La mécanique des biofilms à la surface de liquides

Carine Douarche, Virginie Bailleux, Catherine Even, Jean-Marc Allain, Christophe Regeard, Éric Raspaud

▶ **To cite this version:**

Carine Douarche, Virginie Bailleux, Catherine Even, Jean-Marc Allain, Christophe Regeard, et al.. La mécanique des biofilms à la surface de liquides. Reflets de la Physique, 2018, 247 (56), pp.20-24. 10.1051/refdp/201856020 . hal-04191111

HAL Id: hal-04191111
https://hal.science/hal-04191111

Submitted on 7 Sep 2023

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.

La mécanique des biofilms à la surface des liquides

Carine Douarche[1], Virginie Bailleux[1], Catherine Even[1], Jean-Marc Allain[2,3], Christophe Regeard[4] et Eric Raspaud[1]

Résumé :

Les microorganismes colonisent les surfaces environnantes et s'organisent en un film de plusieurs centaines de microns appelé « biofilm ». Adhésion et tenue mécanique du biofilm assurent l'intégrité de la colonie alors qu'un détachement d'une partie des cellules permet la colonisation d'autres espaces. Nous nous sommes intéressés aux forces mécaniques structurant les biofilms et contribuant à maintenir leur cohésion, tout en facilitant leur détachement. Nous avons travaillé sur des biofilms flottant à la surface des liquides et formés par des souches sauvages d'une bactérie du sol appelée *Bacillus subtilis*. Nous montrons que ces systèmes ont des propriétés mécaniques originales et remarquables du fait de leur capacité à croître et proliférer.

Introduction aux biofilms :

Depuis la découverte des biofilms, la vision des biologistes sur le monde microbien a radicalement changé. En effet, les micro-organismes ont été pendant longtemps uniquement considérés comme existant sous une forme dite « planctonique », relatif au plancton. Le plancton étant définit comme l'ensemble des micro-organismes en suspension dans l'eau. C'est pourquoi les outils d'étude des micro-organismes ont été principalement développés pour des cultures de cellules en milieu liquide et sous agitation pour étudier des organismes en suspension. Or la vie microbienne de notre planète a colonisé non seulement les milieux aqueux mais également tous les milieux solides. Il est donc rare de trouver des surfaces totalement dépourvues de la présence de microbes. On estime d'ailleurs que 80% de la masse microbienne sur terre existe sous une forme adhérée. Sachant que les micro-organismes représentent plus de 90% des espèces et 60% de la biomasse sur terre, cela place les biofilms comme le mode de vie principal sur la planète. Il suffit d'une surface ou interface, d'un peu d'eau et de quelques nutriments (apportés par l'eau ou l'interface) pour qu'une structure particulière appelée biofilm commence à se développer. Dans la nature, les biofilms ont été observés dans des niches écologiques aussi variées que la surface des plantes, les sols, les interfaces air-eau d'eaux stagnantes, les sédiments marins, la peau et les microbiotes des animaux *et*c. La plupart du temps ces biofilms naturels sont multi-espèces : virus, bactéries, archées et même eucaryotes unicellulaires (voir pluricellulaires) peuvent ainsi cohabiter au sein de ces architectures macroscopiques complexes.

[1] Laboratoire de Physiques des Solides, CNRS UMR8502, Université Paris Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France
[2] Laboratoire de Mécanique des Solides, CNRS UMR7649, École Polytechnique, Université Paris-Saclay, Palaiseau, France
[3] Inria, Université Paris-Saclay, Palaiseau, France
[4] Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2BC), CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

La diversité architecturale des biofilms est dépendante des niches écologiques et des espèces microbiennes y interagissant. Ainsi, certains biofilms peuvent être très développés et s'apparentent à de véritables villes microbiennes alors que d'autres resteront à l'état de simples « îlots». Mais quelque soit le degré de développement de ces structures, toutes ont pour point commun, une cohésion des cellules hébergées assurée grâce à une matrice extracellulaire. Celle-ci est composée de polymères complexes (souvent dérivés de polysaccharides), d'eau et quelquefois de protéines et d'acides nucléiques [4, 5]. Elle constitue un véritable rempart protecteur contre l'environnement souvent hostile. Ces remparts servent à retenir l'eau et à lutter contre la dessiccation. Ils empêchent également les protistes « brouteurs » de bactéries, les molécules antimicrobiennes (tels que les antibiotiques) ou les polluants toxiques de l'environnement d'atteindre facilement leurs cibles cellulaires. Les différents habitants d'une même structure tirent donc de nombreux avantages à cette vie en communauté.

La grande majorité des biofilms sur terre jouent un rôle important dans le fonctionnement de la planète et interviennent dans les cycles de la matière, le renouvellement des sols, l'assimilation des aliments chez les animaux *etc*… Les exemples de biofilms « bénéfiques » sont pléthores. A contrario, lorsqu'une bactérie pathogène se développe en biofilm, elle devient plus résistante aux traitements antibiotiques et elle est capable de coloniser facilement des implants médicaux, cause principale des infections nosocomiales. La compréhension de tous les processus biologiques, génétiques, chimiques, physiques, impliqués dans la formation des biofilms est donc capitale pour mieux les utiliser ou mieux les combattre.

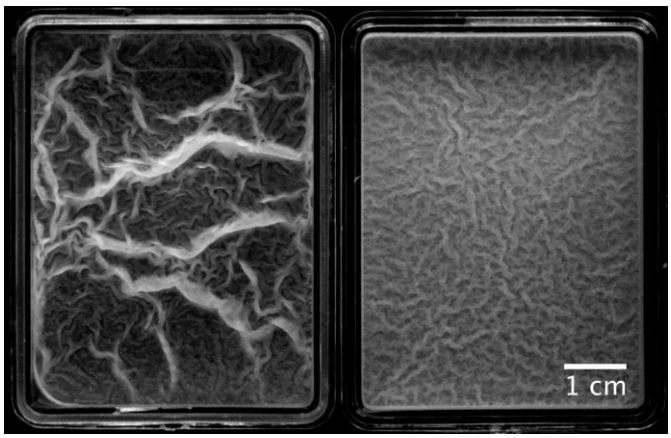

Figure 1 : Vue de dessus de deux biofilms de Bacillus subtilis (B. subtilis) de type sauvage flottant sur le milieu de culture liquide après environ 67 heures d'incubation à 23 °C. À gauche la souche sauvage NCIB 3610. À droite la souche sauvage DV1 [6].

Qu'est-ce qu'une précontrainte dans un matériau ?

Dans les biofilms, il existe des contraintes internes, que nous avons mises en évidence pour la première fois. Ces contraintes ne sont pas spécifiques aux biofilms et peuvent être trouvées dans de nombreux systèmes.

Une contrainte (*stress* en anglais) est une force par unité de surface s'exerçant localement sur les parois d'un petit volume de matériau. Elle peut avoir n'importe quelle direction par rapport à la surface et d'une manière générale, on peut la décomposer en deux composantes : normale et tangentielle ou de cisaillement. La contrainte normale met le matériau en tension (les particules du matériau tirent les unes sur les autres ou encore l'extérieur tire vers lui le matériau dans le volume) ou en compression (les particules poussent les unes sur les autres ou encore l'extérieur pousse vers l'intérieur sur le volume).

Prenons l'exemple d'un barreau mis en tension par deux forces égales et opposées (de norme *F*) appliquées à ses deux extrémités : n'importe quelle section d'aire *A* perpendiculaire à l'axe du barreau subit alors une contrainte en tension $\sigma = F / A$. Cette contrainte traduit l'équilibre mécanique local entre deux sous-parties du barreau situées de chaque côté de la section.

On parle de contrainte interne ou de précontrainte (*prestress* en anglais) lorsque la contrainte considérée existe en l'absence de force extérieure. Le béton précontraint est un exemple connu car il est largement utilisé dans la construction de bâtiments : la précontrainte de compression le rend plus résistant aux forces qu'il subit. Dans le domaine de l'ingénierie des matériaux, le trempage du verre ainsi que le grenaille de pièces métalliques permettent aussi d'améliorer leurs propriétés mécaniques : le traitement génère une précontrainte de compression qui améliore la tenue mécanique de leur surface et augmente ainsi leur résistance à la formation et propagation de fissures. De nombreux matériaux vivants ont également des contraintes internes. Celles-ci apparaissent clairement lorsque qu'on découpe un morceau du matériau : il change alors de forme sous l'effet des contraintes internes qui se libèrent. On peut citer un certain nombre de plantes (la rhubarbe ou la pastèque par exemple), de tissus, d'organes (comme les artères). Les contraintes internes proviennent de leur croissance dans un environnement complexe. Par exemple, si un tissu grandit plus vite que le tissu voisin, il va finir comprimé alors que le voisin sera étiré, l'ensemble restant à l'équilibre : c'est typiquement le cas avec le centre ou la peau de la rhubarbe. Il est aussi possible qu'un tissu (ou une partie du tissu) grandisse, alors que le reste est immobile : il apparaitra alors une compression dans la partie en croissance. Un exemple de cette situation est la croissance d'une tumeur.

<u>Le biofilm : un matériau précontraint</u>

Nous avons mis en évidence l'existence d'une contrainte interne dans des biofilms qui flottent à la surface de l'eau et formés par la bactérie du sol *B. subtilis* (cette bactérie sert souvent de modèle de laboratoire) (voir figure 1).

Notre dispositif expérimental est présenté sur la figure 2A. La croissance du biofilm a lieu dans un récipient rectangulaire délimité par 4 parois verticales. Une paroi mobile reliée à un capteur de force est maintenue plongée au centre, dans le milieu de culture pendant la croissance du biofilm. Une valeur nulle de la force sur le capteur correspond à une situation où toutes les forces qui agissent sur cette paroi sont nulles ou bien se compensent.

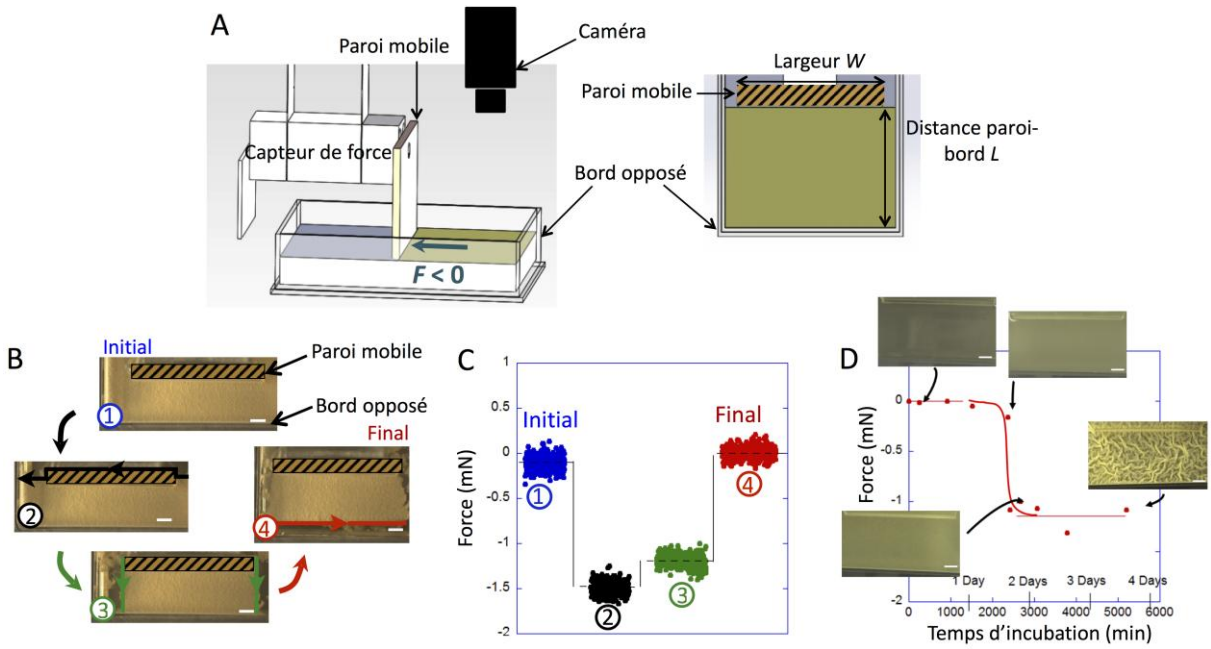

Figure 2 : (A) Vues schématiques oblique (à gauche) et supérieure (à droite) du dispositif. Les vues illustrent l'état de la pellicule à l'étape de coupe 2. Une force négative correspond au cas où la plaque s'éloigne du bord opposé. (B) Vue de dessus du biofilm au cours des étapes de découpe. La plaque mobile est schématisée par un rectangle hachuré et les lignes colorées montrent les découpes successives. Barres d'échelle = 5 mm. (C) La force agissant sur la plaque mobile est mesurée à chaque étape de coupe. (D) Mesure de la force générée par le biofilm au cours de sa croissance. Barres d'échelle = 5 mm. [7].

Après deux jours environ d'incubation, le biofilm forme une pellicule plane qui flotte à la surface du liquide et est naturellement attachée aux 4 parois verticales du récipient ainsi qu'à la paroi centrale reliée au capteur de force. Dans cet état initial, le biofilm entoure la paroi mobile et aucune force n'est détectée. Pour mettre en évidence la contrainte interne, nous avons réalisé une série de découpes à l'aide d'un scalpel, et enregistré les valeurs correspondantes de la force à chaque étape (voir les figures 2B et 2C). À l'étape 1 (en bleu), le biofilm est intact. À l'étape 2 (en noir) nous avons enlevé la partie du biofilm qui se trouve derrière la paroi mobile. Il apparaît alors une force négative sur le capteur qui montre l'existence d'une force compressive dans le biofilm. À l'étape 3 (en vert), nous avons laissé une bande de biofilm de largeur égale à celle de la paroi mobile, toujours attachée au bord opposé. La force résultante est alors un peu moins élevée en valeur absolue, mais toujours négative. Enfin, nous avons détaché la pellicule du bord opposé, et l'avons laissée relaxer. La force redevient alors nulle (étape 4, en rouge), ce qui signifie que la force mesurée précédemment est bien due au confinement du biofilm dans la boîte.

Au cours de la croissance du biofilm, cette force compressive varie pour atteindre une valeur constante qui est alors indépendante de l'âge du biofilm (figure 2D). Lorsqu'il est soumis à une contrainte interne, le biofilm peut beaucoup mieux résister à des dommages éventuels : lorsque nous essayons de détériorer avec une pointe de pipette une pellicule compressée, la contrainte interne tend à refermer la pellicule ; la cohésion et l'intégrité du biofilm sont ainsi

maintenues (voir la vidéo [8]). Ce n'est pas le cas si la contrainte interne est nulle et que la pellicule est complètement relaxée (voir la vidéo [9]).

Lorsque la force mesurée est divisée par la surface du biofilm sollicitée (épaisseur du biofilm multipliée par la largeur de la paroi mobile), nous obtenons une valeur de la contrainte interne de l'ordre de -80 ± 25 Pa. Cette valeur reste constante et est indépendante des dimensions macroscopiques du système (distance entre paroi mobile et bord opposé d'une part, et largeur de la paroi mobile d'autre part). Insistons sur le fait qu'il s'agit d'une contrainte de compression, due ici à la croissance du biofilm en milieu confiné et que le même type de contrainte devrait apparaître dans un biofilm poussant sur une surface plane solide ou dans un biofilm présentant des hétérogénéités ou encore des taux de croissance différent à l'intérieur de celui-ci.

La morphologie ridée des pellicules

En d'autres termes, indépendamment de la géométrie de l'expérience, il existe un phénomène de régulation au cours de la croissance du biofilm conduisant à terme à une contrainte interne constante. Étonnamment, cette contrainte « critique » apparaît assez tôt dans la vie du biofilm. Ainsi, lorsqu'il va grandir et croître contre les parois de la boîte, la contrainte interne va atteindre cette valeur critique et la pellicule n'aura pas d'autre choix que de se déformer en dehors du plan de l'interface eau-air et de former cette structure ridée observée sur la figure 1. En étudiant en détail les motifs si particuliers formés par les biofilms à maturation, nous nous sommes rendus compte qu'il existe une longueur caractéristique des rides de l'ordre d'1 ou 2 mm dans le système, et très reproductible d'un biofilm de *B. subtilis* à l'autre. Ce phénomène dit de « flambage » bien connu dans le cas de matériaux élastiques sous compression correspond à une instabilité mécanique et induit une ondulation du matériau. La longueur d'onde caractéristique prédite théoriquement résulte alors d'une compétition entre l'énergie de flexion du matériau et l'énergie associée à la déformation du substrat liquide ; nous avons trouvé que la prédiction théorique de ce modèle est du même ordre de grandeur que la valeur millimétrique mesurée expérimentalement. Des rides de plus grandes amplitudes peuvent aussi apparaître dans certains biofilms (figure 1 de gauche) ; la formation de ces rides permet de localiser la déformation des biofilms en un endroit précis.

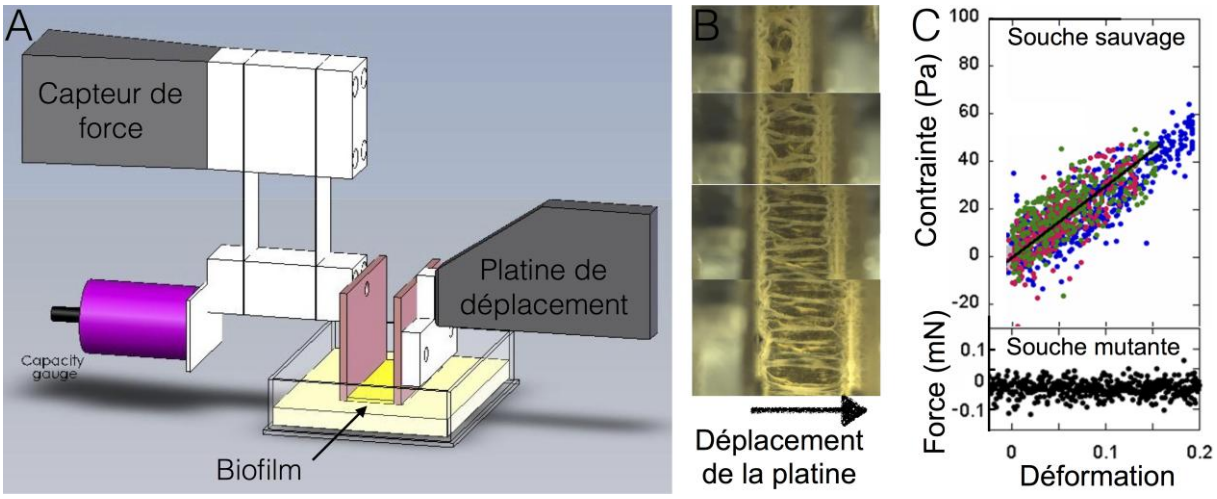

Figure 3 : (A) Schéma du montage expérimental permettant de sonder les propriétés mécaniques d'une pellicule flottante : lors de son développement le biofilm s'accroche aux deux plaques plongées dans la solution. L'une est reliée à une platine de déplacement et l'autre à un capteur de force. (B) Vue de dessus de la partie de biofilm comprise entre les deux plaques au cours d'une déformation d'un biofilm plissé (de haut en bas), la distance initiale entre les 2 plaques sans déformation (image du haut) est de l'ordre de grandeur du centimètre. (C) Courbe contrainte-déformation pour une souche sauvage (courbe du haut), pour une souche mutante dont les gènes responsables de la production des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire sont supprimés (courbe du bas) [6].

La rhéologie

L'apparition de rides nous permet de supposer un comportement élastique des pellicules de *B. subtilis.* Pour le mettre en évidence, nous avons légèrement modifié le montage expérimental décrit précédemment de sorte à solliciter mécaniquement et de manière contrôlée la pellicule. Cette fois-ci deux parois mobiles sont maintenues plongées dans le milieu de culture au cours de la croissance du biofilm (figure 3A). L'une est reliée à une platine de déplacement et l'autre à un capteur de force. Ainsi, en déplaçant la platine, nous imposons une déformation au biofilm et nous mesurons simultanément une force sur le capteur. Afin de simplifier l'interprétation de la mesure, nous gardons uniquement la bande de biofilm qui se trouve entre les deux plaques (voir figure 3B). En mesurant l'épaisseur du biofilm et connaissant sa largeur, nous pouvons alors représenter la contrainte en tension uniaxiale en fonction de la déformation imposée (figure 3C).

Pour une souche sauvage de *B. subtilis* (figure 3C en haut), la relation linéaire que nous obtenons est significative de la propriété élastique du biofilm pour des faibles déformations (jusqu'à 0.2). Le module d'Young obtenu (ou module élastique, paramètre physique indiquant la capacité d'un matériau à se déformer sous la contrainte), est de l'ordre de 300 ± 100 Pa, révélateur d'un matériau particulièrement « mou ». Cette valeur est en effet très faible par rapport aux modules de matériaux classiques comme le caoutchouc (de l'ordre du mégaPascal) mais reste comparables aux modules de cellules eucaryotes ou de tissus/organes

mous comme le cerveau (de l'ordre du kiloPascal). Cette valeur dépend de la structure du biofilm ainsi que de la composition de la matrice extracellulaire secrétée par les bactéries. En effet, l'élasticité du biofilm est principalement due aux exo-polysaccharides qui maintiennent la cohésion et la connectivité entre les bactéries. Nous avons étudié les propriétés mécaniques d'une pellicule flottante formée par une souche mutante incapable de synthétiser les exopolysaccharides de la matrice extracellulaire (figure 3C en bas). Dans ce cas, il n'y a plus du tout de cohésion dans la pellicule et le déplacement de la platine ne génère aucune force sur le capteur.

Lorsqu'on impose à la pellicule des déformations plus importantes, son comportement mécanique n'est plus simplement élastique mais révèle des propriétés un peu plus complexes nécessitant des réorganisations plus ou moins grandes et plus ou moins rapides de la structure interne [10]. La figure 4A illustre une déformation uniaxiale à vitesse constante au cours du temps et la figure 4B reporte la contrainte mesurée simultanément.

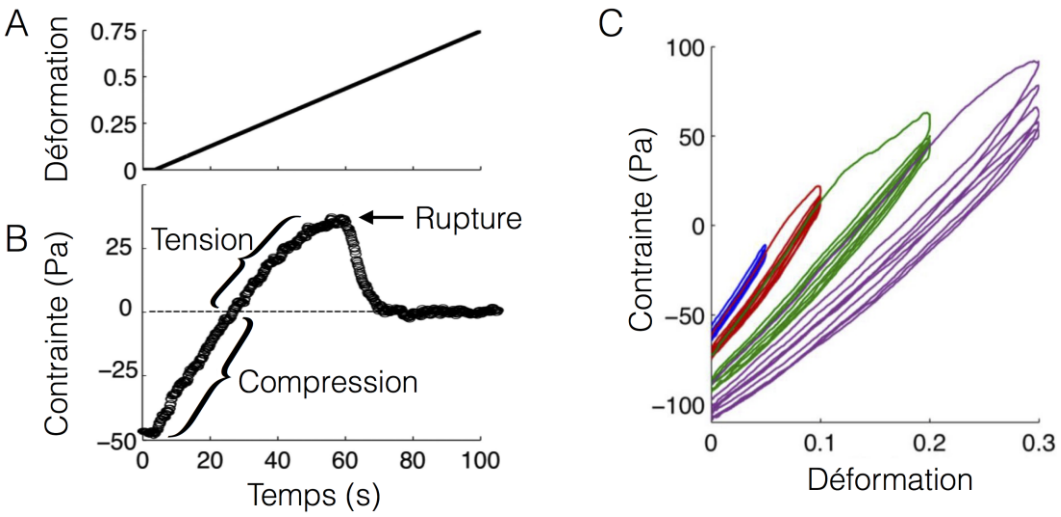

Figure 4 : (A) Élongation appliquée au biofilm en fonction du temps : le taux de déformation est constant. (B) Mesure simultanée de la contrainte générée par la déformation dans le biofilm. La pellicule est initialement précontrainte puis sous tension et se détache enfin. (C) Séries de déformations cycliques pour différentes valeurs de déformations maximales. Les valeurs des contraintes ne sont pas toujours identiques pour une même déformation : la pellicule est déformée de façon irréversible, on parle de déformation plastique.

Lorsque la déformation devient trop grande, le biofilm se rompt. Il n'est alors plus connecté à la plaque ce qui induit une chute brutale de la contrainte vers une valeur nulle. Nous observons que la gamme de contrainte négative (en compression) est au moins aussi étendue que la gamme de contrainte positive (en tension). Une expérience cyclique de sollicitation mécanique, comme l'indique la figure 4C, révèle que le biofilm se déforme de manière réversible lorsque l'amplitude des déformations est petite (courbes bleues). La déformation devient irréversible, c'est-à-dire plastique, pour des sollicitations de plus grandes amplitudes. Étonnamment cette transition élastique – plastique apparaît pour des contraintes de valeur nulle. À cela, il faut ajouter une composante visqueuse à tous les niveaux de déformation du biofilm, comme le montre les boucles d'hystérésis lors des sollicitations cycliques. Ces

mesures révèlent un comportement complexe du biofilm qui est viscoélastique sous compression et qui devient viscoplastique sous tension.

Nous avons également filmé les biofilms sous sollicitation mécanique afin de réaliser une analyse plus fine du déplacement de la matière. L'analyse a permis de révéler que la structure ne se déforme pas de manière uniforme et que le biofilm se comporte comme un matériau composite : seules les parties localisées à quelques millimètres des parois des plaques verticales subissent de grandes déformations plastiques, le biofilm se situant loin de ces plaques présentant de faibles déformations. La rupture a donc lieu au voisinage des parois séparant une partie restant fortement adhérée aux plaques d'une autre partie flottante. La nature composite et hétérogène du biofilm permet ainsi de localiser les grandes déformations tout en préservant l'intégrité du reste du biofilm. Les biofilms sont des matériaux composites car « l'état physiologique » des cellules qui le composent est différent. Par exemple les cellules adhérées aux plaques ont développé des organelles d'adhésion. Cette caractéristique est donc en partie déterminée génétiquement.

Conclusions

Au cours de leur croissance, les biofilms développent des propriétés mécaniques étonnantes et cruciales à leur survie en milieu naturel. La présence d'une contrainte interne, pourtant de faible intensité, permet de maintenir la cohésion de la pellicule et la proximité entre les cellules. La présence de cette contrainte « critique » à partir d'un certain stade de développement, conjuguée avec les propriétés élastiques de la pellicule pour les faibles déformations, conduit à un phénomène de flambage au cours de la croissance. Ainsi, une morphologie ridée apparaît, augmentant la surface d'échange du biofilm avec le milieu sur lequel il se développe. Pour de plus grandes déformations, les propriétés mécaniques deviennent viscoélastiques ou viscoplastiques, caractéristiques des matériaux plus complexes.

Bibliographie

[1] Miller M. B. and Bassler B. L. (2001), Quorum Sensing in Bacteria, *Annual Review of Microbiology*, **55**:165-199

[2] Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J. A. J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B. and Ghigo, J.-M. (2004), Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology*, **51**: 659–674

[3] Lewis K. (2010) Persister Cells, *Annual Review of Microbiology*, **64**:357-372\

[4] Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P. (1999), Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections, *Science*, 284(5418):1318-1322

[5] Hall-Stoodley L., Costerton J. W. and Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, **2**:95–108

[6] Trejo M., Douarche C., Bailleux V., Poulard C., Mariot S., Regeard C., Raspaud E. (2013), Elasticity and wrinkled morphology of bacillus subtilis pellicles. *Proceedings of the National Academy of Sci*ence *U.S.A.*, **110** :1217178110

[7] Douarche C., Allain J.-M., Raspaud E. (2015), *Bacillus subtilis* bacteria generate an internal mechanical force within a biofilm. *Biophys. J.* **109** :2195-2202

[8] http://www.cell.com/cms/attachment/2092787303/2076627792/mmc3.mp4
[9] http://www.cell.com/cms/attachment/2092787303/2076627791/mmc4.mp4
[10] Hollenbeck E. C., Douarche C., Allain J.-M., Roger P., Regeard C., Cegelski L., Fuller G. G., Raspaud E. (2016), Mechanical behavior of a *Bacillus subtilis* pellicle, *J. Phys. Chem. B,* **120**(26) :6080–6088