

Atlas des caractéristiques dynamiques du swarming de *Pseudomonas aeruginosa*



LABORATOIRE
Jean Perrin

Adrien BERARD

adrien.berard@etu.sorbonne-universite.fr

Abstract - *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène pour l'homme dans le cas d'une immunodéficiences. C'est la troisième bactérie responsable d'infections nosocomiales. Il est alors intéressant de comprendre sa capacité de développement et un type de motilité en particulier : le *swarming*. Cette motilité propre aux bactéries est l'émergence d'un mouvement collectif au sein d'une colonie de bactéries à partir de différents effets physiques comme l'effet Marangoni grâce à la production de surfactants par les bactéries : les rhamnolipides. D'un point de vue fondamental il est intéressant de comprendre à différentes échelles l'émergence de mouvement collectif avec des individus n'ayant pas directement conscience de leur environnement que par des effets physico-chimiques. Cette capacité permet aux bactéries de comprendre ce qui les entoure et notamment leur densité. Le but de ce stage était de créer un atlas - cartographie multiéchelle - dynamique du *swarming* chez *P. aeruginosa* grâce à de la microscopie optique. Celui-ci a été réalisé pour comprendre et analyser de manière quantitative l'activité interne dans la population de bactéries par le calcul de MSD grâce à de la fluorescence. La caractérisation de polymères produits lors du *swarming* chez l'un de mutants utilisé, influençant peut-être la mobilité interne en changeant les propriétés viscoélastiques du milieu, a constitué la seconde partie du stage.

Keywords - *Pseudomonas aeruginosa*, Biophysique, Microscopie, Swarming, Comportement collectif, Turbulence, MSD, Emergence

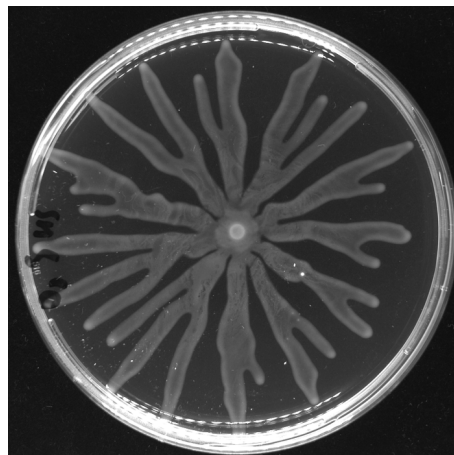


FIGURE 1 – Colonie de swarming de *Pseudomonas aeruginosa* - boîte de pétri de 90mm de rayon

Table des matières

1	Introduction et contexte	3
1.1	Présentation du laboratoire	3
1.2	Présentation de l'équipe	3
1.3	Conditions de travail	3
2	Sujet et problématique	3
2.1	Motilité individuelle d'une bactérie	3
2.1.1	Quorum sensing	4
2.2	Le <i>Swarming</i>	4
2.2.1	Différents mutants	5
2.2.2	Biofilm	5
2.3	Exopolysaccharides	5
3	Outils	5
3.1	Microscopes	5
3.1.1	Microscope à contraste de phase	5
3.1.2	Stéréomicroscope	5
3.2	Culture des bactéries	5
3.3	<i>Tracking</i> avec Trackmate	6
3.4	Déplacement quadratique moyen (MSD)	6
4	Travail réalisé et analyse	7
4.1	Microscopie multi-échelle	7
4.1.1	Microscope à contraste de phase	7
4.1.2	Stéréomicroscope	7
4.2	Tracking Multi-échelle	8
4.2.1	Local	8
4.2.2	Global	11
4.3	Biomarqueurs	12
5	Conclusion	13
	Références	14

1 Introduction et contexte

1.1 Présentation du laboratoire

Au cours de mon stage j'ai pu intégrer une équipe de recherche du laboratoire Jean Perrin. Laboratoire majoritairement expérimental, il regroupe 6 thématiques expérimentales et 1 théorique. L'axe principal de recherche est l'interface de la physique avec la biologie et la médecine. Une majorité de leurs recherches se situe dans le contexte de la réponse d'un système biologique à des perturbations extérieures. J'ai effectué mon stage au sein du groupe de biophysique des micro-organismes et plus particulièrement dans l'équipe de physique de l'étalement de colonies bactériennes dirigée par Maxime Deforet, chercheur CNRS.

1.2 Présentation de l'équipe

Cette équipe s'intéresse à la matière active, c'est à dire les milieux où les composants individuels ont la capacité de dépenser de l'énergie pour se déplacer ou pour exercer d'autres forces mécaniques, domaine d'intérêt pour les physiciens depuis plusieurs années. L'objet d'étude peut être une suspension de colloïdes ou de spins ou tout système biologique allant des biopolymères comme les microtubules aux populations d'animaux comme les oiseaux avec le modèle de Vicsek. Dans cette équipe, la matière active est une colonie de bactéries. C'est un bon exemple de matière active car les bactéries sont motiles, grâce notamment à leur flagelle, et se divisent. Une question fondamentale peut alors se poser : comment les effets physiques, comme la croissance ou la motilité de la population, peuvent-ils se traduire à travers les échelles ? Pour répondre à cette question, l'équipe utilise des techniques de microscopie à différentes échelles, allant de la cellule unique à une colonie entière, ainsi que des méthodes de génie génétique.

1.3 Conditions de travail

Au sein de cette équipe, j'ai pu rapidement évoluer en autonomie après une formation aux techniques du laboratoire par mon tuteur Maxime Deforet. Mon travail était réalisé en présentiel dans le laboratoire situé sur le campus de Jussieu. Toutes les semaines nous avions une réunion d'équipe avec les membres du groupe de biophysique des micro-organismes pour exposer nos réussites et échecs de la semaine. En plus de cela, nous avions, mon tuteur et moi, une réunion hebdomadaire pour discuter des avancements de mon stage. Ce suivi régulier et en équipe ont été de très bonnes conditions pour la réalisation de mon stage car cela m'a permis d'allier autonomie et travail d'équipe. J'ai eu accès pour mes expériences à un laboratoire de classe 2. Cette classe de laboratoire, parmi les 4 possibles, permet de manipuler des agents biologiques pathogènes chez l'humain mais avec des conditions de sécurité nécessaires. Dans ce laboratoire j'avais à disposition tout le matériel possible utilisé en microbiologie, de la hotte, aux micropipettes en passant par une centrifugeuse. J'ai aussi eu accès à la salle de microscopie de l'équipe.

2 Sujet et problématique

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie pathogène opportuniste chez l'humain. C'est l'un des plus grands pathogènes de maladies nosocomiales (infection contractée en milieu hospitalier). De son autre nom, le bacille pyocyanique est le troisième responsable de maladie nosocomiale derrière *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. C'est un bacille à Gram-négatif (qui possède des membranes interne et externe séparées par une zone périplasmique) naturellement présent dans le tube digestif de l'humain mais aussi ubiquitaire dans l'environnement et surtout dans les zones humides. Il crée principalement des infections pulmonaires, des fibroses, chez les patients en soins intensifs et surtout en réanimation [1]. Les infections sont les plus sévères chez les hôtes immunodéprimés.

2.1 Motilité individuelle d'une bactérie

Les bactéries peuvent se déplacer grâce à leur flagelle, long filament protéique fonctionnant grâce à un moteur circulaire, qui leur permet de nager dans des liquides [2], voir figure 2. Le mode de nage le plus étudié est le *run-and-tumble* de *E. coli*, qui nécessite plusieurs flagelles qui forment un faisceau. Dans le cas de *P. aeruginosa*, le cellule ne porte qu'un seul flagelle qui peut tourner dans les deux directions alternativement : le mode de nage est dit "*run-reverse*". Un aspect fondamental dans l'utilisation de cette technique est la chimiotaxie des bactéries : elles se dirigent dans l'environnement grâce à des senseurs moléculaires leur permettant de connaître l'environnement chimique alentour. Cela est très utile d'un point de vue nutritif pour trouver des ressources [3].

Une autre forme de motilité se fait par les pili, petits poils fixés à l'extérieur de la membrane. Ils permettent de tracter la bactérie sur de petites échelles grâce à des forces adhésives. Cette technique s'appelle le *twitching* 2. Elle est très utile pour le mouvement sur des surfaces. [4]

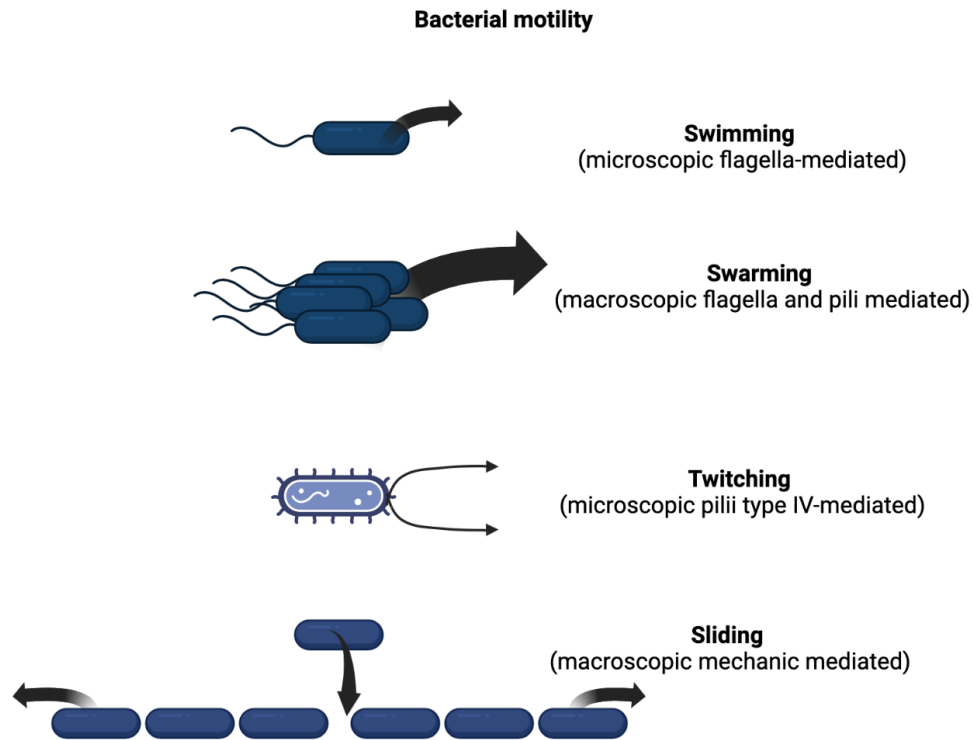


FIGURE 2 – Différents modes de mobilité bactérienne (créé avec biorender)

2.1.1 Quorum sensing

Le quorum sensing (QS) est la capacité des bactéries à connaître la densité environnante de bactéries grâce à la production et la détection de molécules. Chez *P. aeruginosa* il existe 2 types de chemins moléculaires QS. Ce système est essentiel pour la chimiotaxie des bactéries.

2.2 Le *Swarming*

Le *swarming* est une technique de prolifération spatiale des colonies de bactéries sur des surfaces semi-solides [5]. A partir de leurs propriétés microscopiques, la nage individuelle notamment, un comportement macroscopique permettant d'aller plus vite[6] émerge : le *swarming*. Les bactéries produisent des surfactants, des rhamnolipides et leurs précurseurs les HAA, abaissant la tension de surface de l'eau. De façon générale, un gradient de tension de surface engendre une force qui s'exerce dans le même sens que le gradient. Ceci s'appelle l'effet Marangoni et il se retrouve notamment dans des phénomènes quotidiens comme les larmes du vin. Ici est le cas d'un effet Marangoni solutal : le gradient de tension de surface est dû à un gradient de concentration de surfactants. Par effet Marangoni les surfactants vont tirer l'eau et donc les bactéries.

Plusieurs facteurs physiques peuvent influencer la vitesse du *swarming* [7] : la concentration en rhamnolipides l'augmente, la concentration en agar le diminue, l'osmolarité le diminue, la concentration en polymères le diminue. Dans ce même article de Yang et al [7] a été expliqué l'importance de la concentration en gel d'agar . Le *swarming* se fait dans des gels d'agar allant de 0,4% à 1%. En dessous l'agar est trop poreux : les bactéries nagent dedans et ne restent plus uniquement en surface. Au-dessus, le milieu est moins perméable et il n'y a plus de flux assez important. De plus, les bactéries n'arrivent pas à tirer assez d'eau du gel ce qui leur est nécessaire pour pouvoir nager donc faire du *swarming*.

Des facteurs microscopiques peuvent influencer le *swarming*. En effet il a été montré que les pili de type IV sont nécessaires [8] et que deux unités motrices du flagelle le sont aussi[9]. Néanmoins, au laboratoire nous avons montré que les pili de type IV ne sont pas nécessaires pour réaliser du *swarming*, la littérature n'est donc pas toujours consistante à ce niveau là.

L'intérieur de la colonie obéit à d'autres lois physiques lors de ce mouvement collectif. En effet, il a été montré par Dunkel et al [10] que le *swarming* obéissait aux mêmes lois que la dynamique des fluides et notamment des turbulences à bas nombre de Reynolds. Dans l'article de Rhodeland [11], d'autres phénomènes physiques ont été démontrés lors du *swarming* comme le *jamming* ou embouteillage en français. Lorsque la densité augmente, la viscosité effective augmente par la même occasion. Dans le même article il a été montré que la prolifération des bactéries n'était pas nécessaire au *swarming*, signe de l'émergence d'une propriété collective et non juste l'expansion mécanique de la colonie.

Le *swarming* débute après 5h de croissance de la colonie après l'avoir mise dans les conditions adéquates. On observe auparavant une phase de transition dite *lag phase*. Après cela on peut voir l'apparition de branches (voir figure 1).

2.2.1 Différents mutants

Le laboratoire a, grâce à de l'évolution dirigée effectuée dans d'autres laboratoires, différents mutants à disposition. Ces différents mutants sont utilisés pour leurs phénotypes différents influençant leur capacité à *swarmer*.

- *Wild Type* : PA14, souche de référence utilisée au laboratoire et dans de nombreuses études pour étudier le *swarming*
- *HyperSwarmer* : ce mutant produit semble-t-il plusieurs flagelles et a un *swarming* plus rapide [12].

2.2.2 Biofilm

Un biofilm est une communauté bactérienne englobée dans une matrice d'exopolymères, ce qui la rend notamment plus résistante à de nombreux antibiotiques. Le *swarming* peut amener à la création de biofilms si la colonie est trop dense [13]. C'est la plupart du temps ces biofilms qui sont responsables de la virulence de *P. aeruginosa*.

2.3 Exopolysaccharides

Psl, Pel and Alginate sont trois exopolysaccharides sécrétés par *P. aeruginosa* notamment dans la phase de biofilm. Ces polymères de sucre forment en partie la matrice du biofilm. Ils peuvent toutefois être sécrétés plus tôt dans le développement de la colonie et notamment durant la phase de *swarming*. Nous pouvons les noter car ils peuvent affecter la viscoélasticité du milieu et donc la dynamique de la colonie.

3 Outils

3.1 Microscopes

3.1.1 Microscope à contraste de phase

La microscopie à contraste de phase est une technique de microscopie optique qui permet de visualiser des échantillons transparents tels que des cellules vivantes ou des tissus biologiques sans avoir besoin de les colorer ou de les fixer.

Le contraste de phase est basé sur la différence de phase des ondes lumineuses qui traversent différentes parties d'un échantillon. Dans un microscope à contraste de phase, la lumière provenant d'une source passe à travers un condenseur spécial qui crée un anneau de lumière. Cette lumière passe ensuite à travers l'échantillon et est recueillie par l'objectif du microscope.

L'objectif est équipé d'un jeu de diaphragmes appelés diaphragme de phase qui sont alignés avec l'anneau de lumière créé par le condenseur. Ces diaphragmes modifient la phase de la lumière qui passe à travers différentes parties de l'échantillon, créant ainsi un décalage de phase.

Le microscope du laboratoire à contraste de phase possède 4 objectifs : 4x, 10x, 20x et 40x.

3.1.2 Stéréomicroscope

L'équipe s'est équipée, il y a quelques années, d'une loupe binoculaire de type Axio Zoom v16 de la marque Zeiss. Il est adapté pour étudier des échantillons en champ large ainsi qu'en fluorescence. Il y a deux objectifs : 0.5x et 2.5x avec la capacité de zoomer pour les deux de 7 à 112%. Une caméra CCD est reliée pour pouvoir avoir directement les images sur ordinateur. Le logiciel utilisé pour régler les paramètres des deux microscopes était micromanager, logiciel en libre accès permettant une large gamme de configuration.

3.2 Culture des bactéries

Les bactéries sont conservées dans un congélateur à -70°C pour minimiser leur prolifération par abaissement de leur métabolisme. La première étape de la culture consiste à placer ces bactéries dans un milieu de culture adéquat et dans des conditions de prolifération. Pour cela, on utilise un bâtonnet stérile pour récupérer quelques bactéries du flacon surgelé. Ce bâtonnet est ensuite placé dans un milieu de culture. Pour *P. aeruginosa* c'est 3mL de milieu LB que l'on place dans un tube. Ce tube est ensuite placé dans un incubateur à agitation à 37°C avec aération. Les bactéries sont nettoyées le lendemain 2 fois dans 0,5 mL de PBS (*Phosphate buffered saline*) : cela permet de nettoyer sans rupture des cellules par pression osmotique grâce à la présence de sels. A chaque nettoyage les bactéries sont passées à la centrifugeuse pour pouvoir être récupérées. On dépose ensuite 2µL de cette solution sur le gel d'agar préalablement préparé. Ce gel est préparé de tel sorte à avoir tous les nutriments nécessaires à la croissance des bactéries que ce soit en source de carbone ou d'azote. Pour connaître la recette en détails, voir Xavier et al [14].

La culture est ensuite laissée dans un incubateur à 37°C. Enfin, la colonie sur boîte de pétri est étudiée au microscope aussi dans un environnement à 37°C.

Toutes les manipulations sont réalisées sous hotte avec du matériel stérile.

3.3 Tracking avec Trackmate

Des billes fluorescentes de 1 μm en polystyrène ont été utilisées pour suivre les mouvements internes dans la colonie de bactérie. Ces billes ont été soit insérées grâce à une pointe localement dans la colonie de bactéries, soit posées avec une goutte d'eau sur la colonie localement ou au départ de la croissance. Après l'acquisition d'un timelapse grâce à micromanager, les données ont été analysés grâce à TrackMate et Matlab. TrackMate est un plugin de Fiji, version avec des plugins de ImageJ, capable de faire du tracking d'objet. L'algorithme DoGDetector a été utilisé pour détecter les point lumineux sur l'image ainsi que l'algorithme SimpleLapTracker pour le suivi dans le temps des points détectés.

3.4 Déplacement quadratique moyen (MSD)

Le déplacement quadratique moyen ou MSD pour *Mean Squared Displacement* est un indicateur très utilisé dans l'étude des phénomènes de transport. Il permet de quantifier l'éloignement quadratique durant un temps par rapport à une position initiale :

$$MSD(\tau) = \langle |x(\tau) - x_0|^2 \rangle \quad (3.1)$$

Avec τ le temps caractéristique de déplacement, x_0 la position initiale et $\langle \dots \rangle$ la moyenne d'ensemble sur les positions. Un algorithme développé par Maxime Deforet a été utilisé pour calculer cette valeur rapidement. Si le comportement est diffusif, le MSD peut être relié au coefficient de diffusion par la relation suivante :

$$MSD(\tau) = 2nD\tau \quad (3.2)$$

avec n la dimension du déplacement et D le coefficient de diffusion. Si ce n'est pas diffusif, le MSD évolue en loi de puissance avec τ avec un coefficient différent de 1. Par exemple, si le comportement est balistique on a :

$$MSD(\tau) = v^2\tau^2 \quad (3.3)$$

avec v la vitesse de la trajectoire balistique.

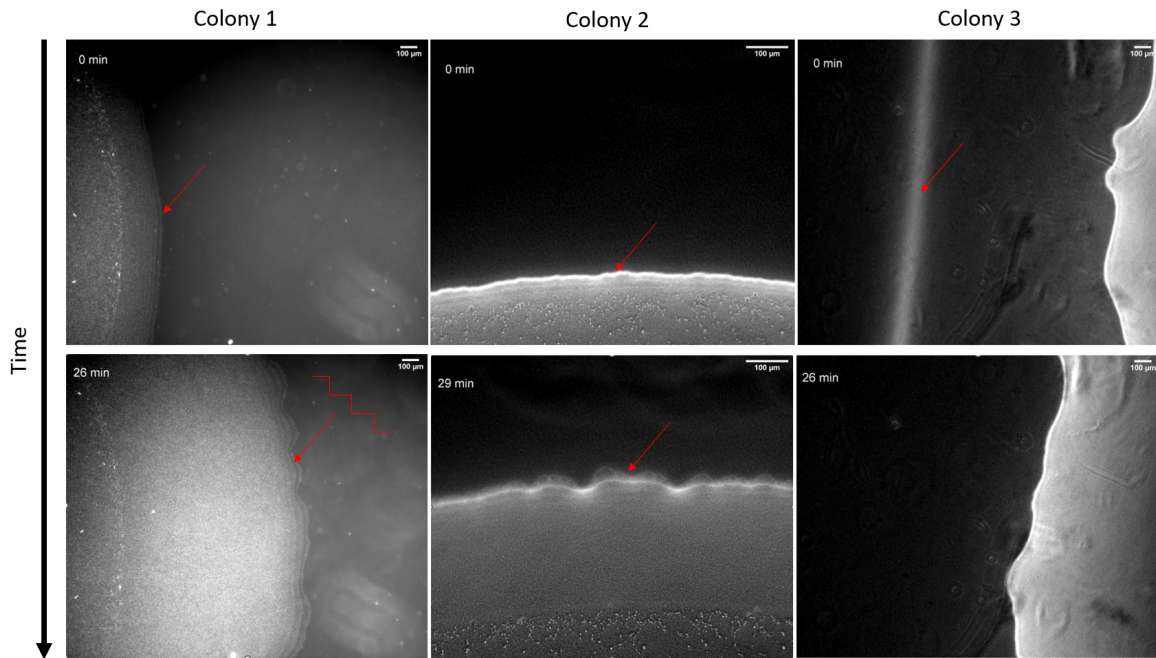


FIGURE 3 – Différentes images à différents temps avec un microscope à contraste de phase dans différentes configurations- De gauche à droite 4x ph2, 10x ph1 et 4x phL avec phi un anneau i de diffraction spécifique. En rouge sont marquées les régions d'intérêt.

4 Travail réalisé et analyse

Comme indiqué dans le titre de ce rapport, l'objectif initial de ce stage était de créer un atlas multi-échelle du *swarming*. Pour réaliser cela, il a tout d'abord fallu apprendre les techniques de microbiologie pour créer des colonies de bactérie comme expliqué ici 3.2.

4.1 Microscopie multi-échelle

4.1.1 Microscope à contraste de phase

Par la suite, on a utilisé le microscope à contraste de phase 3.1.1 avec différents objectifs et différents jeux d'anneaux de phase pour réaliser cet atlas multi-échelle qualitatif. Dans la figure 3, on observe que la colonie présente des aspects visuels différents selon le type d'anneaux de phase utilisé. Ces prises de vues ont été réalisées environ 5h après la pose de l'inoculum, au début du moment du *swarming*. En effet, il y a une phase de latence avant d'apercevoir cet effet. Au 4x avec le ph2 on distingue nettement les différents étages de la colonie. En effet, les bactéries s'étalent en différents échelons avec un maximum correspondant à plus ou moins 5 épaisseurs de bactéries différentes. Au 4x phL on peut distinguer une ligne dans l'image en haut à droite. Celle-ci correspond au front de surfactants. Ce front est visible car les surfactants font gonfler le gel. L'évolution de l'épaisseur a été mesurée grâce à un profilomètre par Maxime Deforet. Dans les trois points de vue, on voit l'avancement rapide du front de la colonie ainsi qu'une tension de ligne apparente fixant les bactéries d'un côté de cette ligne sans explorer l'autre côté. On remarque aussi que la ligne n'est pas homogène, il y a quelques instabilités qui se propagent avec le temps.

Malgré des résultats plutôt encourageant à ces différentes échelles (4x et 10x) nous n'avons pas poursuivi dans l'utilisation du microscope à contraste de phase à cause de problème de condensation. Ceux-ci étaient vraisemblablement dus à une déficience de la plaque chauffante de l'incubateur placé au-dessus de l'objectif du microscope créant un point froid. N'ayant pas le temps durant ce stage de pouvoir régler ce problème, l'utilisation d'un autre microscope permettait de le contourner. Toutefois, ce problème permet de faire la transition en faisant des zooms moindre pour étudier la colonie sous un plus grand angle.

4.1.2 Stéréomicroscope

Dans la figure 4, on étudie l'évolution de la colonie de bactéries à différents temps grâce à la loupe binoculaire. Avec un objectif plus petit, 0,5x, on peut observer le développement du *swarming*. Le timelapse a été lancé quelques minutes après la pose de la goutte. On peut voir le *coffee ring effect* qui a eu lieu avec les mouvements de convection et d'évaporation : la partie externe du

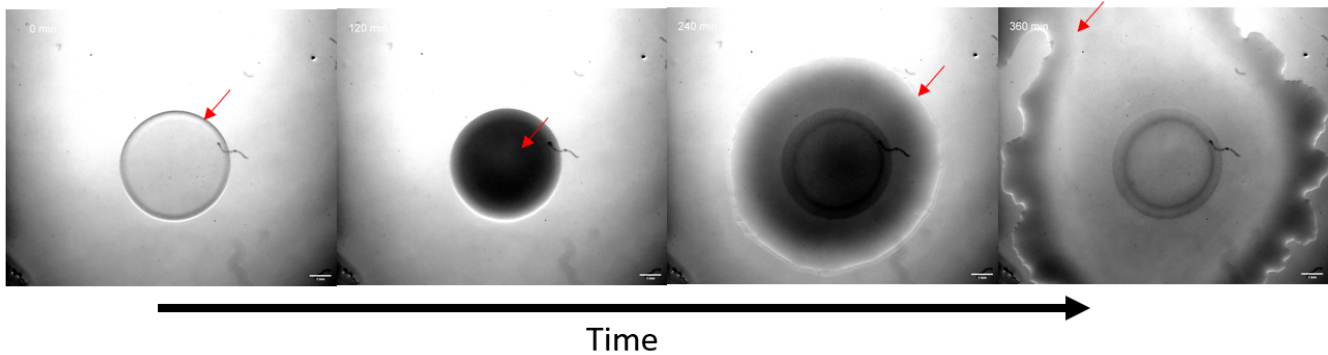


FIGURE 4 – Timelapse 2 à 3h après inoculation - échelle 1mm. En rouge sont marquées les régions d'intérêt.

cerle est plus sombre que l'intérieur de la première image et donc plus dense en bactéries. Dans la deuxième image on remarque que l'inoculum s'est assombri, signe de la prolifération des bactéries. Rhodeland [11] a montré que la prolifération de bactéries seule n'induisait pas de *swarming* chez *Bacillus subtilis*. On peut aussi le voir en étudiant des mutants qui prolifèrent mais à qui ils manquent des caractéristiques spécifiques du *swarming* comme la production de rhamnolipides par exemple. Dès 240 minutes on peut voir le début du *swarming* : la colonie s'étend en différentes couches. Les instabilités commencent à être visibles : le contour de la colonie n'est pas nettement circulaire. Ces instabilités se propagent et sont clairement visibles dans la dernière image.

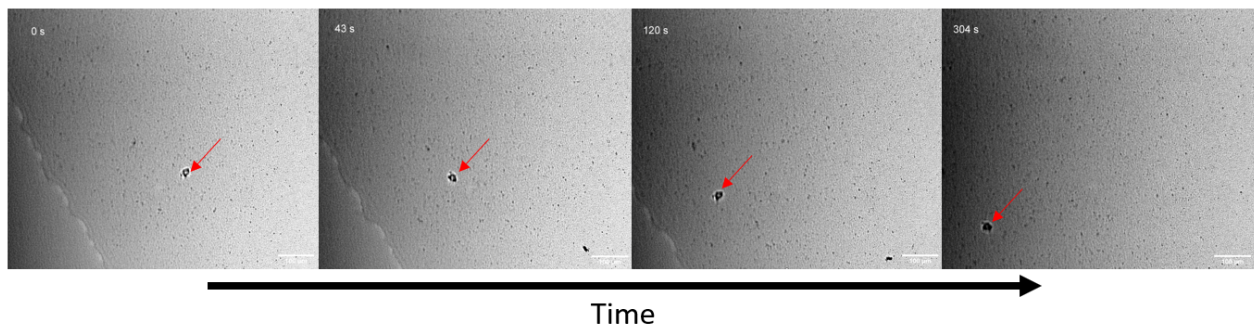


FIGURE 5 – Mouvement interne à l'échelle de la seconde dans la colonie - échelle 100µm

Après avoir vu les différents mouvements en bordure de la colonie à différentes échelles, on peut se concentrer sur l'intérieur de la colonie. Pour cela, regardons la figure 5. Dans cette figure on suit sur un timelapse l'intérieur de la colonie proche du bord à un plus gros zoom et plus tard dans le développement de la colonie (typiquement 300min en rapport avec la figure 4). On voit l'évolution rapide du front de la colonie en bas à gauche des images. De plus, on remarque une poussière au centre de l'image à 0 min qui évolue dans l'espace de manière brownienne si on regarde le film. Les différentes échelles au microscope nous permettent de faire un semblant d'atlas du *swarming*. Cette approche n'est toutefois que qualitative pour étudier les mouvements dans la colonie. Comme on le voit dans la figure 5, il existe des mouvements internes dans la colonie et non pas que les mouvements en bordure de colonie. Il peut être intéressant de quantifier ces mouvements dans une visée générale de modélisation du *swarming*.

4.2 Tracking Multi-échelle

Après avoir observé l'activité interne dans la colonie de manière qualitative, il fallait la quantifier pour éventuellement créer un modèle pour la création des branches due au *swarming*. Pour cela on a utilisé des billes fluorescentes faisant 1 micromètre de diamètre. Pour rappel, ces billes font typiquement la taille d'une bactérie (0,5 par 1,5 à 3 micromètres). Elles sont faites en polystyrène et sont activées par de la lumière de longueur d'onde de 580 nanomètres et émettent de la lumière à une longueur d'onde de 605 nanomètres. Les billes ont une concentration dans la solution stock de 10^{10} par millilitre. Différentes utilisations de ces billes sont possibles.

4.2.1 Local

Pour rappel, les billes fluorescentes sont utilisées pour étudier la dynamique locale au sein de la colonie. On cherche donc à déposer localement les billes sur la colonie. Une stagiaire dans l'équipe de Maxime Deforet a développé une technique plutôt simple

mais assez efficace pour cela : on trempe une aiguille dans une solution de billes et on pique avec précaution la colonie à l'endroit où l'on souhaite étudier la dynamique. L'aiguille est stérilisée pour éviter toute contamination de l'échantillon. La solution de bille a été diluée par des facteurs 10,100 et 1000 pour essayer différentes concentrations. L'échantillon était piqué à différents endroits dans la colonie. Les billes étaient ensuite retrouvées au microscope à fluorescence.

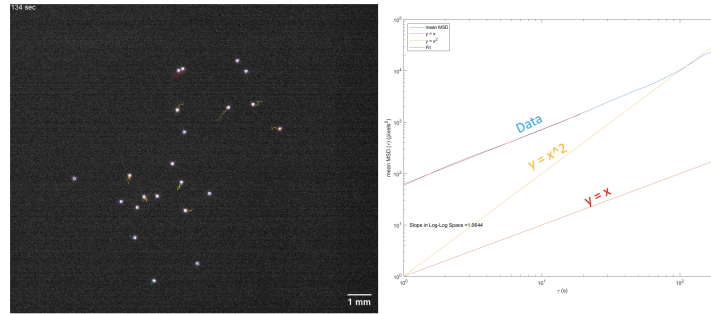


FIGURE 6 – Tracking de billes fluorescentes d'un micron grâce à Trackmate et analyse des données sur Matlab avec le MSD en fonction du temps.

- Le MSD décrit ici est typiquement diffusif, en effet la pente est de 1 comme on peut le voir avec le comparatif avec $y = x$. Ce n'est clairement pas ballistique (cf $y = x^2$)

La concentration optimale était la solution initiale diluée par 100 soit 10^8 billes par millilitre. Cela revenait à une vingtaine de billes visible au 0,5x à 112% de magnification. Cette concentration était optimale car elle permettait d'avoir assez de billes pour avoir beaucoup de données et réduire les erreurs mais aussi d'avoir une densité permettant d'avoir une distance entre chaque bille typiquement plus grande que la distance parcourue par une bille entre deux images successives ce qui permettait de les distinguer.

Les données de fluorescence ont ensuite été traitées avec TrackMate. On voit sur la gauche de la figure 6 le traçage des différentes billes fluorescentes ainsi que leur reconnaissance d'une image à l'autre marquée par leur trajectoire locale. Les données ont ensuite été analysées sur Matlab en calculant le MSD en fonction de τ . Sur cette même figure sont tracés les profils purement diffusif et purement balistique respectivement en $y = x$ et $y = x^2$.

Analysons maintenant les résultats de ces calculs de MSD respectivement pour HyperSwarmer et WildType. Dans la figure 7 sont tracés les MSD en fonction du temps. On voit que la moyenne, en pointillé, est proche du caractère purement diffusif marqué par la ligne noire. Cette moyenne est relativement intéressante à analyser car on voit sur l'histogramme une faible dispersion des coefficients directeur des MSD en échelle logarithmique autour de 1. Les comportements étant diffusifs, il est alors intéressant de quantifier la mobilité interne via la relation entre le MSD et le coefficient de diffusion 3.2.

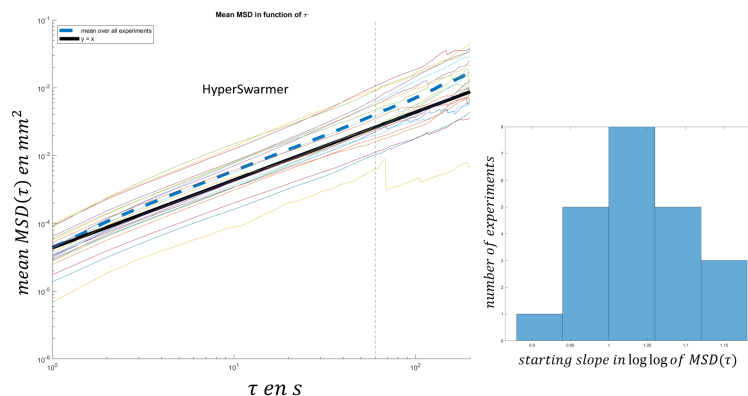


FIGURE 7 – MSD en millimètre carré en fonction du temps en seconde pour HyperSwarmer et histogramme du nombre d'expériences en fonction de la pente du MSD

- Le MSD décrit ici est plutôt diffusif, en effet la pente moyenne sur l'histogramme est proche de 1 comme on peut le voir avec le comparatif avec $y = x$.

Dans la figure 8, on voit une colonie d'HyperSwarmer. On note directement la différence entre HyperSwarmer et Wildtype (voir figure 1) où il n'y a pas de branches cette fois ci. Sur des colonies de ce type, différentes expériences de pose de goutte puis de calcul de MSD ont été réalisées. Le coefficient de diffusion a alors été tracé en fonction de la distance au bord de la colonie. On notera que selon l'âge de la colonie, sa taille évolue et donc la distance au bord n'est qu'un des différents indicateurs possibles.

Toutefois c'est celui qui permet d'avoir la meilleure explication de la mobilité de manière générale et reproductible entre différentes expériences. On voit qu'il y a une corrélation entre la distance au bord de la colonie et le coefficient de diffusion. L'activité de la colonie est plus importante en bordure de colonie qu'en son centre. Cela peut-être dû à l'expansion de la colonie se faisant principalement par les extrémités, toutefois cela n'est qu'une hypothèse dans une tentative de modélisation globale de l'expansion de la colonie. Nous noterons aussi l'ordre de grandeur du coefficient de diffusion qui est 2 ordres de grandeur plus grand que ce que l'on pourrait attendre d'une diffusion purement thermique pour des billes de cette taille dans de l'eau. En effet, on peut utiliser la relation de Stokes-Einstein pour le calculer $D_{passive} = (k_B T) / (6\pi r \mu)$ ce qui donne un coefficient de diffusion de $0,33 \mu m^2 \cdot s^{-1}$, avec k_B la constante de Boltzmann, T la température et μ la viscosité dynamique du milieu. Cela nous permet d'affirmer que les mouvements des billes sont bien dus à une consommation d'énergie et un mouvement actif des bactéries.

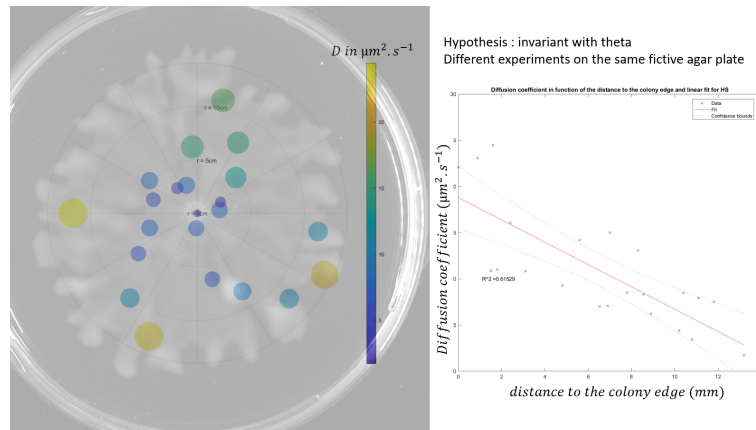


FIGURE 8 – Coefficient de diffusion en fonction de la distance au bord de la colonie pour HyperSwarmer - On voit une corrélation entre le coefficient de diffusion et la distance au bord de la colonie.

Dans la figure 9, les mêmes courbes de MSD et le même histogramme sont tracés pour WildType que sur la figure 7 pour HyperSwarmer. En rouge, on voit la courbe caractéristique d'un comportement balistique. On voit très nettement que la moyenne mais aussi la plupart des MSD ont une pente aux alentours de 1,3 en échelle logarithmique. Cela signifie que le comportement est superdiffusif et le MSD n'évolue ni en puissance 1, comportement diffusif, ni en puissance 2, comportement balistique. Il est alors intéressant de savoir d'où vient ce caractère superdiffusif pour analyser la mobilité interne dans la colonie de WildType.

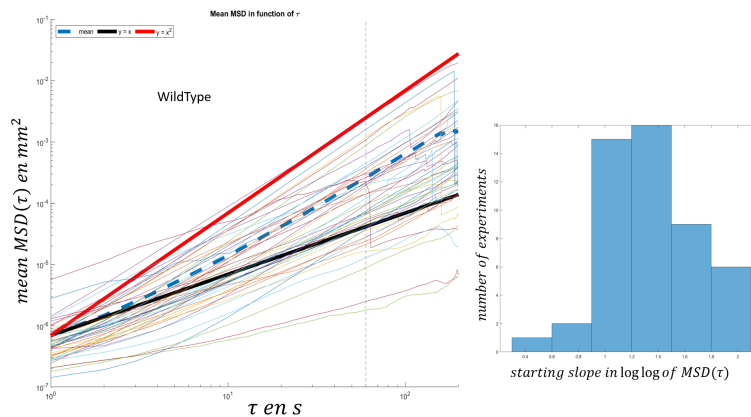


FIGURE 9 – MSD en millimètre carré en fonction du temps en seconde pour WildType et histogramme du nombre d'expériences en fonction de la pente du MSD

- Les MSD ici ne décrivent pas un comportement diffusif. Le MSD moyen est compris entre un régime balistique et un régime diffusif.

Dans la figure 10, on voit le mouvement de dérive des billes fluorescentes au sein de la colonie sur l'image de gauche. Ce mouvement de dérive est notable dans chaque expérience comme on peut le voir sur l'image de droite. Cette dérive permet d'expliquer le caractère superdiffusif des MSD précédemment montrés. En effet, le mouvement est quasi balistique dans le sens de la dérive générale des billes et paraît diffusif dans sa direction orthogonale. Toutefois le MSD ne rend pas compte de ces deux caractères, seul la dérive (*drift*) générale le montre. Une hypothèse de l'origine de cette dérive est la présence de branche dans la colonie (voir

figure1). Sur ces branches un mouvement collectif des bactéries partant du centre de la colonie vers l'extrémité de la branche peut expliquer cette dérive. Il peut alors être intéressant de voir l'importance de cette dérive en fonction de la distance à l'extrémité de la branche sur laquelle se trouve les billes mais aussi de la distance en fonction du bord le plus proche de la colonie. Sur la figure 11, on

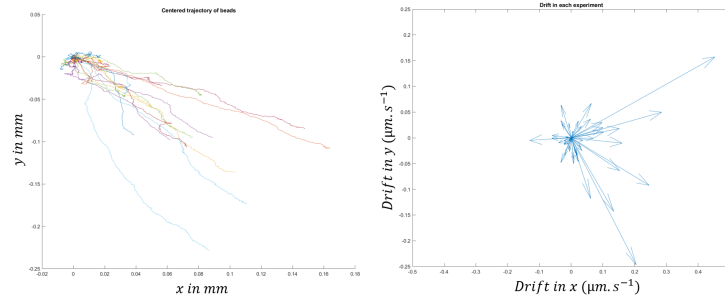


FIGURE 10 – Trajectoire de billes sur une branche de colonie de WildType à gauche centrées sur un même point de départ et à droite la dérive des billes dans toutes les expériences - Sur la figure de gauche on voit clairement un mouvement de dérive des billes qui se retrouve dans le calcul de la dérive sur toutes les expériences

voit la norme de la dérive en fonction des deux précédentes distances discutées. On voit une nette corrélation : plus on s'approche du bord, que ce soit de la branche la plus proche (ou sur laquelle les billes sont) ou du bord tout court, plus la dérive est importante. On peut conclure de cette image que la dérive augmente fortement quand on se rapproche du bord, signe peut-être d'une mobilité plus importante des bactéries au bord. L'expansion ne semble donc pas partir du centre mais bien localement si on suppose que la dérive est un signe de l'expansion de la colonie.

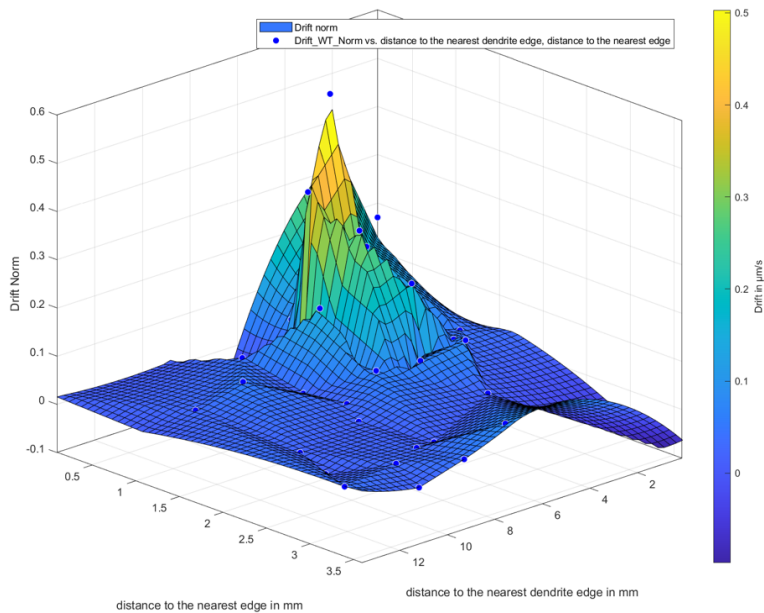


FIGURE 11 – Norme de la dérive en fonction de deux distances. Celle en bas à gauche est la distance au bord le plus proche et celle en bas à droite est la distance à l'extrémité de la branche la plus proche

4.2.2 Global

Une autre solution pour mettre des gouttes dans l'échantillon et étudier la dynamique a été de les poser avant de déposer la goutte sur le gel d'agar. Le mélange consistait en 20μL de bactéries dans du PBS avec 20μL de billes diluées par 100. Ensuite on dépose une goutte de 2μL sur le centre du gel d'agar et on étudie en fluorescence l'évolution des billes. Etonnement les billes restent globalement au centre de l'inoculum malgré la prolifération des bactéries et le début du *swarming*, voir image de gauche figure 12. Toutefois, malgré ne pas avoir le résultat attendu, on peut distinguer une structure filamenteuse sur l'image de droite, figure 12. A noter que les filaments ne sont pas fluorescents mais ce sont bien des billes qui se sont accrochées ou qui ont été emportées par les filaments produits par la colonie de bactéries.

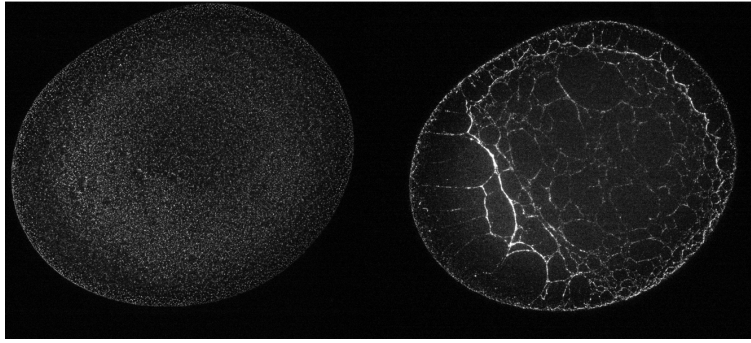


FIGURE 12 – EPSs visible grâce aux billes fluorescentes mises au moment de l'inoculation - Mutant : *Hyper-Swarmer*

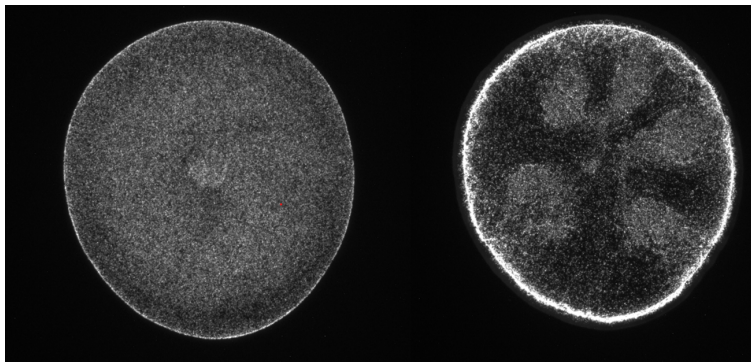


FIGURE 13 – Zones immobiles visibles ou flux de surfactants - Mutant : *WildType*

On notera aussi que ces filaments ne sont visibles qu'avec le mutant *HyperSwarmer*. En effet, avec le mutant *WildType* on voit des formes de vallées (voir figure 13). Ces vallées sont en noire avec les zones les plus concentrées en billes (blanches) plus immobiles (ce qui se voit sur la vidéo). Une hypothèse est que le mutant *swarming* le plus remue plus les filaments produits, en ayant une plus forte activité, ce qui amène les filaments en surface de la colonie et sont donc visibles grâce aux billes.

4.3 Biomarqueurs

Comme précisé dans les parties précédentes, il est intéressant de comprendre les moyens de communication des bactéries les unes avec les autres ainsi que leur capacité de prolifération et d'antibiorésistance. Cette dernière est souvent due à la forme de biofilm qui se maintient grâce à une matrice formée de polymères : exopolysaccharides et ADN extra-cellulaire (ADNe). Caractériser ces polymères à différents moments est donc d'un intérêt fondamental ainsi que médical. En effet, ces polymères peuvent avoir un impact sur la viscoélasticité du milieu et donc changer la mobilité interne de la colonie. La phase de *swarming* n'est étudiée que depuis récemment contrairement à la phase de biofilm et donc les polymères sécrétés dans cette phase ne sont pas toujours connus dans la littérature. Toutefois, on peut s'inspirer de la littérature plus abondante sur les biofilms et la matrice pour connaître des techniques non invasives de caractérisation de ces polymères. C'est grâce à cela que nous est venue l'idée d'utiliser des biomarqueurs fluorescents spécifiques de certains polymères que nous avons supposé être présents durant la phase de *swarming*. PA14, la souche étudiée produit des exopolysaccharides 2.3 ainsi que de l'ADN. Toutefois elle ne produit que du Pel et de l'alginate. Dans [15], ils utilisent trois biomarqueurs : *Wisteria floribunda lectin*, ou WFL, biomarqueur de Pel, HHA est un biomarqueur de l'alginate et l'Iodure de propidium est un biomarqueur de l'ADN. Ces biomarqueurs n'ont qu'été partiellement utilisés durant ce stage mais ils le seront par la suite pour pouvoir caractériser les déterminants viscoélastiques de la mobilité des bactéries au sein de la colonie et selon la souche étudiée.

5 Conclusion

Pour conclure, nous avons pu réaliser un atlas multi-échelle du *swarming* de *Paeruginosa* grâce à différentes techniques. Tout d'abord une analyse multi-échelle qualitative a été réalisée grâce à différentes techniques de microscopie. Ces dernières nous ont permis d'étudier plus quantitativement le *swarming* et notamment la mobilité interne dans la colonie de bactéries. On voit que cette mobilité est différente selon les souches qui *swarment* plus ou moins vite. Hyperswarmer a un caractère diffusif, plus important qu'une diffusion thermique signe de l'activité des bactéries, tandis que WildType a un caractère entre diffusif et balistique signe d'une dérive des bactéries. En effet celle-ci se déplace en même temps que l'évolution de la branche et cette évolution est d'autant plus forte qu'on se trouve au bord de la branche ou de la colonie. Pour finir, nous avons pu commencer une étude des polymères sécrétés pouvant impacter la viscoélasticité du milieu et donc la mobilité des bactéries dans la colonie. En perspective de ce rapport nous pouvons nous interroger sur la présence de ces polymères selon le type de souches étudiées ainsi que sur leur caractérisation. Cela viendra dans la suite de mon stage.

D'un point de vue plus personnel, ce stage m'a beaucoup appris sur le milieu de la recherche en biophysique grâce à une expérience très immersive dans un laboratoire. Les nombreuses discussions que ce soit avec mon encadrant ou le personnel du laboratoire ont été très enrichissantes et m'ont permis de me convaincre de mon orientation dans un master et dans une carrière en recherche académique. Je finirai donc par remercier mon encadrant Maxime Deforet pour son aide tout au long de ce stage ainsi que tout le personnel du laboratoire Jean Perrin qui m'a permis de faire de ce stage une très bonne expérience.

Références

- [1] N. Floret, X. Bertrand, M. Thouverez, and D. Talon. Infections nosocomiales à *Pseudomonas aeruginosa* : origine exogène ou endogène de la bactérie responsable ? *Pathologie Biologie*, 57(1) :9–12, February 2009.
- [2] E. M. Purcell. Life at low Reynolds number. *American Journal of Physics*, 45(1) :3–11, January 1977.
- [3] George H. Wadhams and Judith P. Armitage. Making sense of it all : bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12) :1024–1037, December 2004. Number : 12 Publisher : Nature Publishing Group.
- [4] John S. Mattick. Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, 56 :289–314, 2002.
- [5] Daniel B. Kearns. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9) :634–644, September 2010. Number : 9 Publisher : Nature Publishing Group.
- [6] Natalie Verstraeten, Kristien Braeken, Bachaspatimayum Debkumari, Maarten Fauvart, Jan Fransaer, Jan Vermant, and Jan Michiels. Living on a surface : swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16(10) :496–506, October 2008.
- [7] Alexander Yang, Wai Shing Tang, Tieyan Si, and Jay X. Tang. Influence of Physical Effects on the Swarming Motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal*, 112(7) :1462–1471, April 2017.
- [8] Thilo Köhler, Lasta Kocjancic Curty, Francisco Barja, Christian van Delden, and Jean-Claude Pechère. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* Is Dependent on Cell-to-Cell Signaling and Requires Flagella and Pili. *Journal of Bacteriology*, 182(21) :5990–5996, November 2000.
- [9] Christine M. Toutain, Michael E. Zegans, and George A. O’Toole. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187(2) :771–777, January 2005.
- [10] Jörn Dunkel, Sebastian Heidenreich, Knut Drescher, Henricus H. Wensink, Markus Bär, and Raymond E. Goldstein. Fluid Dynamics of Bacterial Turbulence. *Physical Review Letters*, 110(22) :228102, May 2013. Publisher : American Physical Society.
- [11] Ben Rhodeland, Kentaro Hoeger, and Tristan Ursell. Bacterial surface motility is modulated by colony-scale flow and granular jamming. *Journal of the Royal Society, Interface*, 17(167) :20200147, June 2020.
- [12] Dave van Ditmarsch, Kerry E. Boyle, Hassan Sakhtah, Jennifer E. Oyler, Carey D. Nadell, Éric Déziel, Lars E. P. Dietrich, and Joao B. Xavier. Convergent Evolution of Hyperswarming Leads to Impaired Biofilm Formation in Pathogenic Bacteria. *Cell Reports*, 4(4) :697–708, August 2013.
- [13] Minh Tam Tran Thi, David Wibowo, and Bernd H. A. Rehm. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22) :8671, January 2020. Number : 22 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute.
- [14] Joao B. Xavier, Wook Kim, and Kevin R. Foster. A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 79(1) :166–179, January 2011.
- [15] Laura K. Jennings, Kelly M. Storek, Hannah E. Ledvina, Charlene Coulon, Lindsey S. Marmont, Irina Sadovskaya, Patrick R. Secor, Boo Shan Tseng, Michele Scian, Alain Filloux, Daniel J. Wozniak, P. Lynne Howell, and Matthew R. Parsek. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36) :11353–11358, September 2015. Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences.