apprendre davantage sur les biofilms. Il est couramment observé dans la littérature lors des étapes de maturation des biofilms que la croissance se fait à partir des murs de côtés du microcanal. Ce phénomène est observé pour plusieurs géométries de microcanaux, tel que les canaux droits et

en serpentin. Le type de canal, ses dimensions et le débit ont une influence sur la forme du biofilm et la vitesse à laquelle il se développe [59, 114]. Il semble que les forces de cisaillement puissent être impliquées dans ce phénomène. L'influence de deux murs dans les coins a un impact à la fois sur la taille de la surface sur laquelle les bactéries peuvent s'attacher et sur les forces de cisaillement. Il est aussi possible que la présence combinée d'une surface de PDMS (mur de côté) et de verre (fond du canal) ait un effet. La première partie de ce chapitre se concentre globalement sur la croissance préférentielle à partir des murs de côté pour un canal rectangulaire. L'effet de la hauteur du microcanal, et par extension du ratio d'aspect du microcanal, sera évalué. La seconde partie de ce chapitre porte plus spécifiquement sur la croissance du biofilm dans le coin du microcanal afin de mieux comprendre l'impact local des deux murs.

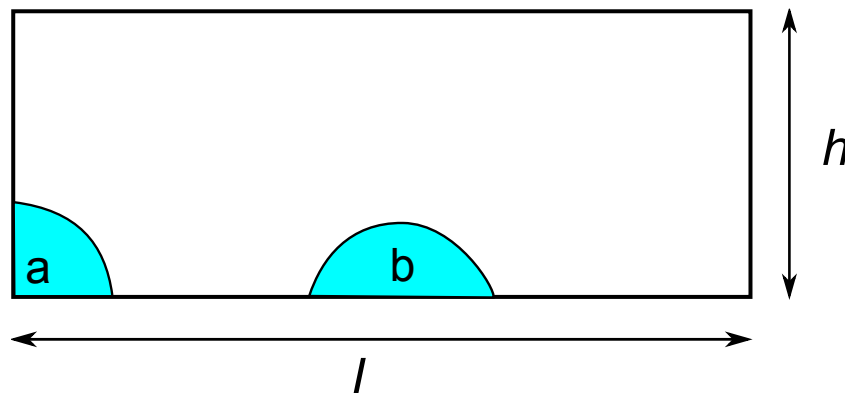


Figure 5-1 : Schéma représentant la section transversale d'un microcanal avec une portion de biofilm au coin (a) et au milieu d'un canal d'une largeur l et hauteur h .

5.2 Effet de la hauteur du microcanal sur la croissance à partir des côtés étudié par microscopie en champ clair

Les forces de cisaillement ainsi que la vitesse du flux sont déterminantes pour les différentes étapes de croissance. Afin de conserver les forces de cisaillement constantes, deux microcanaux de hauteurs différentes ont été utilisés et les débits ont été ajustés. Les forces de cisaillement ont un impact important sur la croissance des biofilms puisqu'ils en provoquent l'érosion [8]. Les microcanaux ont la même longueur et la même largeur, mais ils ont une hauteur différente. Ils mesurent respectivement 88 et 145 μm de haut et leur largeur est de 2000 μm . L'équation 3-5 a été utilisée afin de calculer le débit pour lequel les forces de cisaillement sont identiques et l'équation 3-4 permet de calculer la vitesse moyenne dans ces deux canaux. Le Tableau 5-1 présente les vitesses moyennes et les forces de cisaillement moyennes pour les deux dispositifs ainsi que les débits appliqués. Afin que les forces de cisaillement moyennes soient identiques dans les deux microcanaux, un débit 2,7 fois plus élevé pour le dispositif d'une hauteur de 145 μm a été utilisé. Dans cette situation, la vitesse moyenne est 1,65 fois plus élevée pour ce canal.

Tableau 5-1 : Vitesse moyenne (v_m), force de cisaillement moyenne (τ_m) pour les canaux deux dispositifs utilisés et les débits du milieu de culture.

Hauteur (μm)	Débit (mL/h)	v_m (mm/s)	τ_m (N/m ²)
88	0,35	33,14	2,16
145	0,95	54,6	2,16

Les mesures de microscopie en champ clair sont optimisées afin de faire plusieurs mesures sur différents canaux en parallèle. Ainsi pour chaque expérience, il est possible de faire des mesures sur quatre microcanaux en même temps. Cela permet de faire simultanément deux répliques pour chaque hauteur de microcanal utilisé. Les mesures en parallèle comportent deux avantages importants. Le premier est qu'en faisant les mesures en parallèle, il est possible de s'assurer que les mesures soient faites exactement dans les mêmes conditions puisqu'on peut utiliser la même solution de bactéries pour l'inoculation. Ce faisant, on élimine ce facteur d'incertitude dans les mesures. Le second est que cela permet de réduire le temps total pour faire les différents répliques et d'optimiser l'utilisation du microscope. Tel que décrit dans la section expérimentale (Chapitre 3), l'acquisition des micrographies est automatisée et une platine motorisée permet le positionnement précis de chaque microcanal sous le microscope. De cette manière, chaque micrographie pour un même canal est prise au même endroit que la précédente facilitant ainsi le traitement des données. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de procéder à l'alignement des micrographies lors du traitement de données. Afin de pouvoir faire des mesures quantitatives et de convertir les micrographies pour déterminer la densité optique pour chaque pixel, il faut procéder à la soustraction d'une image de référence.

La Figure 5-2 montre les images de densité optique d'un biofilm pendant la croissance dans un microcanal d'une hauteur de 88 μm . Pour ces mesures, les biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07 ont été inoculés de manière directe tel que décrit dans la section expérimentale. Au début de l'expérience aucun biofilm n'est observé, puis après 45 heures, une faible biomasse commence à apparaître sur les deux côtés du microcanal. Il y a augmentation rapide du contraste à cet endroit et propagation vers le centre du canal. Après 70 heures, le biofilm est uniforme et a une densité optique élevée sur les côtés du microcanal. Il est hétérogène et de faible biomasse au centre du microcanal. Les microcolonies qui y sont observées sont indépendantes les unes des autres et leur taille est de l'ordre de la dizaine de microns. Ces résultats correspondent bien aux structures observées pour les biofilms dans un milieu AB (voir chapitre 6) et dans un milieu de culture minimal

[104]. Deux lignes noires sont observées là où se trouvent les murs du microcanal. À cet endroit, la présence de ces structures élevées provoque la formation d'une ombre qui masque partiellement les bords du microcanal. Sur une région d'environ 20 μm à partir du bord du microcanal, cette ombre a un impact sur les mesures de densité optique et les rend plus imprécises ce qui pourrait affecter les résultats et conclusion qui en sont tirés. Toutes les données prises à partir de ces images sont faites à partir de 40 μm du mur du microcanal afin d'éviter cet effet. De plus, les micrographies en microscopie en champ clair représentent la densité optique dans toute la hauteur du microcanal. Les biofilms doivent être attachés à une surface pour croître. Les résultats obtenus proviennent donc à la fois des parties de biofilm attachées au mur du fond et du mur du haut du microcanal.

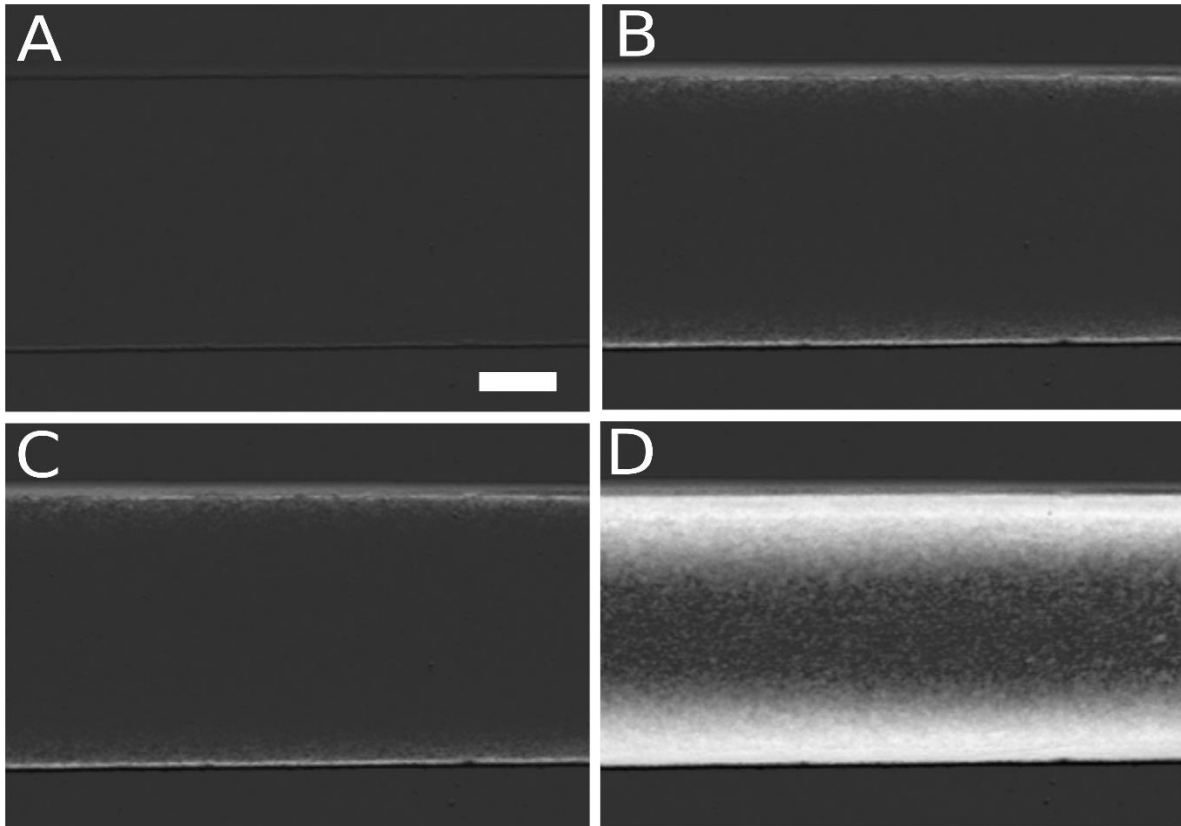


Figure 5-2 : Images de densité optique obtenues à partir de mesures en microscopie en champ clair d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 après croissance dans un microcanal d'une profondeur de 88 μm pendant A) 15, B) 45, C) 55 et D) 70 heures. Un milieu de culture AB modifié est utilisé et l'écoulement se fait de la gauche vers la droite dans le microcanal. La barre d'échelle en A) mesure 500 μm et est représentative pour toutes les images.

Afin de mieux suivre la croissance, la densité optique a été mesurée à chaque intervalle de 20 μm dans la section transversale du microcanal. La Figure 5-3 montre les résultats pour le microcanal d'une hauteur de 88 μm à différentes distances du mur. À proximité du mur (40 μm), la densité optique est constante et près de zéro jusqu'à environ 40 heures, ce qui correspond à la période de latence du biofilm. Entre 40 et 60 heures, la densité optique augmente jusqu'à 2,75. Cette partie correspond à la période de croissance rapide. Par la suite, la densité optique demeure élevée et relativement constante jusqu'à la fin de la période d'observation. À des distances plus grandes du mur de côté, la période de latence

est plus longue. Par exemple, à une distance de 200 μm , elle est d'environ 45 heures. La pente de la région de croissance rapide est aussi plus faible. Au centre du microcanal la période de latence est de 60 heures et la pente de la phase de croissance rapide est très faible. Pour les distances intermédiaires, la transition se fait graduellement.

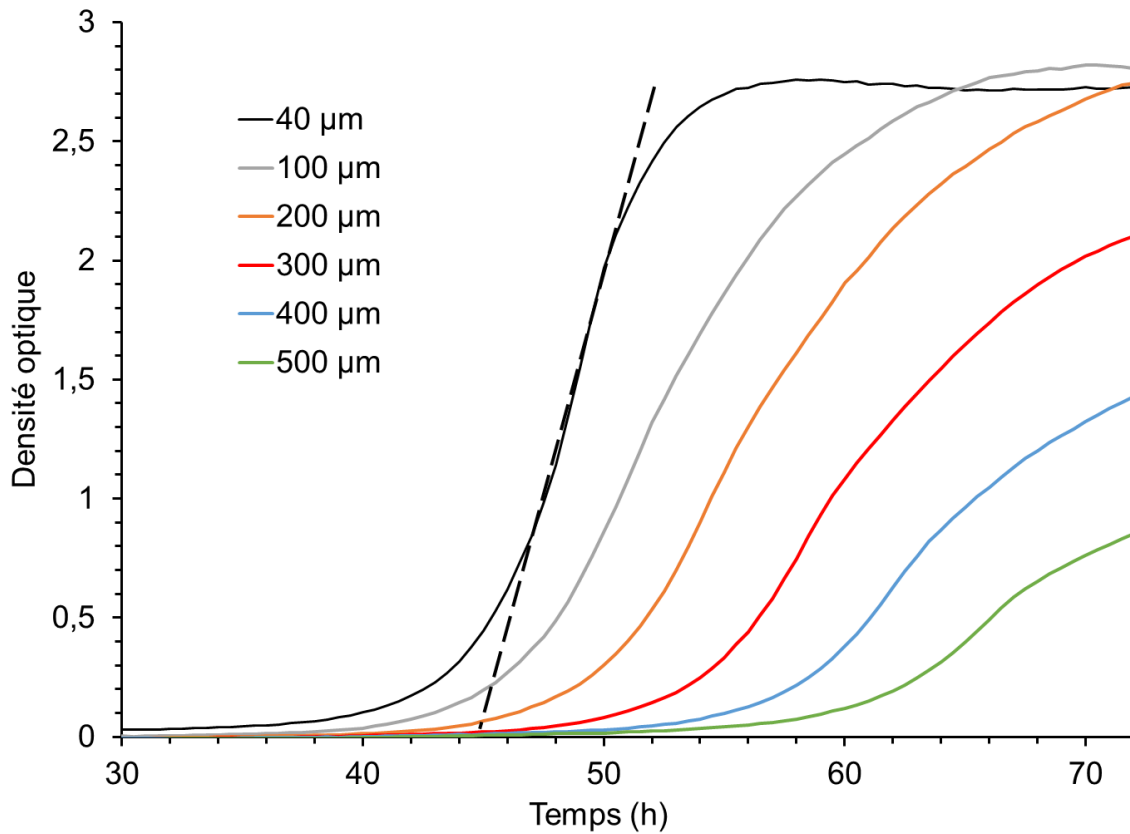


Figure 5-3 : Courbe de croissance d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 à 40, 100, 200, 300, 400 et 500 μm du mur du microcanal d'une hauteur de 88 μm (respectivement en noir, gris, orange, rouge, bleu et vert). Les courbes de croissance sont générées à partir de la densité optique obtenue après le traitement des images en microscopie en champ clair. La ligne pointillée pour la courbe noire montre la région utilisée pour les mesures de taux de croissance dans la phase de croissance rapide du biofilm.

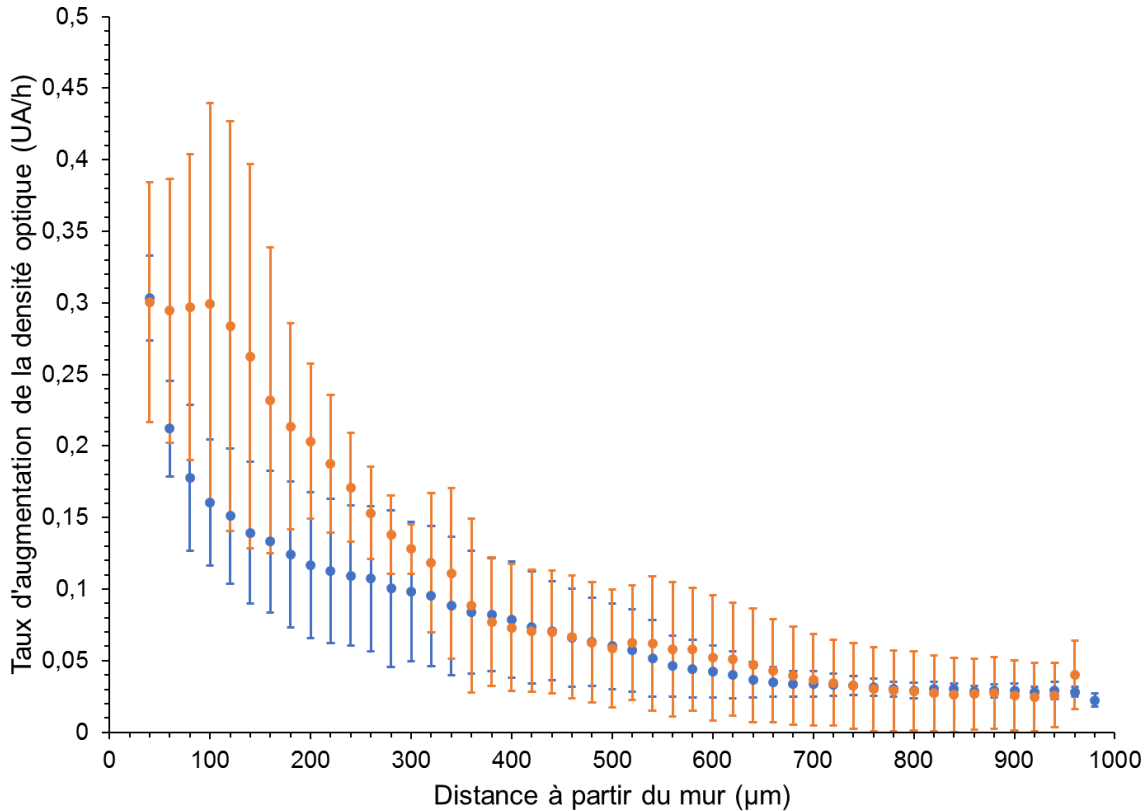


Figure 5-4 : Taux d'augmentation de la densité optique dans la phase de croissance rapide du biofilm pour différentes distances à partir du mur du microcanal. Les données pour des canaux de 88 et 145 µm sont représentées respectivement en bleu et orange. Les résultats pour les deux mesures correspondent à la moyenne de trois réplicas et les barres d'erreur à leur écart type.

Le taux de croissance des biofilms a été mesuré dans la phase de croissance rapide. Le biofilm au centre n'atteint pas de phase stationnaire, donc il n'est possible de mesurer le temps de doublement. Pour ce faire, une droite a été ajustée sur cette section de la courbe de densité optique en fonction du temps tel qu'illustré par la ligne pointillée à la Figure 5-3. Cette opération fut répétée pour chaque courbe de densité optique pour les deux dispositifs. Les taux d'augmentation de la densité optique dans la phase de croissance rapide pour les deux dispositifs se trouvent à la Figure 5-4. Ce graphique a été généré en calculant la moyenne de trois différentes séries de données acquises dans les mêmes conditions pour les deux dispositifs et

les barres d'erreur correspondent à l'écart type sur ces mesures. Dans les deux cas, la croissance est plus rapide à proximité des murs. La zone où la croissance est la plus rapide est aussi plus large pour le canal de hauteur plus grande. À partir d'environ 360 μm du mur, le taux d'augmentation de la densité optique est le même dans les deux cas. L'écart type sur les mesures est aussi plus élevé à proximité du mur, ce qui indique une plus grande variabilité dans le taux de croissance à cet endroit comparativement à celui mesuré au centre du microcanal. Dans le cadre de ces expériences, le débit a été ajusté afin que les forces de cisaillement soient constantes. D'après l'équation 2-4, lorsque l'on augmente la hauteur du microcanal de 1,64 fois, comme dans le cas présent, il faut augmenter le débit d'un facteur 2,72 pour compenser.

Il y a un gradient de vitesse entre les murs et le centre d'un milieu d'un microcanal. Cela provoque un cisaillement entre les différentes couches de l'écoulement laminaire et entre l'écoulement et une surface qui s'y trouve. Les forces de cisaillement sont plus importantes sur les murs et diminuent graduellement lorsqu'on se rapproche du centre du microcanal (Figure 2-1). Un cas particulier est observé pour les forces de cisaillement directement au-dessus d'un mur. Elles sont maximales au milieu de ce mur et diminuent jusqu'à être nulles lorsque les deux murs se rejoignent, donc au coin [8]. Cela peut donc favoriser la croissance initiale dans le coin puisque c'est à cet endroit que les forces de cisaillement sont les plus faibles dans le canal. Pour ce qui est du taux de croissance plus élevé pour le canal plus haut, cela pourrait s'expliquer par une quantité de nutriments plus importante. En effet, à un débit plus élevé, la solution nutritive (milieu de culture) est renouvelée plus rapidement et le flux moléculaire dans le biofilm est plus grand. Par conséquent, il y a plus de nutriments disponibles pour les bactéries et le biofilm. De plus, l'élimination des déchets est favorisée. D'un autre côté, puisque les forces de cisaillement sont les mêmes, l'érosion du biofilm devrait être similaire pour les deux microcanaux [8]. C'est principalement cette force qui peut provoquer le détachement des bactéries ou de parties du biofilm dans des conditions d'écoulement laminaire. Il a déjà été rapporté que pour des microcanaux de mêmes dimensions, une

augmentation du débit diminue significativement le taux de croissance et peut même empêcher la formation d'un biofilm stable. Un débit trop important pourrait nuire à, voire même interrompre, la communication entre des cellules dans la direction opposée à l'écoulement [115]. Il a aussi été observé dans d'autres travaux que l'apport de nutriments est un facteur plus déterminant que les forces de cisaillement pour la croissance des biofilms [59].

Si on considère le biofilm comme étant complètement homogène et lisse, une augmentation du débit, lorsqu'il est déjà suffisamment élevé, devrait avoir un impact relativement faible sur l'apport de nutriments. Le mélange dans un écoulement laminaire se fait seulement par diffusion contrairement aux écoulements turbulents où il y a convection. Le facteur limitant est donc la vitesse de diffusion à travers le biofilm qui est lente et dépend de sa forme, de sa densité et de sa composition [59]. Il est important de considérer que les biofilms ont tendance à former différentes structures favorisant la circulation de liquide au sein du biofilm afin de contrer la barrière de diffusion et éviter la formation de gradients de concentration trop élevés [9]. Par exemple, les structures en forme de champignon ont une base plus étroite que la partie du haut ce qui favorise l'écoulement entre les différentes parties du biofilm et rend les nutriments plus disponibles pour les bactéries qui sont à l'intérieur [116].

Les micrographies du biofilm à la Figure 5-2 permettent de voir qu'il forme des petites structures (de taille autour de 10 μm) au centre et des structures plus hautes et homogènes sur les côtés. La microscopie en champ clair avec un objectif à faible magnification ne permet pas de les caractériser précisément puisque la résolution et le contraste sont trop faibles. Puisque cette technique est basée sur la transmission de la lumière, il n'est pas possible la base du biofilm des parties supérieures. La microscopie confocale est un bon moyen pour mieux comprendre la croissance du biofilm à partir des côtés.

5.3 Accumulation préférentielle dans les coins

Dans la section précédente, il a été noté que les biofilms se développent plus rapidement sur les côtés du microcanal qu'au centre. La forme du microcanal, plus particulièrement la hauteur, a aussi un impact sur les résultats observés. Les biofilms sont connus pour être capable de croître dans des formes complexes afin de s'adapter à leur environnement hydrodynamique. La microscopie en champ clair ne permet pas d'avoir le contraste et la résolution nécessaires pour bien décrire ces phénomènes. La microscopie confocale à balayage laser a été utilisée puisque la résolution est plus grande et le contraste est plus élevé. La microscopie en champ clair permet de mesurer la densité optique à différents endroits du plan XY du microcanal, mais ne donne aucune information sur la distribution dans l'axe Z. La densité optique mesurée résulte en effet de l'absorption et de la diffusion de toutes les sections de biofilm dans cet axe. La microscopie confocale permet de résoudre les différents plans dans cet axe en plus d'augmenter la résolution dans le plan XY. Cette technique permettra donc d'étudier plus spécifiquement les effets se produisant directement dans les coins. La profondeur totale analysée pour ces expériences est de 13 μm et la résolution est de 0,37 μm . La résolution en Z permettra d'aller chercher de l'information directement au fond du microcanal et de voir s'il y a des différences entre les couches du biofilm. Les mesures prises à différents temps pendant la croissance seront utiles pour voir l'évolution du biofilm.

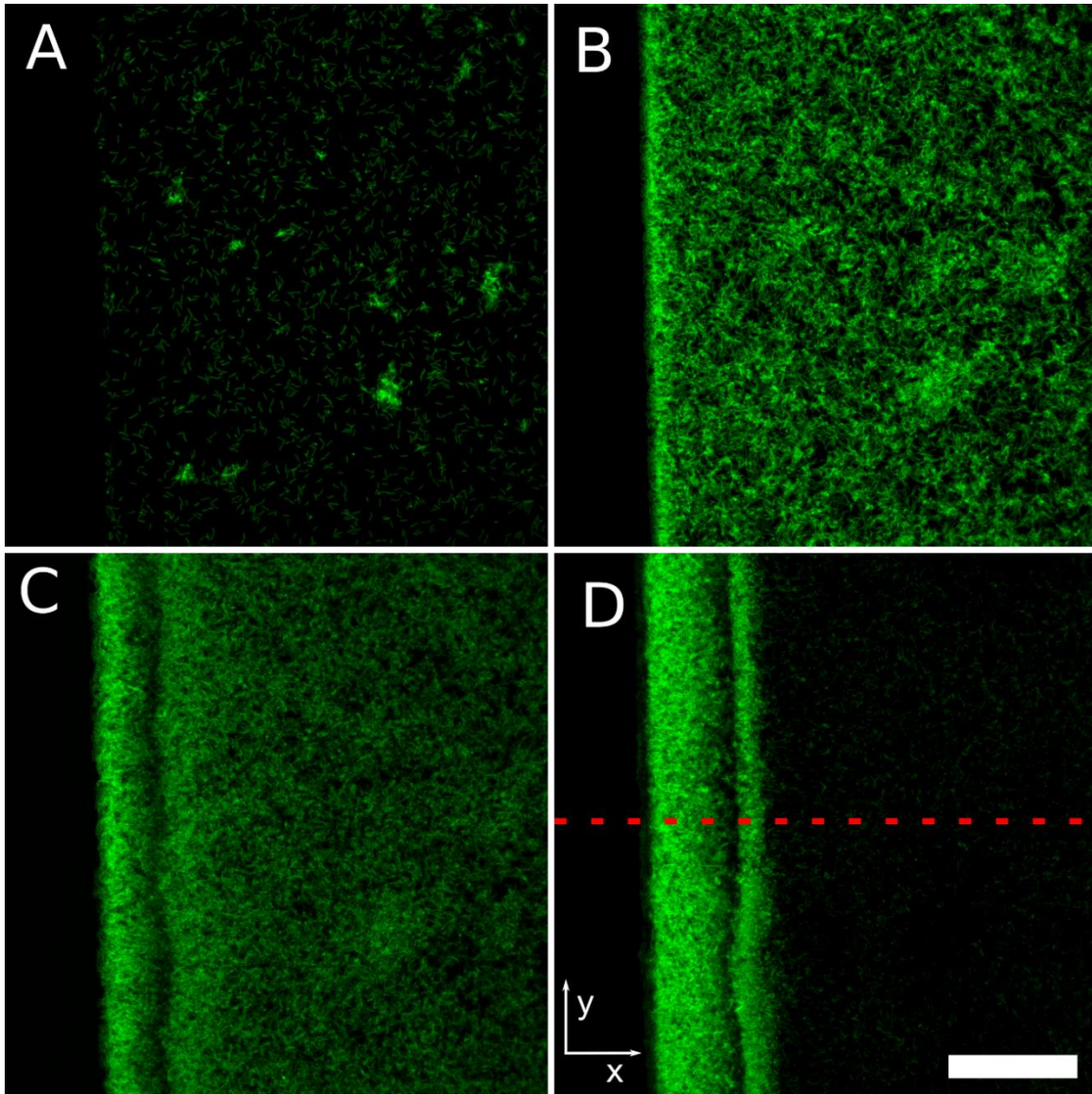


Figure 5-5 : Projection dans l'axe Z d'un empilement confocal après 1, 6, 16 et 50 heures de croissance d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 dans un milieu de culture AB modifié (A, B, C et D respectivement). Le microcanal utilisé mesure 305 x 2000 μm . Les mesures de microscopie confocale sont réalisées sur une profondeur de 13 μm . Les axes X et Y sont identifiés en D et correspondent respectivement à la largeur du canal et la longueur. L'écoulement du milieu de culture dans le microcanal se fait du bas vers le haut de l'image. La ligne pointillée en D montre la section qui a été utilisée pour générer la tranche dans le plan XT à la Figure 5-8. La barre d'échelle en D mesure 50 μm et est représentative pour les autres images.

La Figure 5-5 présente la variation de l'intensité selon l'axe X (section transversale du microcanal) pour différents points dans le temps. Cette figure a été générée en utilisant des projections dans l'axe Z de l'empilement confocal d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 produit dans un microcanal. Lors des expériences en microscopie confocale, certaines structures ont été observées sur les côtés des microcanaux. La présence plus importante de biofilm sur le côté du microcanal est un des effets les plus marqués. Pour le reste du biofilm, on observe une épaisseur plus faible, mais plus uniforme. Dans les premières 12 heures, la croissance est relativement homogène au travers du canal avec un peu plus de biomasse directement à côté du mur latéral. Tel qu'observé à la Figure 5-5 A, une heure après l'inoculation, des bactéries plutôt isolées et répandues uniformément se retrouvent sur la surface du canal. Il y a aussi présence de quelques petites colonies. En général, il y a beaucoup d'espace entre les bactéries. Six heures après l'inoculation, beaucoup plus de bactéries se retrouvent au fond du microcanal (Figure 5-5 B). Il y a aussi une densification et plus de colonies sont observées. La répartition des bactéries est uniforme, bien qu'il y ait quelques zones plus denses. À partir de 13 heures, l'accumulation de biofilm devient plus prononcée sur le côté et on commence à voir une zone où il y a une diminution marquée de la biomasse qui s'observe par une ligne à environ 30 μm du coin du microcanal. Cela peut être vu de manière plus prononcée 16 heures après l'inoculation (Figure 5-5 C). À partir de ce moment, ce comportement continue pendant toute la durée de l'expérience. La Figure 5-5 D montre le même biofilm après 50 heures. Le contraste entre le biofilm au coin et dans le reste du canal est plus marqué. La ligne où la biomasse est faible est plus prononcée et est observée à une distance plus grande du mur de côté. La position de la ligne s'éloigne progressivement du mur pendant la croissance et devient plus perceptible. Les observations faites sur le biofilm présenté à la Figure 5-5 ont aussi été faites sur d'autres biofilms pendant des expériences différentes réalisées dans les mêmes conditions. La formation d'une zone ayant une biomasse faible est particulièrement intéressante. Cette ligne n'est observée qu'au fond du

microcanal. Lorsque l'on s'éloigne de la surface de la lamelle de verre, la largeur de cette zone vide rétrécit.

La vitesse de croissance du biofilm a été évaluée par microscopie confocale à différentes distances du mur de côté du microcanal (Figure 5-6). Pour ces mesures, l'intensité moyenne sur la projection dans l'axe Z (Figure 5-5) sur un intervalle de 5 μm à chaque 25 μm du mur de côté a été calculée. Pour toute la région observée, le maximum d'intensité observé est à 8 heures et les valeurs d'intensité moyenne sont comparables. Cela indique que le biofilm est plutôt homogène au début de sa croissance. La biomasse diminue ensuite ce qui s'observe par une diminution de l'intensité entre 8 et 10 heures. Par la suite, à proximité du mur de côté (25 μm), il y a une augmentation de l'intensité sur une courte période de 10 à 12 heures, puis de 32 à 42 heures. Dans les deux cas, ces augmentations sont suivies d'une diminution d'intensité. À 50 μm du mur de côté il y a une augmentation lente de l'intensité entre 10 et 24 heures qui est suivie par une diminution. La situation est similaire pour les positions plus éloignées à l'exception que l'augmentation de l'intensité est moins prononcée. Cela permet d'affirmer que lorsqu'on s'éloigne du mur de côté, après une augmentation initiale, la biomasse reste relativement constante avant de diminuer de manière importante.

Les mesures en transmission ont montré une augmentation constante de la biomasse (Figure 5-2). La différence entre les deux résultats en microscopie en champ clair et en microscopie confocale sont liés aux champs de vision observés des deux techniques. En microscopie en champ clair, les mesures sont faites en transmission et représentent donc la biomasse dans toute la hauteur du microcanal. En microscopie confocale, les mesures ont été faites sur une profondeur de 13 μm . Elles sont donc représentatives du biofilm seulement au fond du canal. L'augmentation initiale de la biomasse suivie d'une diminution serait donc attribuable à une restructuration du biofilm. Cet effet avait précédemment été observée et caractérisé par microscopie confocale et spectroscopie infrarouge en réflexion totale atténuée au Chapitre 4.

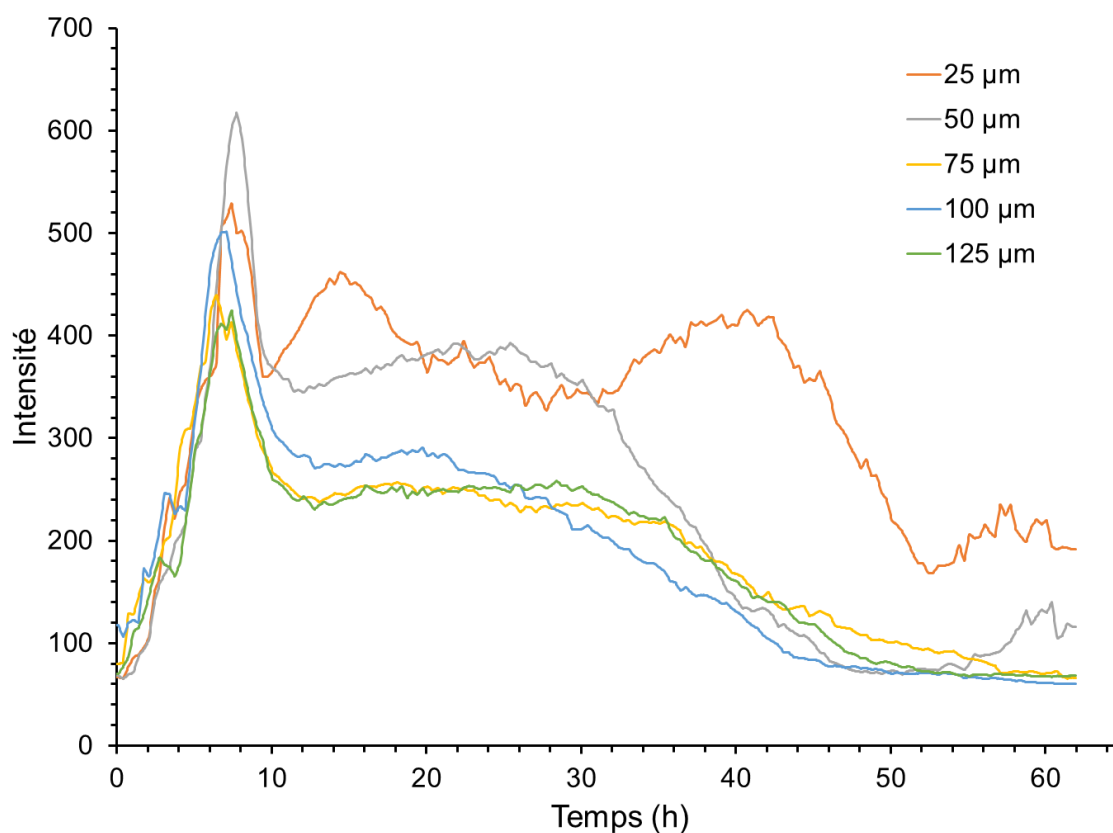


Figure 5-6 : Intensité de la fluorescence pendant la croissance à 25, 50, 75, 100 et 125 μm du coin du microcanal (orange, gris, jaune, bleu et vert, respectivement). Chaque mesure est faite sur une fenêtre de 5 μm de largeur.

Les projections dans l'axe Z (Figure 5-5) ont montré qu'il y a une ligne où l'intensité est plus faible à proximité du mur de côté du canal. Afin de mieux comprendre la forme de cette zone de faible biomasse dans le biofilm, des tranches dans le plan XZ ont été faites à partir des empilements confocaux pour différents temps pendant la croissance (Figure 5-7). Tel qu'il avait été observé à partir des projections dans l'axe Z à la Figure 5-5, au début de la croissance (Figure 5-7 A et B ; 1 et 6 heures), on voit d'abord quelques bactéries au fond du microcanal puis on voit un biofilm plutôt homogène qui recouvre toute la zone d'observation. Par la suite, on voit apparaître une zone complètement noire. Elle était précédemment observée comme

une ligne à la Figure 5-5. On peut maintenant voir que c'est en fait un canal qui a comme base la lamelle de verre au fond du microcanal et qui est entouré par le biofilm. Ce canal se déplace légèrement vers le centre du dispositif et sa forme change. Plus particulièrement, ce canal devient plus large et plus profond à la fin de la croissance du biofilm.

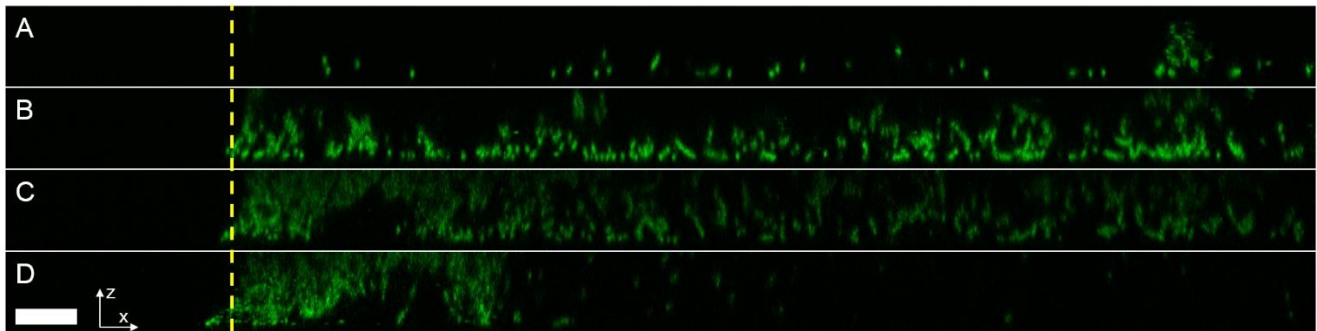


Figure 5-7 : Tranches dans le plan XZ du biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07 présenté à la Figure 5-5 à 1, 6, 16 et 50 heures de croissance (A, B, C et D, respectivement). L'axe X est selon la largeur l'axe Z est selon la hauteur du canal. Le mur du fond du microcanal se trouve en bas de chaque image et la ligne pointillée jaune marque la position du mur du côté. La barre d'échelle mesure 10 μm dans l'axe X et 2,5 μm dans l'axe Z.

Dans la littérature, les études qui ont été faites sur les canaux dans les biofilms de bactéries de la famille *Pseudomonas* n'ont pas permis de suivre l'évolution temporelle pendant le développement du biofilm [76]. Ces canaux pourraient favoriser le transport de nutriments dans la matrice extracellulaire. Chez *P. aeruginosa*, la production de rhamnolipides, connus comme étant de bons surfactants, a été démontrée comme étant importante dans le développement des canaux [117]. Les rhamnolipides nuisent à l'interaction cellule-cellule et leur présence dans les canaux permet donc d'éviter que des bactéries viennent les bloquer. La présence de canaux interconnectés a déjà été rapportée dans la littérature pour les biofilms de la bactérie *Bacillus subtilis* développés à l'interface

entre un milieu de culture gélifié dans de l'agar et l'air. Ces canaux faciliteraient le transport des liquides au travers du biofilm. Dans ce cas, il n'y aurait pas d'écoulement imposé et la force motrice du liquide proviendrait de l'évaporation à l'interface biofilm-air [9].

À la différence de ceux observés dans les travaux chez *B. subtilis*, la formation du biofilm pour nos travaux est directement faite dans le dispositif microfluidique et les mesures par microscopie confocale sont réalisées *in situ*. L'utilisation de la protéine fluorescente verte (GFP) pour voir les bactéries en microscopie confocale est aussi importante. En effet, les études sur les biofilms qui ont montré la présence de ces canaux en microscopie confocale ont été réalisées avec des marqueurs fluorescents qui doivent être ajoutés au biofilm à un moment précis. Cela a pour effet d'avoir de l'information à cet instant spécifique pendant la croissance, mais empêche de suivre le biofilm par la suite puisque les marqueurs fluorescents perturbent le système.

Un autre phénomène observé est le déplacement d'une partie de la biomasse pendant la croissance (Figure 5-8). Si on regarde le côté du biofilm qui est vers le centre du microcanal, on voit que les bactéries sont statiques et des lignes verticales sont observées (Figure 5-8). Cependant, au bord du microcanal, ces structures se déplacent légèrement vers le canal interne, tel que décrit à la Figure 5-5 et à la Figure 5-7. Cela se traduit par des lignes déviant vers la droite à la Figure 5-8. Lorsque ces images sont regardées en tant que vidéo intermittente, cela se voit par un mouvement des bactéries au sein du biofilm. Elles se déplacent alors constamment vers le centre canal interne pendant la croissance. Ce comportement pourrait être dû à une croissance plus rapide des bactéries sur les côtés du dispositif et par un apport de nutriments plus grand à proximité du canal interne au biofilm. Ainsi, lors de la formation du biofilm, une partie des bactéries et de la matrice extracellulaire pourrait être poussée vers le centre du microcanal par les celles formées ultérieurement.

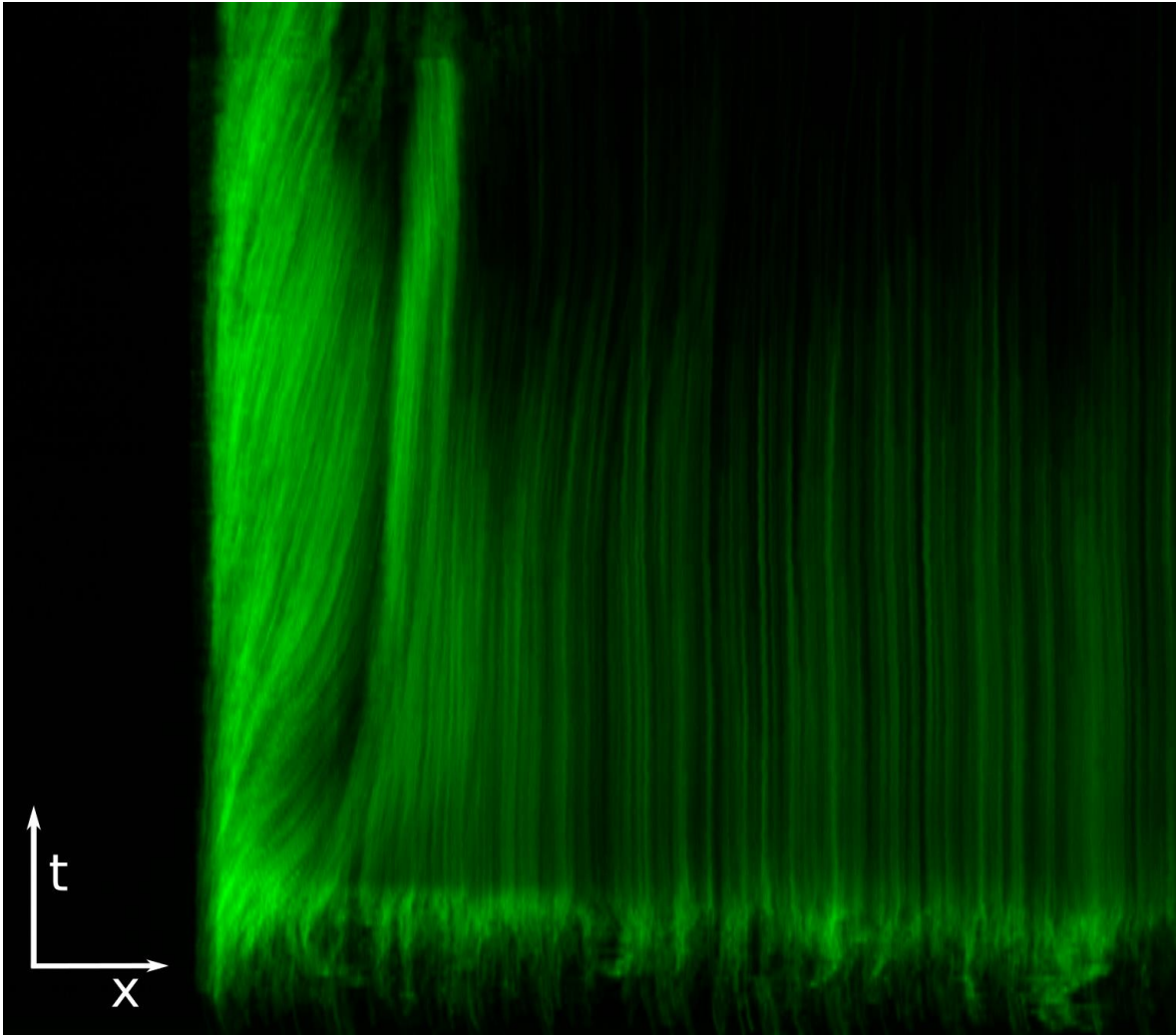


Figure 5-8 : Tranche dans le plan Xt de la projection dans l'axe Z de l'empilement confocal d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* CT07. La tranche dans le plan Xt a été faite selon la ligne pointillée rouge à la Figure 5-5. L'axe X correspond à la section transversale. La barre d'échelle en X mesure 20 μm et celle en t correspond à 10 heures.

5.4 Conclusion

La microscopie en champ clair été utilisée pour étudier la croissance à partir des côtés du microcanal des biofilms de *Pseudomonas sp.* CT07. La propension des biofilms à croître à partir des côtés ainsi que l'effet de la dimension du microcanal

ont été caractérisés par Kim *et coll.* pour des bactéries de la famille *Pseudomonas* dans la littérature [59]. Il avait été conclu que le développement des biofilms était régulé par les conditions hydrodynamiques. Les mesures faites en microscopie en champ clair nous ont permis de suivre l'évolution de la biomasse pendant la croissance et ainsi de voir le taux à laquelle elle augmente. Afin de comparer l'effet du ratio d'aspect du microcanal, deux dispositifs de différentes hauteurs ont été utilisés et les débits ont été ajustés afin d'avoir les mêmes forces de cisaillement moyennes. Pour un microcanal de plus grande hauteur, la biomasse augmente plus rapidement sur les côtés alors que dans le centre du microcanal, les taux d'augmentation de la biomasse sont comparables. Pour le microcanal de plus grande hauteur, nous avons observé que le débit plus élevé fait en sorte qu'il y a un plus grand apport de nutriments. Comme les forces de cisaillement sont plus faibles sur les côtés, l'effet de l'érosion par les forces de cisaillement a un effet plus négligeable qu'au centre. Ces deux effets combinés favorisent une croissance plus rapide sur les côtés du microcanal.

Afin de mieux comprendre l'impact du coin entre le fond du microcanal et le mur de côté sur la croissance, la microscopie confocale a été utilisée. Cette technique a permis d'obtenir des images à haute résolution dans le plan XY et avec une bonne résolution dans l'axe Z. Cela permet de voir avec plus de précision la structure du biofilm à cet endroit. Tel qu'attendu, le biofilm se développe de manière plus importante sur le côté du microcanal. Les projections dans l'axe Z des empilement confocaux (Figure 5-5) ont permis d'observer une ligne à proximité du mur de côté du microcanal qui est parallèle à ce dernier. À l'aide des sections dans le plan XZ des empilements confocaux, il a été possible de confirmer que cette ligne est en fait un canal à l'intérieur du biofilm. Ce biocanal est formé directement à la surface de la lamelle de verre refermant le microcanal et il est entouré des bactéries. La présence de biocanaux à l'intérieur des biofilms favorise vraisemblablement le transport des nutriments et favorise ainsi leur croissance. Effectivement, tel qu'il a été montré par microscopie en champ clair (voir Figure 5-2) la biomasse est plus grande sur les côtés. En absence de ce biocanal interne, les bactéries enfouies à l'intérieur de ce

biofilm auraient un accès très limité aux ressources aussitôt que le biofilm deviendrait épais. La possibilité de former ce type de structure dans un environnement microfluidique combiné à la caractérisation *in situ* pendant la croissance par microscopie confocale offre une opportunité intéressante pour des études futures. Plus particulièrement, cela ouvre la voie à l'étude des différents facteurs influençant la formation et le maintien de ces biocanaux. Il serait intéressant de suivre l'impact de la géométrie du microcanal et des propriétés de sa surface sur la forme du biocanal interne. Puisqu'il est proposé que la disponibilité des nutriments soit un facteur provoquant l'apparition des biocanaux, l'effet de la nature du milieu de culture (source de nutriments et concentration) devra être investigué dans le futur. L'impact du débit de l'écoulement est aussi susceptible d'avoir un effet important puisqu'il est important pour le transport de masse dans le biofilm [6, 7]. Comme les biocanaux internes sont essentiels pour leur développement [117], cela pourrait permettre de trouver ou d'évaluer de nouvelles stratégies pour le contrôle des biofilms. La méthodologie utilisée dans le cadre de ces travaux pourrait aussi être appliquée à d'autres bactéries. Le dispositif microfluidique utilisé est simple et la microscopie confocale est une méthode permettant d'observer plusieurs fluorophores qui peuvent cibler différentes biomolécules à haute résolution en trois dimensions. On pourrait ainsi observer directement les biomolécules impliquées dans la formation des biocanaux et mieux comprendre les différents facteurs qui contrôlent leur apparition.