UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT
DROIT D'AUTEUR

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. Toute contrefaçon, plagiat ou reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
34 COURS LÉOPOLD — CS 25233
54052 NANCY CEDEX
WWW.UNIV-LORRAINE.FR

École Doctorale BioSE (Biologie Santé Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Lucie KLOPFFER**

Approches pluridisciplinaires pour l'étude de l'adhésion et du transport de *Shewanella oneidensis* en écoulement confiné

Le 12 février 2026

Membres du jury :

Présidente du jury :	**Mme Lydie PLOUX**	**DR CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg**
Rapporteurs :	**Mr Harold AURADOU**	**DR CNRS, Université-Paris-Saclay, Orsay**
	Mr Romain BRIANDET	**DR INRAE, AgroParisTech, Université-Paris-Saclay, Jouy-en-Josas**
Examinateur :	**Mr Yohan DAVIT**	**CR CNRS, Université de Toulouse, Toulouse**
Directrice de thèse :	**Mme Laurence MATHIEU**	**MCU, HDR, EPHE, Nancy**
Co-directeur de thèse :	**Mr Nicolas LOUVET**	**MCU, Université de Lorraine, Nancy**

UMR 7564 CNRS / Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement (LCPME), 9 avenue de la forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy

UMR 7563 CNRS / Université de Lorraine, Laboratoire Énergies & Mécanique Théorique et Appliquée (LEMTA), 2 avenue de la forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy

Sommaire

Remerciements

Valorisation scientifique

Introduction 1

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1 Notions générales d'hydrodynamique 6
1.1 Les équations de Navier-Stokes 6
1.2 Nombre de Reynolds et régime d'écoulement 7
1.3 Cas d'un écoulement au sein d'un capillaire de section rectangulaire 8
1.4 Contrainte et taux de cisaillement 10
1.5 Cas d'un écoulement au sein d'un tube cylindrique 11

2 Mécanismes de transport des bactéries 11
2.1 Transport passif 12
2.1.1 La diffusion brownienne 12
2.1.2 La sédimentation 12
2.1.3 La convection 13
2.2 Transport actif lié à la motilité bactérienne 13
2.2.1 Nage bactérienne d'un point de vue biologique 14
2.2.2 Caractérisation de la nage bactérienne d'un point de vue physique 19
2.3 Dynamique de nage sous cisaillement 22
2.3.1 Cadre dimensionnel : Péclet hydrodynamique et de confinement 23
2.3.2 Comportement de nage dans le volume 24
2.3.3 Comportement de nage proche paroi 27

3 Adhésion des bactéries aux surfaces 30
3.1 Aspects physico-chimiques de l'adhésion bactérienne 30
3.1.1 Adhésion bactérienne réversible : interactions physico-chimiques en jeu 30
3.1.2 Influence des propriétés physico-chimiques de la surface et du milieu environnant 32
3.1.3 Influence des interfaces bactériennes 35
3.2 Passage de l'adhésion réversible à une adhésion irréversible 36
3.2.1 Renforcements des interactions 36
3.2.2 Surface sensing 37
3.2.3 Production des EPS 39
3.3 Influence de l'hydrodynamique sur l'adhésion bactérienne 39

4 Caractérisation du transfert et de l'adhésion des bactéries à la paroi 43
4.1 La microfluidique au service de l'étude des évènements pionniers 43
4.2 Méthodes optiques pour le *tracking* 2D de bactéries à proximité et à la paroi 45
4.3 Méthodes optiques pour le *tracking* 3D des bactéries au sein du bulk 49

5 *Shewanella oneidensis MR-1* 52
5.1 Généralités sur la souche de *Shewanella oneidensis* MR-1 52
5.2 Motilité de *Shewanella oneidensis* MR-1 57

5.2.1 Flagelle de *Shewanella oneidensis* 58
5.2.2 Comportement de nage de *Shewanella oneidensis* 59
5.3 Capacité de *S. oneidensis MR-1* à coloniser les surfaces 61
5.4 Influence hydrodynamique sur la capacité de colonisation de *S. oneidensis* MR-1 63

Bilan de l'état de l'art 65

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

Préambule 67

1 Souches de *Shewanella oneidensis* et conditions de culture 67
1.1 Souches utilisées 67
1.2 Conservation et repiquage des souches en milieu solide 67
1.3 Milieux de culture testés 68
1.4 Réalisation des pré-cultures 68
1.5 Cinétique de croissance bactérienne 68

2 Caractérisation de la biomasse planctonique au sein du système 69
2.1 Détermination de la biomasse totale et des bactéries à membranes endommagées par cytométrie en flux 69
2.2 Détermination de la biomasse cultivable 70

3 Caractérisation de la motilité de la souche en milieu soft agar 71

4 Dispositif expérimental pour l'étude du transfert et de l'adhésion des bactéries à la paroi 71
4.1 Description du système microfluidique utilisé : un capillaire en verre 71
4.2 Procédure de nettoyage du dispositif expérimental et sa validation 72
4.3 Paramètres hydrodynamiques imposés 73

5 Méthodologies mises en place lors du suivi de l'adhésion bactérienne pionnière par imagerie time-lapse 74
5.1 Définitions de « bactéries adhérées » et de « paroi » 74
5.2 Acquisition des images en microscopie à épifluorescence 74
5.3 Traitement des images par approche classique 75
5.3.1 Détermination de la biomasse à la paroi par comptage manuel 75
5.3.2 Détermination de la surface recouverte par les bactéries par traitement Matlab 75
5.4 Traitement des images par Deep Learning 76
5.4.1 Présentation du modèle Yolov8 78
5.4.2 Labellisation et entraînement du modèle YOLOv8 à la détection des bactéries 78
5.4.3 Détection des bactéries à la paroi 79
5.4.4 Tracking des bactéries 80
5.4.5 Calculs des paramètres orientation, temps de résidence et déplacement à la paroi 80

6 Méthodologies mises en place pour l'étude du transport bactérien par microscopie holographique 81
6.1 Dispositif expérimental et enregistrement des hologrammes 81
6.1.1 Dispositif expérimental et paramètres d'acquisition 81
6.1.2 Principe de formation d'un hologramme dans une configuration en ligne de Gabor 82
6.2 Traitement des hologrammes enregistrés 83
6.2.1 Elimination du bruit 84
6.2.2 Propagation de l'hologramme 84

6.2.3 Détection des bactéries et reconstruction de leurs trajectoires ... 86
6.2.4 Analyse des trajectoires reconstruites ... 88

7 Caractérisation du transcriptome des bactéries ... 89
7.1 Extraction des ARN bactériens ... 89
7.1.1 Méthode du kit « Quick-RNA™ Miniprep » ... 89
7.1.2 Méthode au phénol acide à chaud (*hot acid phenol*) ... 90
7.2 Analyse des ARN extraits ... 91
7.2.1 Évaluation de la concentration et de la pureté des ARN extraits ... 91
7.2.2 Évaluation de l'intégrité des ARN extraits sur gel d'agarose ... 92
7.2.3 Évaluation de l'intégrité des ARN extraits par électrophorèse Agilent ... 92
7.2.4 Traitements enzymatiques post-extraction ... 93
7.3 Séquençage des ARN extraits ... 94
7.4 Analyses bio-informatique des données de séquençage ... 94

Chapitre 3 : Influence de l'hydrodynamique sur l'adhésion pionnière de *S. oneidensis* par approche *deep learning*

Introduction ... 96

1 Mise en place expérimentale et implémentation du modèle de détection ... 97
1.1 Protocole expérimental ... 97
1.2 Démonstration de l'absence de croissance au sein du système ... 98
1.2.1 Choix du milieu de culture ... 98
1.2.2 Validation de l'absence de croissance durant l'expérience ... 99
1.3 Stabilité de la fluorescence de la protéine gfp ... 100
1.3.1 Quantification des bactéries gfp+ et sybr+ dans le bulk ... 100
1.3.2 Prise en compte du photoblanchiment des bactéries à la paroi ... 101
1.4 Démonstration de l'homogénéité de colonisation longitudinale du capillaire ... 101
1.5 Implémentation d'une méthodologie de traitement d'images automatisé par Deep Learning 102

2 Influence du taux de cisaillement sur la dynamique d'adhésion précoce de *Shewanella oneidensis* par analyse deep learning ... 105

3 Explorations complémentaires fondées sur les résultats de deep learning ... 130
3.1 Effet de l'hydrodynamique sur le déplacement des bactéries à la paroi ... 130
3.1.1 Déplacement des bactéries à la paroi ... 130
3.1.2 Lien entre déplacement et temps de résidence des bactéries à la paroi ... 133
3.2 Évolution temporelle de la dynamique bactérienne à la paroi ? ... 134
3.2.1 Validation de l'analyse par deep learning pour des cinétiques de colonisation plus longues 135
3.2.2 Évolution temporelle du temps de résidence des bactéries à la paroi ... 136
3.3 « Hydrodynamic blocking » et distribution des bactéries à la paroi ... 138
3.3.1 Présentation du modèle de blocage hydrodynamique utilisé ... 139
3.3.2 Résultats obtenus ... 140

Conclusions ... 143

Annexes chapitre 3 ... 145

Chapitre 4 : Influence de l'hydrodynamique sur la dynamique de nage et de transport de *S. oneidensis* par microscopie holographique

Introduction 147

1 Caractérisation initiale de la motilité de *S. oneidensis* 148

2 Méthodologie et validation du suivi 3D par holographie 150
- 2.1 Protocole expérimental 150
- 2.2 Traitement des trajectoires brutes 151
- 2.3 Analyse des trajectoires lissées 155
- 2.4 Validation et reproductibilité des mesures 160
  - 2.4.1 Validation par profil de Poiseuille 160
  - 2.4.2 Reproductibilité des mesures expérimentales 163
  - 2.4.3 Stabilité de la motilité bactérienne 163

3 Influence du taux de cisaillement sur la dynamique de transport de *Shewanella oneidensis* 164

4 Influence du confinement sur les propriétés de transport 189
- 4.1 Dynamique bactérienne en condition statique 189
- 4.2 Dynamique bactérienne sous cisaillement 195

Conclusions 206

Chapitre 5 : Influence de l'hydrodynamique sur l'expression des gènes de *S. oneidensis* en phase planctonique

Introduction 209

1 Implémentation et optimisation d'une méthode d'extraction d'ARN adaptée à *S. oneidensis* 210
- 1.1 Choix de la méthode d'extraction 210
- 1.2 Présence persistante d'un ADN contaminant 212
- 1.3 Validation de la méthode de conservation du culot bactérien 214

2 Influence du taux de cisaillement sur l'expression des gènes de *Shewanella oneidensis* 215

Conclusions 247

Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives

Préambule 250

1 Approches méthodologiques implémentées 250
- 1.1 Une levée de verrous méthodologiques 250
- 1.2 Limites des approches développées 252
- 1.3 Perspectives à plus long terme 254

2 Motilité bactérienne ? Une définition à la frontière du physique et du biologique 254

3 Quelles bactéries atteignent la paroi ? 256

4 Quel stimulus déclenche la réponse cellulaire sous fort cisaillement ? 259

Références bibliographiques 262

Remerciements

La réalisation de ce travail de thèse n'aurait été possible sans la contribution de nombreuses personnes, auxquelles je tiens à exprimer aujourd'hui ma profonde gratitude et ma sincère reconnaissance.

C'est tout naturellement que je souhaite adresser mes premiers remerciements à ma directrice de thèse, **Laurence Mathieu** et mon co-directeur, **Nicolas Louvet**. Dès mon arrivée au laboratoire, vous m'avez fait confiance et m'avez accordé une grande liberté pour faire mes propres choix, suivre les pistes qui me tenaient le plus à cœur et aller au bout de mes idées. Merci d'avoir toujours cru en moi, souvent plus que je ne le faisais moi-même, et de m'avoir constamment encouragée à viser plus haut. J'ai énormément appris à vos côtés, tant sur le plan scientifique qu'humain, et je vous en suis profondément reconnaissante.
Laurence, je ne saurais te remercier assez pour la qualité de ton encadrement tout au long de cette thèse. Merci pour ta disponibilité, ton écoute, ta bienveillance et ton soutien indéfectible. Merci également pour toutes les petites attentions qui ont ponctué ces années, du chocolat pour me remonter le moral aux invitations chez toi (bon…je crois que ce n'est plus un secret, tout le laboratoire sait que j'étais ta chouchoute !). Merci d'avoir toujours été présente, et désolée auprès de ta famille de t'avoir autant accaparée. J'ai eu la lourde tâche d'être ta dernière doctorante, et j'espère que tu en garderas un aussi bon souvenir que celui que tu me laisses.
Nicolas, merci également pour ton encadrement, ta disponibilité, ta sympathie et ta bonne humeur au quotidien. Ton soutien m'a été précieux, et tu as toujours su trouver les mots justes pour me remonter le moral lorsque nous rencontrions des difficultés. Ça y est, je vais soutenir : tu n'as désormais plus d'excuse, tu vas pouvoir te consacrer pleinement à ton HDR ! Merci également pour tes invitations chez toi, qui m'ont permis de m'accorder quelques moments de pause loin de mon ordinateur.
Je me suis pleinement épanouie au cours de cette thèse grâce à vous deux, et c'est avec une certaine nostalgie que j'écris ces lignes, consciente que cette collaboration touche bientôt à sa fin.

Mes remerciements s'adressent ensuite aux membres de jury. Je remercie mes rapporteurs, Messieurs **Harold Auradou** et **Romain Briandet**, d'avoir accepté cette lourde tâche malgré un emploi du temps chargé. Je remercie également Madame **Lydie Ploux** et Monsieur **Yohan Davit** pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je suis sensible à l'honneur que vous me faites et vous remercie vivement pour l'intérêt porté à mes travaux.
Merci également aux membres de mon comité de thèse, **Fabrice Golfier** et **Simon Poirier**, pour votre accompagnement attentif et vos conseils avisés tout au long de mon parcours doctoral.

Je remercie les directeurs du LCPME et du LEMTA, respectivement **Christophe Gantzer** et **Olivier Lottin**, pour m'avoir accueillie au sein de vos laboratoires, ainsi que pour les excellentes conditions de travail et

de convivialité que vous y instaurez. De la même manière, je remercie les animateurs de l'équipe MIC du LCPME : **Christophe Merlin**, puis **Isabelle Bertrand**, ainsi que l'animatrice de l'équipe FECIN du LEMTA, **Christel Metivier** pour votre accueil, vos attentions et vos conseils tout au long de ce travail.

Je souhaite également remercier chaleureusement l'ensemble des collaborateurs avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler au cours de mon projet de thèse. Je pense en particulier à toi, **Simon Becker**. Merci d'avoir permis l'implémentation de l'holographie au LEMTA, mais aussi de t'être formé à l'utilisation et l'entraînement de YOLO : sans toi rien n'aurait été possible ! Merci pour l'enthousiasme que tu mets dans tout ce que tu entreprends et pour ta bonne humeur quotidienne ; ce fut un réel plaisir de travailler avec toi !

Je remercie également **Cédric Pradalier** (GeorgiaTech Europe) et **Jérémy Fix** (Centrale Supélec) pour votre expertise et vos conseils précieux pour la mise au point du modèle de détection adapté au traitement de mes images. Je tiens aussi à remercier **Virginie Marchand** et **Valérie Bourguignon**, de la plateforme d'Épitranscriptomique de l'Université de Lorraine, pour vos recommandations et vos précieux conseils dans la mise en place d'un protocole d'extraction d'ARN fiable et adapté à mon modèle bactérien.

Merci à toi **Christophe Merlin**, pour ton aide et le temps que tu m'as consacré lorsque je tentais désespérément d'extraire mes ARN bactériens. Je te remercie également pour le partage de ton expertise et les pistes proposées concernant l'analyse de mes résultats transcriptomiques. Merci également à **Frédérique Changey** pour nos discussions autour de ce travail, ainsi qu'à **Fabienne Quilès** et **Grégory Francius**, pour l'initiation respective à la spectroscopie infrarouge et à l'AFM. Merci à toi également **Christelle Despas** de nous avoir aidé et de nous avoir mis en contact avec François Dupire pour l'analyse de mes « fameuses boîtes ».

J'exprime également ma gratitude à l'**ANR** pour le financement de ce projet doctoral, ainsi qu'à l'équipe scientifique porteuse du projet (team Jean-Christophe, Nicolas, Laurence et le partenaire IFPEN), qui a rendu cette aventure possible. Je remercie également l'**École Doctorale BioSE** pour l'accompagnement tout au long de ce projet de recherche.

Enfin, je souhaite témoigner ma reconnaissance à **l'ensemble des membres du LCPME et du LEMTA**. Je ne pourrai pas être exhaustive en citant chacun d'entre vous, mais sachez que je vous suis profondément reconnaissante et que je ressors grandie de cette belle aventure. Merci à tous pour votre accueil et votre bonne humeur, qui ont contribué à créer une ambiance de travail chaleureuse et conviviale. Parmi vous, je tiens à remercier tout particulièrement :

Merci à la team **Alice, Amélie** et **Marine**. Vous m'avez accueillie dès mon arrivée au laboratoire et m'avez fait me sentir à l'aise dans une ville et un laboratoire où je ne connaissais alors personne. Merci de m'avoir

intégrée et d'avoir gardé le contact malgré vos départs : sachez que nos soirées ont été un réel plaisir et m'ont toujours fait énormément de bien.

Merci à toi **Julie** ! Tu es devenue bien plus qu'une simple collègue au cours de ces quelques années partagées. Véritable partenaire de concerts, sache que tu vas beaucoup me manquer ! Surtout ne change pas, tu sais intégrer les nouveaux arrivants et rendre le quotidien au laboratoire chaleureux et agréable. Tes petits loupiots vont également me manquer. Promis je repasserai par Nancy de temps en temps pour de nouveaux concerts et lire Mini Loup avec Noé.

Je m'adresse maintenant à la dream team du bureau J140.5. Déjà, merci à tous de m'avoir supportée ! Merci à toi **Émilie** ! Je pense que nous nous sommes très bien trouvées face à face au bureau. Merci pour tous ces bons moments et les fous rires partagés. Merci également pour ton soutien dans les périodes plus stressantes, ainsi que pour les bons petits plats motivants ! Je garde en mémoire tous nos potins au bureau, nos petites balades à Baccarat, ainsi que nos petits week-ends passés au labo ! Bon courage pour la fin de thèse, que je sais d'ores et déjà être un réel succès. Je passe ensuite à toi **Marianne** ! Merci pour toutes les discussions que nous avons eues, les conseils et le partage de ton expérience de thèse….et bien sûr, merci d'avoir été notre fournisseuse officielle de gâteaux ! Merci ensuite à toi **Thomas**. Nous avons eu la chance de partager le même bureau pendant un certain temps, de ton stage de M2 à ton CDD. Merci pour nos fous rires au bureau, notre passion commune pour les potins, ainsi que nos fameuses sorties à Europa Park. Je remercie enfin l'ensemble des autres membres qui ont partagé le bureau : **Émilie** (la petite), **Charlène** (avec qui je partageais la même curiosité pour le Secret Santa), **Élisa**, **Stéphanie** ou encore **Salomé**. Ce fut un réel plaisir de partager le bureau avec vous.

Merci également à l'ensemble des doctorants avec qui j'ai eu la chance de partager cette aventure. Merci à toi **Ahlam**, pour ta gentillesse ; nos petites pauses café ou thé du matin me manquent depuis ton départ. Merci à **Nicolas** et **Florian** : on s'est toujours bien amusés au laboratoire, et je garde notamment en mémoire notre fameux road trip à Lille. Je vous souhaite le meilleur pour la fin de votre thèse ! Merci également à **Miguel**, **Emmanuel** et **Christelle**, que j'ai eu le plaisir de rencontrer plus tardivement.
Un grand merci également à l'ensemble des non-permanents que j'ai eu la chance de rencontrer : **Anaïs**, **Marion**, **Achouak**, **Rita**, **Aicha**, **Jérémy**, **Emma**, **Alexandra**, **Lama**, **Noémie**, **Amina**, ainsi qu'à tous les stagiaires passés par le laboratoire : **Brice, Anne-Laure, Juliette, Adrian, Laure, Ronny, Stella, Maxime**, avec qui j'ai partagé de bons moments.

Enfin, je souhaite adresser un remerciement aux membres un peu moins jeunes du laboratoire, qui ont largement contribué à rendre mon quotidien scientifique et humainement très agréable. Merci à toi, **Hélène**, pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions techniques et pour l'intérêt constant

que tu portais à mon travail. Merci à toi, **David**, pour le maintien d'une équipement toujours stérile et prêt à l'emploi, indispensable à la bonne réalisation de nos expériences. Merci également à toi **Sylvie**, pour ton aide administrative précieuse ; ok j'avoue je n'ai jamais réussi à faire valider une mission sans ton aide !
Je remercie sincèrement **Christophe**, pour m'avoir souvent « babysittée » bien tard le soir, pour ton humour, et pour avoir instauré la tradition des gâteaux à la moindre occasion. Merci à toi **Isabelle**, de m'avoir fait découvrir le monde de l'enseignement ! Et encore merci pour ton excellent gâteau aux amandes, je n'oublierai pas que tu me l'as spécialement préparé pour moi le jour de ton anniversaire. Merci également à toi **Xavier**, pour tes conseils tout au long de cette thèse, mais aussi pour ton soutien lors de mon premier congrès international, où j'étais particulièrement stressée. Merci également à **Bouchra** pour la même raison…et surtout merci à vous deux d'avoir accepté de partager quelques jours de vacances en Guadeloupe avec moi, un souvenir que je n'oublierai pas.

Enfin un immense **merci à toute ma famille**. En particulier, merci à **mes parents** d'avoir toujours été présents lorsque j'en avais besoin, pour les valeurs que vous m'avez transmises et pour m'avoir donné les moyens de poursuivre de si longues études. Je vous adresse également un petit mot de pardon pour mes visites peu fréquentes ces dernières semaines, rédaction de thèse oblige ! Mais sachez que sans votre soutien rien de tout cela n'aurait été possible. Ce travail vous est légitimement dédié, et j'espère de tout cœur que vous en serez fiers. Un grand merci à **mes frères**, Maxime et Clément pour leur soutien tout au long de mes études, ainsi qu'à mes **grands-parents**, avec une pensée toute particulière à ma grand-mère, qui nous a quittés au cours de ce travail et qui aurait été sans doute très fière.

Enfin, à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à cette thèse (et que j'ai pu oublier...), je vous adresse mes plus sincères remerciements pour votre soutien et votre présence tout au long de cette aventure.

Valorisation scientifique

Publications scientifiques avec comité de lecture

1. **Klopffer, L.**, Louvet, N., Becker, S., Fix, J., Pradalier, C., Mathieu, L., 2024. Effect of shear rate on early *Shewanella oneidensis* adhesion dynamics monitored by deep learning. *Biofilm*, *8*, 100240.
2. **Klopffer, L**., Becker, S., Mathieu, L., Louvet N., 2025. All in one: holographic microscopy unveils bacterial transport from single cells to population. (Déposé sur HAL en vue d'une soumission à *PNAS)*
3. **Klopffer, L.**, Changey, F., Merlin, C., Louvet, N., Mathieu, L. Time-dependent transcriptomic response of *Shewanella oneidensis* to hydrodynamic forces. (En préparation)
4. Becker, S., **Klopffer, L.**, Mathieu, L., Gross, M., Louvet, N. Monitoring bacteria in confined flow using digital holographic microscopy. (En préparation)

Publications dans des actes de congrès

1. Becker, S., **Klopffer, L**., Mathieu, L., Gross, M., Louvet, N., 2024. Suivi de bactéries en écoulement confiné par microscopie holographique numérique. *Congrès Francophone de Techniques Laser*, France
2. Louvet, N., **Klopffer, L**., Becker, S., Mathieu L., 2025. Suivi du transport de bactéries en milieu confiné par microscopie holographique. *26ème Congrès Français de Mécanique,* France

Communications orales internationales (*Présentateur)

1. ***Klopffer, L.**, Mathieu, L., Pradalier, C., Becker, S., Louvet, N. Deep learning and 3D holographic microscopy to assess bacterial adhesion's dynamics under shear rate in microfluidic systems. *NanoInBio 2024*, Guadeloupe, France. **Prix de la meilleure communication orale multidisciplinaire**
2. ***Klopffer, L.**, Mathieu, L., Pradalier, C., Becker, S., Louvet, N. Deep Learning and 3D Holographic Microscopy to assess the early bacterial adhesion's dynamics under shear rate in microfluidic systems. *EuroBioFilms 2024*, Copenhague, Danemark

Communications orales nationales

1. ***Klopffer, L.**, Becker, S., Mathieu, L., & Louvet, N. Deep Learning assessment of the influence of hydrodynamics on the dynamics of early bacterial adhesion. *Réseau National Biofilms 2024,* Toulouse, France. **Prix de la meilleure communication orale**
2. **Klopffer, L.**, Becker, S., Mathieu, L., & *Louvet, N. Bacteria tracking in confined flow through holographic microscopy. *Réseau National Biofilms 2024*, Toulouse, France
3. ***Klopffer, L.**, Louvet, N., *Mathieu, L. Deep learning et microscopie holographique 3D pour évaluer la dynamique d'adhésion bactérienne au sein de système microfluidique. Journée de l'AEMIP 2025, Nancy, France

Communications par affiche

1. ***Klopffer, L.**, Becker, S., Mathieu, L., & Louvet, N. Deep Learning to assess the dynamics of wall bacterial adhesion's under shear rates in microfluidic system. *Bienvenue chez les Microbes - 19ème congrès de la Société Française de Microbiologie,* 2024, Lille, France
2. **Klopffer, L.**, Becker, S., Mathieu, L., & *Louvet, N. Suivi de bactéries en écoulement confiné par microscopie holographique. *Bienvenue chez les Microbes - 19ème congrès de la Société Française de Microbiologie*, 2024, Lille, France

INTRODUCTION

Imaginez un ensemble de bactéries en suspension dans un milieu compatible à leur survie, que ce soit en termes de pH, de nutriments disponibles, de force ionique, de température ou autres paramètres physico-chimiques. Cet ensemble est confiné dans un volume et soumis à un écoulement.

Dans cet environnement, que peut-il leur arriver ? Comment peuvent-elles se comporter ? Mais également, que perçoivent-elles réellement de cet environnement ? Cette population bactérienne est physiologiquement hétérogène : certaines cellules sont dotées d'un flagelle et peuvent se mouvoir activement, tandis que d'autres suivent passivement les lignes de courant générées par l'écoulement. De manière fortuite, certaines d'entre elles vont finir par se rapprocher de la paroi du système confiné. C'est à ce moment précis qu'une fraction d'entre elles vont pouvoir initier leur transition d'un état planctonique vers un état sessile, prélude fondamental à la formation d'un biofilm.

Cette transition est gouvernée par plusieurs mécanismes de transfert, bien connus des physiciens et des mécaniciens des fluides. Les bactéries peuvent sédimenter en raison de leur masse volumique, être soumises aux mouvements Browniens du fait de leur taille proche du domaine colloïdal, ou se déplacer activement par motilité pour celles possédant des flagelles. La présence d'un écoulement complexifie ces mécanismes. Les bactéries peuvent alors, en plus des processus précédemment cités, être transportées comme des particules passives (convection) en suivant les lignes de courant. Par ailleurs dans le cas des bactéries motiles, l'inhomogénéité du champ de vitesse qu'elles rencontrent, comme dans le cas d'un écoulement de Poiseuille, se couple à leur motilité propre, perturbant ainsi leur dynamique de nage et déviant leurs trajectoires. Ce couplage donne naissance à des dynamiques de transport complexes qui peuvent affecter l'efficacité de leur approche à la paroi.

Néanmoins, une fois à la paroi, cette accession est-elle pour autant le gage d'un contact efficace et d'une fixation pérenne pour les bactéries ? De nouveaux, plusieurs scénarios possibles. Les bactéries peuvent rebondir sur la surface et retourner dans le bulk, interagir brièvement avec la surface avant de repartir, ou encore se déplacer le long de la paroi. Ces contacts initiaux, très dynamiques et fluctuants sont pour autant déterminants pour certaines bactéries qui parviennent à s'y fixer durablement, c'est le début de l'adhésion bactérienne.

La compréhension actuelle de l'adhésion bactérienne, processus largement étudié par les physico-chimistes et des microbiologistes, repose sur des interactions orchestrées par les propriétés intrinsèques des interfaces bactériennes et par les caractéristiques physico-chimiques des surfaces. Tout cela menant à un attachement irréversible des bactéries à la faveur d'une maturation des interactions, médiée par des renforcements des interactions via des réarrangements à la fois des bactéries elle-même (repositionnement de son corps cellulaire) et de ses composés de surface (appendices, protéines) pour créer de nouveaux points de contact.

Cette histoire dresse le décor de mon travail de thèse, qui s'est construit autour du développement d'approches pluridisciplinaires, visant à mieux caractériser et comprendre les mécanismes de transport à la paroi ainsi que l'adhésion des bactéries pionnières.

Ce dernier s'est organisé autour de trois objectifs principaux résumés graphiquement sur la Figure 1 :

- Le premier objectif vise à évaluer l'influence de l'hydrodynamique sur la dynamique d'adhésion pionnière, à la fois à l'échelle populationnelle par l'obtention de cinétique de colonisation, et à l'échelle individuelle, en analysant l'influence du cisaillement sur l'orientation des bactéries à la paroi, leur capacité de s'y maintenir (temps de résidence) ou de s'y déplacer **(Figure 1 cadre 1)**. Pour ce faire, une approche time-lapse couplée à un traitement d'images automatisé par deep learning a été développée afin de suivre individuellement la dynamique spatio-temporelle des bactéries à la surface.
- Le second objectif consiste à caractériser l'impact du cisaillement et du confinement sur la dynamique de transport bactérien dans le volume. Nous avons examiné les mécanismes de transport dominants selon les conditions hydrodynamiques (convection, motilité), ainsi que l'effet du cisaillement sur les trajectoires des bactéries et leur capacité à explorer leur environnement **(Figure 1 cadre 2)**. Pour y répondre, la microscopie holographique sous flux a été mise en œuvre afin de reconstruire les trajectoires Lagrangiennes en trois dimensions dans le volume et de suivre individuellement les bactéries.
- Enfin le troisième objectif vise à déterminer si les conditions hydrodynamiques imposées induisent un impact biologique sur les cellules. Nous nous sommes interrogés sur leur capacité à percevoir le flux (dommages membranaires, mécanisme de mécanosensation), ainsi que sur l'éventuelle activation d'une réponse biologique : des modifications énergétiques, métaboliques ou encore liées à la motilité. Pour y répondre, une analyse transcriptomique globale a été réalisée afin d'identifier les voies génétiques modulées par l'exposition au cisaillement. **(Figure 1 cadre 3)**.

Pour répondre à ces objectifs, le manuscrit est structuré en plusieurs chapitres. Tout d'abord une synthèse bibliographique (**Chapitre 1**), qui commence par quelques notions d'hydrodynamiques nécessaires à la compréhension de l'étude, puis qui aborde le transport bactérien, avec un focus sur la nage d'un point de vue biologique et physique. Une section dédiée aux concepts de l'adhésion bactérienne aux surfaces est ensuite détaillée. Pour ces deux volets, les connaissances actuelles sur l'influence de l'hydrodynamique sont présentées. Cet état de l'art propose enfin un aperçu des méthodes de *tracking* bactérien, ainsi qu'une présentation de la souche modèle, *Shewanella oneidensis* MR-1. Le chapitre Matériel et Méthodes (**Chapitre 2**) détaille ensuite le matériel utilisé et les méthodologies adoptées dans le cadre de cette étude. Il est suivi de trois chapitres de résultats, chacun correspondant à un des objectifs présentés. Le **Chapitre 3** traite de la dynamique d'adhésion pionnière par deep learning, le **Chapitre 4** s'intéresse à la dynamique des bactéries sous écoulement par microscopie holographique et le **Chapitre 5** aborde la réponse cellulaire des bactéries planctoniques soumises à l'écoulement.

Ces trois chapitres sont structurés autour d'articles scientifiques en anglais, publié, soumis ou en préparation, et sont complétés au besoin par des éléments de contextualisation, de validation méthodologique ou de résultats complémentaires. Enfin le manuscrit se conclut par une discussion générale et des perspectives de recherche sont proposées (**Chapitre 6**).

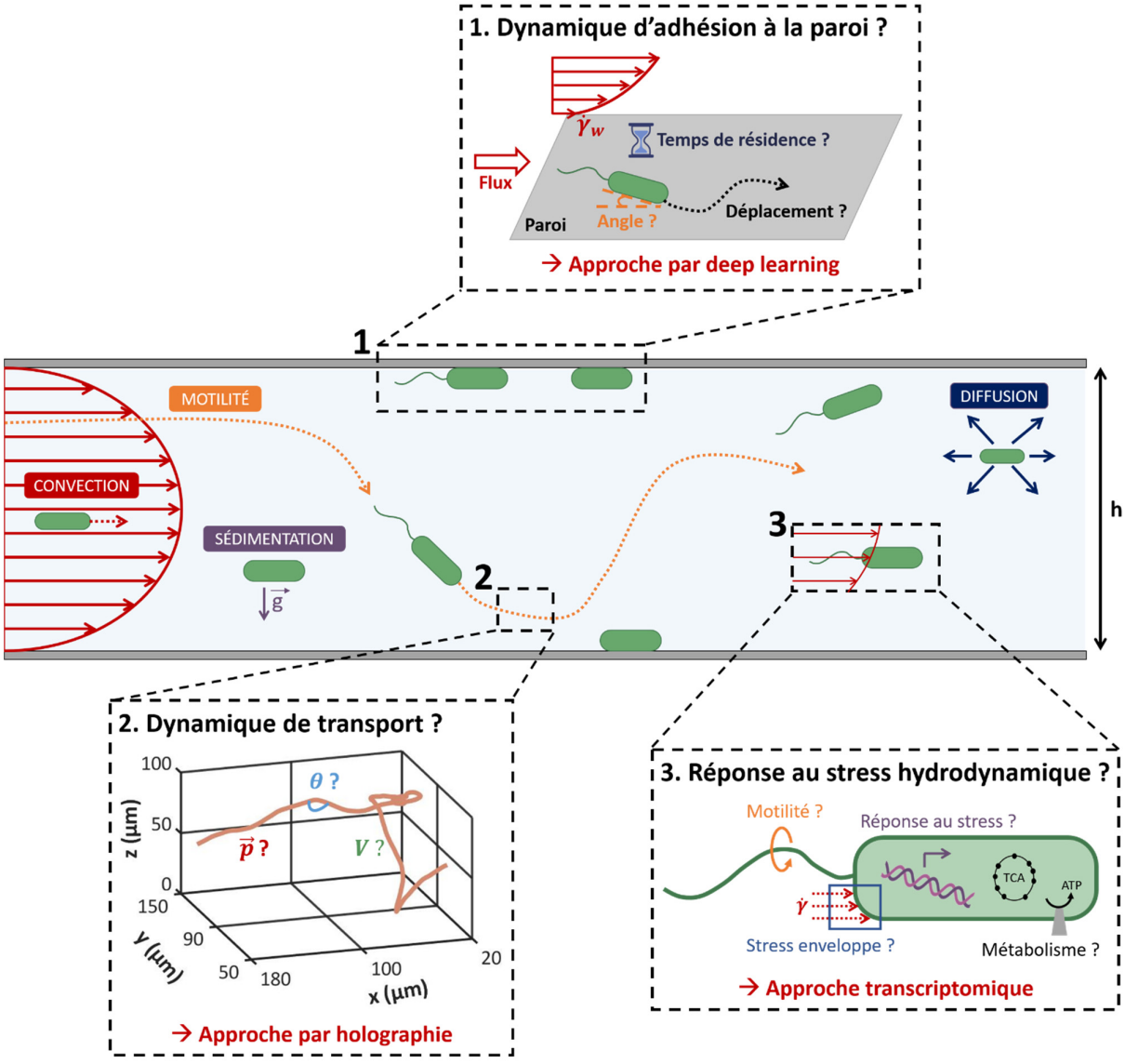


Figure 1. Représentation graphique du projet de thèse

CHAPITRE 1 :

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre présente un état de l'art des connaissances actuelles relatives aux différents points d'intérêt de cette thèse. Nous précisons ici, afin d'éviter toute confusion, que dans l'ensemble de ce manuscrit les termes surface et paroi désignent une surface solide susceptible d'être colonisée par les bactéries ; lorsque la surface ou la paroi bactérienne sera mentionnée, cela sera explicitement indiqué.

1 Notions générales d'hydrodynamique

L'hydrodynamique étudie la dynamique des fluides, c'est-à-dire leurs écoulements, leurs interactions et les forces qui en résultent. Avant d'analyser la dynamique des bactéries immergées dans un fluide, il est indispensable de comprendre le comportement du fluide qui les transporte. De ce fait, cette section a pour objectif de présenter les concepts fondamentaux de l'hydrodynamique qui seront utilisés dans ce manuscrit. Ces notions sont appliquées spécifiquement à l'écoulement d'un fluide newtonien incompressible au sein de nos deux systèmes d'étude :

- Un canal microfluidique de section rectangulaire (chapitres 3 et 4)
- Un tube cylindrique de rayon millimétrique (chapitre 5).

Bien que leurs géométries diffèrent, les écoulements dans ces deux systèmes sont régis par les mêmes équations fondamentales de Navier-Stokes, qui seront présentées ci-après.

1.1 Les équations de Navier-Stokes

L'application du principe fondamental de la dynamique à un volume élémentaire de fluide incompressible de masse volumique ρ, et newtonien, de viscosité dynamique η (indépendante du taux de cisaillement), conduit à l'équation de Navier-Stokes. Cette dernière, assortie de conditions aux limites permet de définir le champ de vitesses $\vec{V}$ et de pression p (Guyon *et al*., 2012 ; Bruus, 2007) :

$$\rho \frac{\partial \vec{V}}{\partial t} + \rho\left(\vec{V}.\overrightarrow{\mathrm{grad}}\right)\vec{V} = -\overrightarrow{\mathrm{grad}}\, p + \eta \Delta \vec{V} + \rho \vec{g} \qquad (1)$$

Le membre de gauche de l'équation, $\rho \frac{\partial \vec{V}}{\partial t} + \rho\left(\vec{V}.\overrightarrow{\mathrm{grad}}\right)\vec{V}$, représente l'accélération du fluide, c'est-à-dire la variation de sa vitesse $\vec{V}$ à la fois temporelle $(\frac{\partial \vec{V}}{\partial t})$ et spatiale $(\left(\vec{V}.\overrightarrow{\mathrm{grad}}\right)\vec{V})$ par convection. Le membre de droite décompose l'ensemble des forces qui agissent sur le fluide. Des forces de surface : 1) force normale de pression $(-\overrightarrow{\mathrm{grad}}\, p)$ générée par des différences de pression et 2) force tangentielle d'origine visqueuse $(\eta \Delta \vec{V})$, issue de la friction interne entre les couches adjacentes du fluide. Le terme de force gravitationnelle $(\rho \vec{g})$, qui est une force de volume, traduit le poids du fluide dû à la gravité. Cette équation indique que l'accélération d'un volume de fluide est exactement compensée par la somme des forces qui s'y appliquent. Notons que la résolution analytique de cette dernière est complexe, voire impossible dans certains cas en raison de la non-linéarité du terme convectif $(\left(\vec{V}.\overrightarrow{\mathrm{grad}}\right)\vec{V})$.

1.2 Nombre de Reynolds et régime d'écoulement

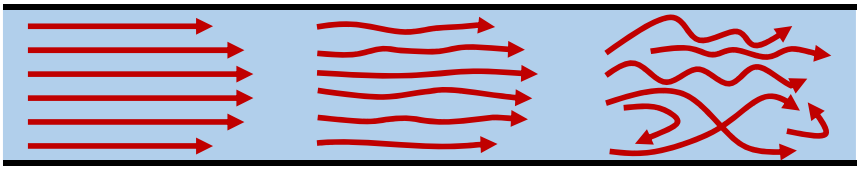
La nature de l'écoulement dépend de l'importance relative des effets d'inertie (terme convectif de l'équation 1) et des effets visqueux, ce qui a conduit à l'introduction du nombre de Reynolds Re, en hommage au scientifique du même nom (Reynolds, 1883). Ce dernier, sans dimension, caractérise le rapport entre ces deux forces et se définit par :

$$Re = \frac{\left|\rho\left(\vec{V}.\overrightarrow{\text{grad}}\right)\vec{V}\right|}{\left|\left(\eta\Delta\vec{V}\right)\right|} = \frac{\rho\bar{V}D_h}{\eta} = \frac{\bar{V}D_h}{\nu} \qquad (2)$$

Il dépend d'une longueur caractéristique du système : le diamètre hydraulique D_h ($D_h = \frac{4S}{P}$ avec S la section de passage du fluide et P son périmètre), d'une vitesse caractéristique de l'écoulement, généralement sa vitesse moyenne ($\bar{V}$ en m/s), ainsi que de ses propriétés intrinsèques, sa masse volumique (ρ en kg/m^3) et sa viscosité dynamique (η en kg.m^{-1}.s^{-1}) ou cinématique (en m²/s, $\nu = \eta/\rho$).

Le nombre de Reynolds permet de distinguer quatre régimes d'écoulement : écoulement rampant, dit Stokes (Re<<1), écoulement laminaire (Re<2000), écoulement transitoire (2000< Re<4000) et enfin écoulement turbulent (>4000). Les caractéristiques principaux de ces différentes régimes sont résumés ci-dessous (Çengel et Cimbala, 2014 ; Lashgari *et al.*, 2014).

Tableau 1. Classification des écoulements selon le nombre de Reynolds *Re*

Régime d'écoulement	**Rampant / Laminaire**	**Transitoire**	**Turbulent**
Schématisation			
Re	<<2000	2000 - 4000	> 4000
Forces dominantes	Visqueuses	Equilibrées	Inertielles
Caractéristiques principales	Couches ordonnées Écoulement stable	Instabilités Début de mélange	Mélange chaotique

Dans la majeure partie de notre étude, l'écoulement a été réalisé dans un système microfluidique. Les grandeurs caractéristiques de ces systèmes sont généralement comprises entre 100 nm et 1 mm, et les vitesses de l'ordre de 1 µm/s à 1 cm/s (Chen *et al.*, 2021). Ainsi, en considérant un liquide proche de l'eau (ρ = 1000 kg/m^3 et η = 10^{-3} Pa.s), les valeurs de Reynolds caractéristiques de ces systèmes sont extrêmement faibles, généralement comprises entre 10^{-6} et 1, pouvant aller jusqu'à 10. Les écoulements sont donc de type rampant ou laminaire, et les termes inertiels deviennent négligeables face aux forces visqueuses dominantes.

Par conséquent, l'équation de Navier-Stokes se simplifie en l'équation de Stokes, forme linéaire adaptée aux écoulements de ce type :

$$\eta \Delta \vec{V} = \overrightarrow{\text{grad}}\, p - \rho \vec{g} \tag{3}$$

1.3 Cas d'un écoulement au sein d'un capillaire de section rectangulaire

Nous proposons ici de résoudre l'équation de Navier-Stokes au sein de notre système microfluidique d'étude : un capillaire en verre de section rectangulaire de largeur w, de hauteur h et de longueur L, avec un rapport d'aspect important ($w/h = 10$). Les hypothèses suivantes sont posées : l'écoulement est stationnaire, établi et unidirectionnel, induit par une différence de pression Δp entre les extrémités du capillaire. L'écoulement est en régime laminaire (Re < 10), ce qui permet de négliger le terme convectif et d'utiliser la forme linéaire de l'équation (équation 3). À cette petite échelle, le terme de pesanteur peut également être négligé. L'équation de Navier-Stokes se réduit donc à :

$$\eta \Delta \vec{V} = \overrightarrow{\text{grad}}\, p \tag{4}$$

Sous les hypothèses ci-dessus le champ de vitesse s'écrit : $\vec{V} = V_x(y,z)\vec{e}_x$. L'équation (4) devient :

$$\left(\frac{\partial^2 V_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 V_x}{\partial z^2}\right) = \frac{-\Delta p}{\eta L} \qquad \text{pour } \frac{-w}{2} < y < \frac{w}{2} \; ; \; 0 < z < h \tag{5a}$$

Avec les conditions aux limites de non-glissement sur toutes les parois :

$$V_x(y,z) = 0 \quad \text{pour } y = \pm\frac{w}{2} \; ; z = 0, z = h \tag{5b}$$

Et les conditions aux limites sur les pressions :

$$p(x=0) = p_0 \quad \text{et} \quad p(x=L) = p_L \quad ; \quad avec\ \Delta p = p_0 - p_L \tag{5c}$$

La solution de ce système d'équations est permise par un développement en série de Fourier, qui permet d'exprimer le champ de vitesse comme suit (Bruus, 2007) :

$$V_x(y,z) = \frac{4h^2 \Delta p}{\pi^3 \eta L} \sum_{n,impair}^{\infty} \frac{1}{n^3} \left[1 - \frac{cosh\left(n\pi \frac{y}{h}\right)}{cosh\left(n\pi \frac{w}{2h}\right)}\right] sin\left(n\pi \frac{z}{h}\right) \tag{6}$$

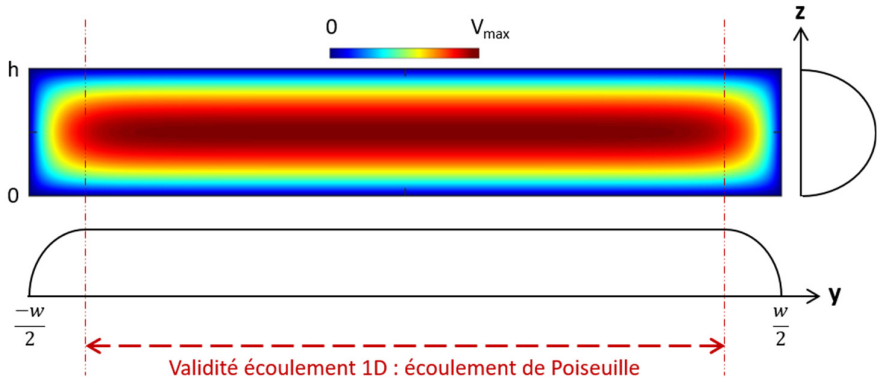


Figure 2. Profil de vitesse unidirectionnel d'un fluide newtonien dans un capillaire rectangulaire avec un rapport d'aspect $w/h = 10$ et $n = 3$ (équation 6). Les coordonnées y et z représentent respectivement la largeur et la hauteur du capillaire, tandis que x est la direction de l'écoulement.

Ce champ de vitesse est représenté Figure 2 pour un capillaire à fort rapport d'aspect ($w/h = 10$). On observe que le profil de vitesse $V_x(y,z)$ varie selon l'axe z mais qu'il est pratiquement indépendant de l'axe *y :* cela se traduit par une large zone centrale (en pointillés) de vitesse uniforme le long de y.
Dans cette région en pointillée, le profil de vitesse est très similaire à celui d'un écoulement de Poiseuille plan (entre deux plaques infinies). Il est donc possible d'approximer le profil de vitesse par un écoulement de Poiseuille unidimensionnel (profil parabolique), et de calculer la vitesse à l'aide de la formule suivante (Bruus, 2007) :

$$V_x(z) = \frac{\Delta p}{2\eta L}(h - z)z \tag{7}$$

La détermination du champ de vitesse permet d'accéder à une autre grandeur caractéristique des écoulements : le débit volumique Q. Ce dernier est défini comme le flux volumique total passant à travers la section S du système étudié :

$$Q = \iint_S V_x(y,z)dydz = \int_{y=-w/2}^{w/2}\int_{z=0}^{h} V_x(y,z)dydz \tag{8}$$

En insérant l'équation (6) dans l'expression (8) on obtient pour le débit volumique :

$$Q = \frac{h^3\, w\, \Delta p}{12\, \eta\, L}\left[1 - \sum_{n,impair}^{\infty} \frac{1}{n^5}\,\frac{192}{\pi^5}\,\frac{h}{w} tanh\left(n\pi\frac{w}{2h}\right)\right] \tag{9}$$

Dans notre cas, lorsque le rapport d'aspect $\frac{w}{h} \to \infty$, la tangente hyperbolique $tanh\left(n\pi\frac{w}{2h}\right) \to 1$, ce qui permet de faire l'approximation suivante sur le débit :

$$Q = \frac{h^3\, w\, \Delta p}{12\, \eta\, L}\left[1 - 0.630\,\frac{h}{w}\right] \tag{10}$$

Étant donné que notre rapport $\frac{h}{w} = 0{,}1$; cette formule se rapproche de celle de l'écoulement de Poiseuille plan, avec une erreur d'environ 7 % par rapport à la solution exacte (équation 9) :

$$Q = \frac{h^3\, w}{12\, \eta\, L}\Delta p \tag{11}$$

Les approximations de Poiseuille, appliquées à la détermination de la vitesse et du débit (équations 7 et 11), permettent de définir deux caractéristiques complémentaires de l'écoulement : sa vitesse maximale $V_{\max}$, qui se situe au centre du capillaire à $h/2$ (profil parabolique ; Figure 2), ainsi que la vitesse moyenne $\bar{V}$ sur la section. Les formules sont données ci-dessous :

$$V_{\max} = V_x\left(z = \frac{h}{2}\right) = \frac{\Delta p h^2}{8\eta L} \tag{12}$$

Et la vitesse moyenne :

$$\bar{V} = \frac{Q}{S} = \frac{h^2 \Delta p}{12\eta L} = \frac{2}{3}V_{\max} \tag{13}$$

1.4 Contrainte et taux de cisaillement

Comme illustré à la Figure 3, l'écoulement d'un fluide visqueux génère un profil de vitesse non uniforme à l'intérieur du capillaire : la vitesse est nulle aux parois et maximale au centre. Ce gradient de vitesse est directement lié aux forces de frottement visqueux, qui sont ensuite transmises progressivement aux couches internes du fluide, entraînant une dissipation de l'énergie cinétique. Cette différence de vitesse, engendrée par une contrainte de cisaillement τ, provoque un taux de déformation locale du fluide (Guyon *et al.*, 2012). La contrainte représente la force tangentielle F (en N) par unité de surface S (en m²) selon la formule : $\tau = \frac{F}{S}$. Pour un fluide newtonien, cette contrainte τ est directement proportionnelle au taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ (en s^{-1}), conformément à la loi de Newton :

$$\tau = \eta\,\dot{\gamma} \tag{14}$$

Avec η la viscosité du fluide considéré, constante (indépendante du taux de cisaillement) pour un fluide newtonien. Le taux de cisaillement $\dot{\gamma}$ mesure la variation locale de vitesse entre deux couches fluides adjacentes, autrement dit le glissement entre ces couches. Il s'écrit, dans le cas de notre système capillaire :

$$\dot{\gamma} = \frac{dV_x(z)}{dz} \tag{15}$$

Dans le cas de l'écoulement de Poiseuille, le taux de cisaillement maximal $\dot{\gamma}_w$ se situe à la paroi, en raison du gradient de vitesse maximal à cet endroit. En effet, la condition de non-glissement impose une vitesse nulle à la paroi, tandis que la vitesse augmente rapidement à l'intérieur du fluide. A l'inverse, au centre du canal, la vitesse atteint son maximum et le gradient de vitesse est nul, par conséquent le cisaillement y est nul.

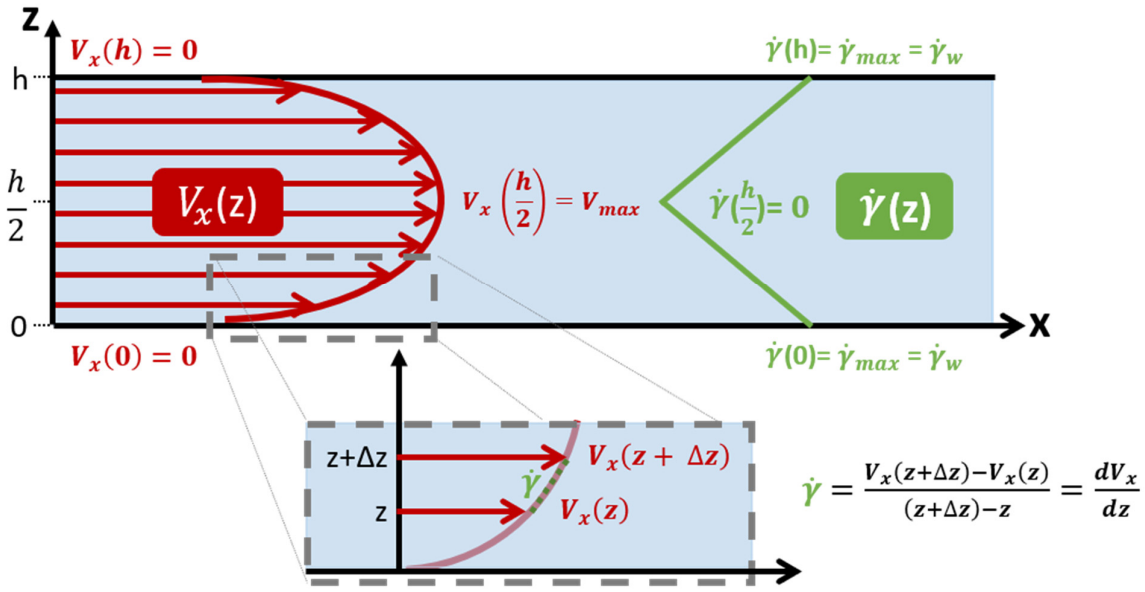


Figure 3. Illustration du gradient de vitesse $V_x(z)$ et du taux de cisaillement $\dot{\gamma}(z)$ pour un fluide newtonien en écoulement dans un capillaire rectangle. Adapté de Lewandowski et Beyenal (2013).

Le taux de cisaillement à la paroi constitue un paramètre déterminant dans les interactions entre les surfaces et les bactéries (Chang *et al.*, 2020 ; Lecuyer *et al.*, 2011 ; Park *et al.*, 2011); par conséquent il influence de manière significative les phénomènes d'adhésion bactérienne et de formation de biofilm, comme nous en discuterons dans la suite de ce manuscrit. C'est un paramètre qui dépend de la vitesse d'écoulement et de la viscosité du fluide, mais également des dimensions du système (Busscher et Van Der Mei, 2006). Dans le cas du capillaire rectangulaire à fort rapport d'aspect, connaissant le champ de vitesse, le débit d'écoulement Q et les dimensions du système, il est possible de l'exprimer de la manière suivante :

$$\dot{\gamma}_w = \frac{6Q}{wh^2} \tag{16}$$

1.5 Cas d'un écoulement au sein d'un tube cylindrique

La résolution des équations de Navier-Stokes dans différentes géométries, notamment les canaux rectangulaires et les tuyaux cylindriques, est bien documentée dans la littérature (Bruus, 2007). Après avoir détaillé la solution analytique pour une section rectangulaire, nous présentons ici la solution classique (loi de Poiseuille) obtenue pour un écoulement laminaire dans un tuyau cylindrique droit de rayon R et de longueur L. Les mêmes hypothèses sont posées concernant le fluide en écoulement (Paragraphe 1.3).

Dans ces conditions, le profil de vitesse axial $V_x(r)$ se distribue de manière parabolique et ne dépend que de la coordonnée radiale r :

$$V_x(r) = \frac{\Delta p}{4\eta L}(R^2 - r^2) \tag{17}$$

L'intégration de ce profil sur la section transversale permet l'obtention du débit volumique Q :

$$Q = \int_0^R 2\pi r V_x(r) dr = \frac{\pi R^4 \Delta p}{8\eta L} \tag{18}$$

On définit le taux de cisaillement local de la même manière que précédemment, c'est-à-dire comme le gradient de vitesse :

$$\dot{\gamma}(r) = \frac{dV_x(r)}{dr} = \frac{\Delta p}{2\eta L} r \tag{19}$$

En évaluant l'équation (19) à la paroi ($r = R$), et en utilisant la formule du débit (équation 18), on obtient le taux de cisaillement à la paroi suivant :

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4Q}{\pi R^3} \tag{20}$$

2 Mécanismes de transport des bactéries

Après avoir exposé les fondamentaux de l'hydrodynamique régissant l'écoulement dans nos systèmes, cette partie aborde la réponse comportementale des bactéries dans un fluide en explorant en particulier les points suivants : 1) comment les bactéries sont transportées par le fluide en mouvement en combinant transport passif et motilité active et 2) comment l'hydrodynamique influe cette dynamique de transport.

2.1 Transport passif

Quatre mécanismes de transport sont rapportés dans la littérature (Berne *et al.*, 2018; Carniello *et al.*, 2018) et discutés brièvement ci-dessous : la diffusion, la sédimentation, la convection et la motilité bactérienne. Les trois premiers, qui font l'objet de cette partie correspondent à des mécanismes passifs de transport, alors que la motilité, conditionnée par la présence d'appendices, est un mécanisme de transport actif, résultant de la capacité propre du microorganisme à se mouvoir dans son environnement. Ce dernier mécanisme de transport est abordé dans la section suivante.

2.1.1 La diffusion brownienne

De par leur taille de l'ordre du micromètre et de leur faible densité, les bactéries peuvent être qualifiées de particules colloïdales, et sont de ce fait soumises à la diffusion brownienne. Les mouvements browniens des particules correspondent à des déplacements chaotiques dus à leurs collisions avec les molécules du fluide qui les entourent en raison de l'agitation thermique. Cela génère des trajectoires de particules non corrélées, avec des changements aléatoires et fréquents de direction qui engendrent des déplacements totaux faibles. On parle de marche aléatoire (« *random walk* ») (Berne *et al.*, 2018 ; Libchaber, 2019 ; Mo et Raizen, 2019 ; Wu et Libchaber, 2000).

Différents travaux ont permis l'établissement d'équations pour décrire le mouvement brownien et déterminer un coefficient de diffusion D pour quantifier le flux de matière en résultant (Libchaber, 2019 ; Mo et Raizen, 2019). Dans le cadre de notre étude, en considérant une bactérie comme une particule lisse, sphérique et non déformable, le coefficient de diffusion peut être déterminé selon la formule de Stokes-Einstein : $D = kT/6\pi\eta R$ (Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Kim, 1996 ; Berg, 1993), avec k la constante de Bolzmann, T la température en Kelvin, η la viscosité du fluide et R le rayon de la bactérie. L'équation indique que le flux de matière sera plus efficace pour de petites particules et au sein d'un fluide faiblement visqueux et à température élevée. Ce flux participe au transport de bactéries; néanmoins du fait de sa taille, les coefficients de diffusion des bactéries en milieu liquide sont relativement faibles : entre 10^{-12} à 10^{-13} m²/s (Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Mueller, 1996). À titre d'exemple, ce coefficient indique qu'il faut 2 à 3 secondes pour déplacer une bactérie d'une longueur égale à sa taille par diffusion.

2.1.2 La sédimentation

En raison de la différence de masse volumique entre une bactérie et le fluide qui l'entoure, en particulier sa viscosité, les bactéries sous également sujettes à la sédimentation. On la caractérise par une vitesse de sédimentation (V_s) déterminée suivant la loi de Stokes : $V_s = 2R^2 g\Delta\rho/9\eta$ (Wan *et al.*, 1995 ; Berg 1993) avec R le rayon de la bactérie, g la constante gravitationnelle, $\Delta\rho$ la différence de masse volumique entre la bactérie et le fluide et η la viscosité dynamique. D'après la littérature, la densité d'une bactérie est relativement proche de celle de l'eau et peut varier de 1,01 et 1,09 g/cm^3 (McClaine et Ford, 2002 ; Wan *et al.*, 1995), ce qui en fait des entités faiblement sédimentables en milieux aqueux, avec des vitesses

comprises entre 0,08 et 0,2 µm/s (Wan *et al*., 1995). Malgré ces faibles valeurs, la gravité contribue au dépôt cellulaire et peut influencer la colonisation en conditions expérimentales *(*Hogan *et al*., 2023 *;* Li *et al*., 2011b).

2.1.3 La convection

Le phénomène de convection est lié à la vitesse de l'écoulement du fluide. En régime laminaire, les bactéries peuvent être transportées suivant les lignes de courant de l'écoulement, se comportant alors de manière similaire à celle de particules passives. Ce phénomène de convection contribue à augmenter la probabilité de collision d'une bactérie avec une surface, et est d'autant plus important que la vitesse de l'écoulement est élevée (Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Carniello *et al*., 2018 ; Mueller, 1996), nous y reviendrons dans la section 3.3 (Chapitre 1).

Ces 3 mécanismes passifs peuvent contribuer à l'accès des bactéries aux surfaces et leur colonisation. Néanmoins, ce sont les conditions hydrodynamiques qui déterminent leur importance relative (Bakker *et al.,* 2002 ; Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Carniello *et al.*, 2018). Dans un écoulement rampant, le transport se fait majoritairement par sédimentation et diffusion. En régime laminaire, convection et diffusion sont dominants, avec des contributions différentes en fonction de la vitesse du fluide. En régime turbulent, le flux aléatoire et multidirectionnel rend le transport à la paroi majoritairement convectif. La contribution relative de ces mécanismes peut être examinée à l'aide de temps caractéristiques, correspondant au temps nécessaire pour qu'une bactérie parcoure une certaine distance par sédimentation, diffusion ou convection, ce qui permet de comparer leur efficacité respective (Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Bruus, 2007). Outre ces mécanismes passifs, la motilité bactérienne favorise également le contact des bactéries avec les surfaces, cette dernière fait l'objet des paragraphes suivants.

2.2 Transport actif lié à la motilité bactérienne

En parallèle des mouvements passifs, certaines bactéries peuvent se déplacer activement pour trouver des ressources nutritives, coloniser de nouvelles niches ou fuir des prédateurs et conditions défavorables. Différents types de motilité existent (Mazza, 2016 ; Partridge, 2022 ; Wadhwa et Berg, 2022) : la nage en milieu liquide («swimming») et les déplacements sur surfaces solides, incluant le «swarming», un mouvement collectif nécessitant la présence de flagelle, le « twitching », rendu possible par des cycles rapides d'extension et de rétraction des pili de type IV, le « gliding », un déplacement lent impliquant des complexes d'adhésion qui se lient au substrat et se déplacent au sein de la cellule, et enfin le « sliding », un déplacement passif provoqué par la croissance de la colonie. Dans cette partie, l'accent est mis uniquement sur la nage en milieu liquide, en raison de son implication dans le transfert des bactéries à la paroi. Avec des vitesses entre 20 et 100 µm/s (Armitage, 2024 ; Marcos *et al.*, 2012 ; Nakamura et Minamino, 2019) ; de nombreuses études ont en effet montré que les bactéries motiles étaient plus efficaces que leurs

mutants non motiles pour l'accès à la surface et sa colonisation (Korber *et al*., 1989 ; McClaine et Ford, 2002 ; Secchi *et al*., 2020 ; Zheng *et al.*, 2021).

2.2.1 Nage bactérienne d'un point de vue biologique

2.2.1.1 Structure et assemblage du flagelle bactérien

La nage bactérienne est conditionnée par la présence d'un ou plusieurs flagelles (Kaplan *et al.*, 2019 ; Wadhwa et Berg, 2022). Le flagelle est une machine moléculaire complexe, typiquement composée d'un filament et d'un crochet, extracellulaires, et d'un corps basal membranaire (Figure 4).

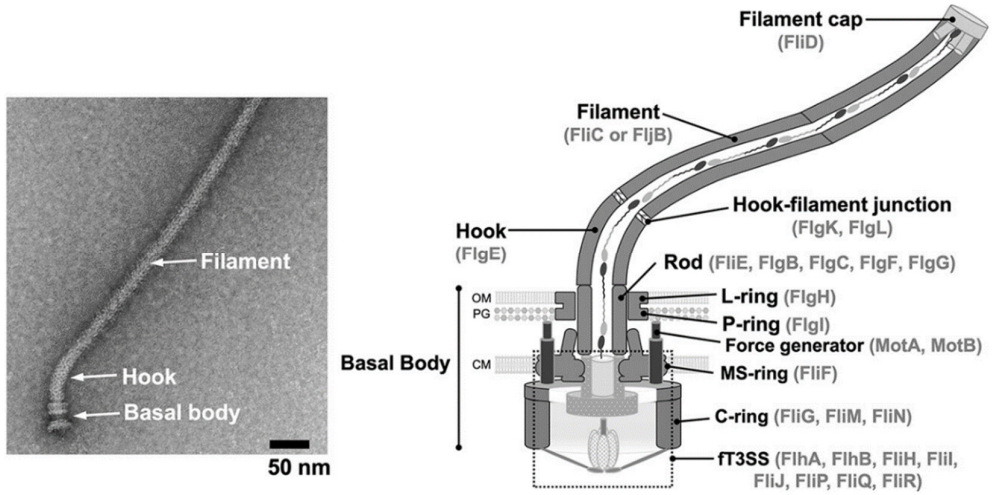


Figure 4. Flagelle de *Salmonella enterica* observé en micrographie électronique (à gauche) et représentation schématique (à droite). Le schéma illustre la structure du flagelle composée d'un système de sécrétion de type III (Ft3SS), d'un corps basal membranaire, d'un crochet, d'un filament et d'une coiffe. Les unités de stator (MotA et MotB) ne sont pas représentées. Les sous-unités structurelles sont exportées via le système de sécrétion de type III situé à la base du flagelle, puis s'assemblent à l'extrémité de la structure en croissance. Légende : OM : membrane externe ; PG : couche de peptidoglycanes ; CM : membrane cytoplasmique D'après Minamino *et al.* (2003).

Ce dernier est constitué du moteur flagellaire composé d'une tige mobile entourée d'anneaux ou rotor (L ring, P ring, MS ring et C ring) et d'une partie statique, le stator. Ce dernier est composé des protéines MotA et MotB, formant un canal membranaire qui permet le transport des protons le long de leur gradient (extérieur vers intérieur cellulaire). Le moteur permet la conversion du flux ionique présent à l'extérieur de la cellule (forme motrice H^+ ou autres cations tels que Na^+ (Armitage, 2024 ; Mondino *et al.*, 2022)) en force mécanique, ce qui entraîne la rotation du rotor et du filament et génère une force de poussée suffisante pour contrer la force d'entraînement visqueux agissant sur la cellule et la propulser vers l'avant (Chang *et al.*, 2021 ; Nakamura et Minamino, 2024 ; Thormann *et al.*, 2022). Le corps basal est également composé d'un système de sécrétion de type III, participant à l'export des composants axiaux du flagelle (Nedeljković *et al.*, 2021 ; Mondino *et al.*, 2022 *;* Nakamura et Minamino*,* 2024). Enfin, le crochet (protéines FlgE) permet la courbure du flagelle et assure la transmission du mouvement entre corps basal et filament.

Ce dernier, long et fin (≈ 20 nm de diamètre et 15 µm de long) est composé d'un assemblage de flagellines (30 000 résidus chez *E. coli*), surmonté d'une coiffe (protéine FliD). Le type, nombre et organisation de ces flagellines varient selon l'espèce et les conditions environnementales (Kühn *et al.*, 2017, 2018).

Le flagelle, présent chez plus de 80 % des espèces bactériennes (Bouteiller *et al.*, 2021), est probablement la machinerie protéique bactérienne la plus complexe et élaborée. Dans le cas de *E. coli* par exemple, son assemblage nécessite l'expression de plus de 50 gènes (Apel et Surette, 2008). Cet assemblage et fonctionnalisation se fait de manière séquentielle (Li et Sourjik, 2011 ; Macnab, 2003). C'est un processus chronophage : environ une heure (Subramanian et Kearns, 2019) et coûteux en énergie, puisque chez *E. coli* la synthèse du flagelle consomme jusqu'à 2 % des ressources métaboliques de la cellule (Smith et Chapman, 2010 ; Bouteiller *et al.*, 2021). Sa synthèse est sous le contrôle d'un système de régulation transcriptionnel hiérarchisé impliquant 3 classes principales de gènes : Classe I (*flhDC*), classe II (gènes codant pour les composant de la structure basale) et classe III (gènes de la synthèse de la flagelline et des protéines de la coiffe) (Aldridge, 2002 ; Nedeljković *et al.*, 2021 ; Osterman *et al*., 2015 ; Sun *et al*., 2022).

2.2.1.2 Comportement de nage bactérien

Le déplacement des bactéries dépend de la localisation et de leur nombre de flagelle (Figure 5). Ces caractéristiques varient en fonction des espèces ; donnant naissance à la nomenclature suivante (Thormann *et al.*, 2022) : 1) les bactéries monotriches, qui possèdent un unique flagelle, localisé à un de ces pôles (c'est le cas de *Shewanella*), 2) les bactéries amphitriches qui en possèdent un à chaque pôle (exemple de *Campylobacter*), 3) les bactéries lopotriches qui possèdent plusieurs flagelles polaires (exemple d'*Helicobacter*), 4) les bactéries bilophotriches qui en possèdent plusieurs aux deux pôles (comme *Borrelia*) et enfin 5) les bactéries péritriches qui en possèdent plusieurs avec l'exemple de *E. coli*.

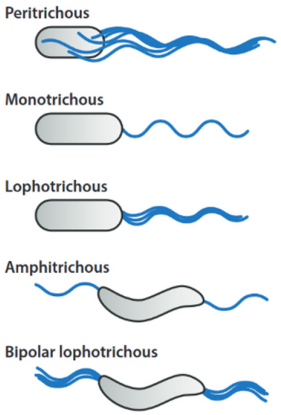


Figure 5. Architectures flagellaires et leur nomenclature. D'après Thormann *et al*. (2022).

En fonction de ces caractéristiques, les bactéries ont développé différentes stratégies de nage afin de se déplacer et changer de direction (Grognot et Taute, 2021 ; Thormann *et al.*, 2022 ; Wadhwa et Berg, 2022).

Parmi celles-ci, le « Run-and-Tumble » (Figure 6), caractérisé par une alternance de trajectoires unidirectionnelles ou « runs » et de culbutes ou « tumbles », décrit majoritairement chez *E. coli* et autres bactéries péritriches. Par défaut, leurs flagelles tournent dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (*counterclock wise*, CCW) et se rassemblent pour former un faisceau qui propulse la cellule vers l'avant. La désynchronisation d'un ou plusieurs flagelles, c'est-à-dire le changement de leur sens de rotation provoque une dislocation du faisceau et une réorientation de la cellule. Chez les bactéries possédant un unique flagelle polaire, plusieurs comportements de nage existent : le « Run-Reverse-Flick » (Figure 6) observé pour la première fois chez *Vibrio alginolyticus* (Son *et al.*, 2013). Cette nage est caractérisée par une propulsion de la cellule vers l'avant (« Run ») lorsque que le flagelle tourne dans le sens inverse des aiguilles d'une montre (CCW) et d'une traction vers l'arrière (« Reverse ») lorsqu'il tourne dans le sens horaire (*clock wise*, CW). Cette traction, couplée à la compression et déformation du crochet lorsque la rotation anti-horaire est rétablie permet la réorientation de la cellule de 90° environ (« Flick »). Chez certaines autres bactéries monotriches telles *P. aeruginosa*, la nage se fait également par « Run » et « Reverse » mais sans « Flick » (Figure 6). À la place, suite au changement de sens de rotation du flagelle, les cellules mettent leur motilité en pause, permettant un réalignement du corps cellulaire, associé à un changement de direction.

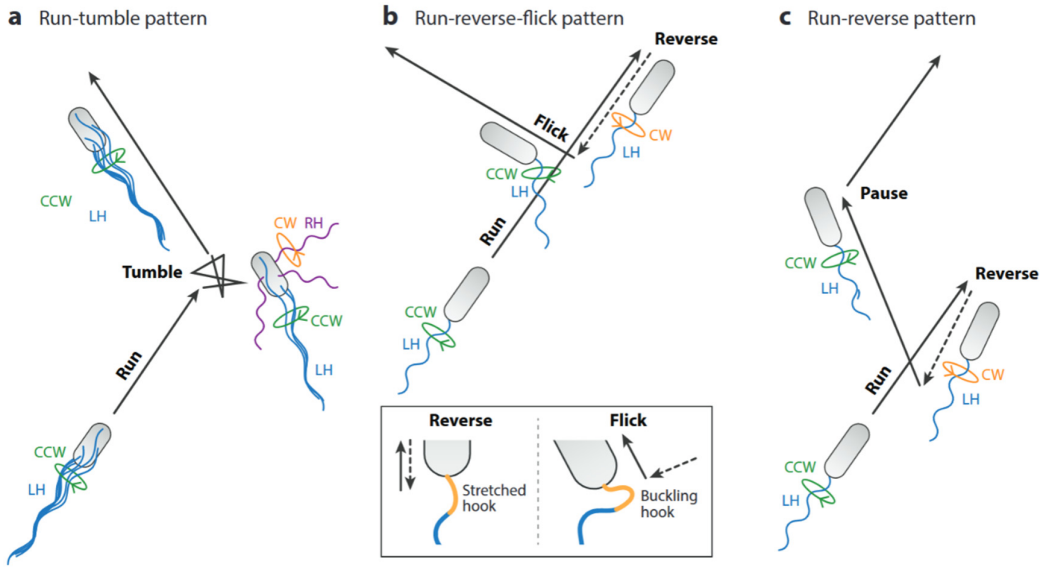


Figure 6. Principaux modes de nage des bactéries flagellées. a) « Run-and-Tumble » d'*E. coli*, b) « Run-reverse-flick », c) « Run-reverse ». Légende : CCW : rotation anti-horaire ; CW : rotation horaire ; LH : hélice gauche ; RH : hélice droite. D'après Thormann *et al.* (2022).

Chez certaines de ces bactéries monoflagellées, le flagelle peut également s'enrouler autour du corps cellulaire pour permettre à la bactérie de se propulser en avant (Grognot et Taute, 2021 ; Hintsche *et al.*, 2017 ; Kühn *et al.*, 2018). Cette configuration enveloppée ou « wrapping », est vu comme un moyen de s'échapper de passages étroits/confinés et de conserver une motilité en milieu fortement visqueux.

Notons également, le comportement de nage « Run-Slowrun » observé chez *Sinorhizobium meliloti* par exemple, qui modifie la vitesse de rotation de ses moteurs pour changer de direction ou encore le comportement de nage distinctif des spirochètes, dont le corps cellulaire est sous forme de spirale et qui possède des flagelles périplasmiques (Nakamura et Minamino, 2019).

2.2.1.3 Facteurs impactant la nage bactérienne

La section précédente a présenté la nage bactérienne en l'absence d'interactions externes. Néanmoins, elle est modulée par de nombreux facteurs physico-chimiques et mécaniques. Certains influencent directement la synthèse, la structure, l'assemblage ou la rotation du flagelle. Parmi eux nous pouvons citer la température (Maeda *et al*., 1976 ; Paksanont *et al*., 2018 ; Cho *et al*., 2022), le pH (Minamino *et al.*, 2003), la viscosité (Schneider et Doetsch, 1974 ; Qu et Breuer, 2020 ; Nsamela *et al*., 2021 ; Zhuang *et al*., 2024), la pression (Nishiyama et Sowa, 2012), ou encore la concentration en oxygène (Douarche *et al*., 2009) ou en NaCl (Paulick *et al*., 2009 ; Soutourina *et al*., 2001). D'autres facteurs environnementaux, parfois similaires, mais perçus sous forme de gradients, sont détectés par la bactérie, ce qui lui permet d'ajuster sa direction de nage (Colin *et al*., 2021). Ces signaux peuvent être chimiques : gradients de nutriments (Berg et Brown, 1972 ; Colin *et al.*, 2021), d'oxygène (Armitano *et al*., 2013 ; Elmas *et al*., 2019), de pH (Shirai *et al*., 2022) ou physiques : température, d'osmolarité, de lumière (Arrieta *et al*., 2017), de gravité (Ozasa *et al*., 2021), ou de champs magnétiques (Lefèvre et Bazylinski, 2013). On parle de tactisme. La perception de ces signaux repose sur des récepteurs transmembranaires, les « méthyl accepting chemotaxis proteins » (MCPs). Organisés en clusters, ils contrôlent via la protéine CheW, l'état de phosphorylation de l'histidine kinase CheA, laquelle régule CheB (modulation de la sensibilité des MCPs) et CheY, le messager transmettant le signal au moteur flagellaire pour induire un changement du sens de rotation et donc une réorientation (Schweinitzer et Josenhans, 2010 ; Sourjik et Wingreen, 2012 ; Colin *et al*., 2021 ; Thormann *et al.*, 2022). Ce mécanisme, identifié pour la première fois chez *E. coli* en présence de molécules attractives ou répulsives correspond à une marche aléatoire biaisée (« biased random walk »*)* (Berg et Brown, 1972).

La dynamique de nage peut également être modifiée par des interactions mécaniques avec l'environnement, notamment le confinement (Tableau 2), ou encore les interactions avec les parois. Enfin, la motilité dépend de l'état physiologique et des stratégies adaptatives de la cellule. La proportion de bactéries motiles est plus élevée en phase exponentielle de croissance (Amsler *et al*., 1993 ; Arora *et al*., 2007 ; Davis *et al*., 2011). De plus, la motilité s'inscrit dans une stratégie de gestion des ressources : en milieu nutritif riche, elle est réprimée au profit de la biosynthèse (stratégie de croissance), alors qu'en milieu pauvre, elle est stimulée pour favoriser l'exploration et la recherche de nutriments (stratégie de recherche) (Colin *et al*., 2021). La transition vers un mode de vie sessile entraîne également une inhibition de la motilité sous le contrôle du c-di-GMP (Berne *et al*., 2018 ; Liu *et al*., 2024). Enfin, lors de certaines infections, les gènes du flagelle peuvent être réprimés pour réduire la détection immunitaire (Nedeljković *et al*., 2021 ; Sun *et al*., 2022).

Tableau 2. Effets du confinement sur la motilité bactérienne individuelle

Confinement / Système utilisé	Bactérie	Résultats principaux	Références
Micro-canaux (h : 2 - 20 µm), sans écoulement	*E. coli*	Angles de nage anisotropes ; ↘ tumbling, ↗ temps de run ; vitesse +5-10% sous fort confinement	Biondi *et al.* (1998)
Micro-canaux (h : 0,3 - 5 µm), sans écoulement	*E. coli* *B. subtilis*	Motilité conservée si h > ~ 1,25 fois diamètre cellulaire ; sinon nage active disparaît	Männik *et al.* (2009)
Micro-canaux (h : 25 - 128 µm), sous écoulement	*E. coli*	Motilité anisotrope ; accumulation près des parois ; moins de réorientations Redistribution des bactéries motiles entraînent une baisse de la viscosité	Liu *et al.* (2019)
Micro-canaux (h : 14 - 60 µm), sans écoulement	« Microswimmers variés »	Trajectoires et champs de flux hydrodynamiques induits par les bactéries modifiés	Jeanneret *et al.* (2019)
Microfluidiques à géométrie variable, sans écoulement	5 souches dont *E. coli*	Trajectoires // aux parois en confinement modéré ; collisions/piégeage en confinement fort ; vitesse stable	Tokárová *et al.* (2021)
Milieux poreux (pores variables), sans écoulement	*E. coli*	Motilité « hopping-trapping » : hopping (saut) dans pores larges ; Trapping (piégeage) dans pores étroits. Longueur des sauts et temps de piégeage liés à la taille des pores	Bhattacharjee et Datta (2019)
Micro-canaux (h : 2 - 10 µm), sans écoulement	*V. fisheri*	Nage + rectiligne, ↘ tumbles et fluctuation directionnelle avec ↗ confinement	Lynch *et al.* (2022)
Micro-canaux (h 2,5 µm, l : 10 -50 µm), sans écoulement	*E. coli*	Diffusion anormale (superdifusion) ; longueur de runs : distribution passe d'exponentielle à loi de puissance. Tumbles supprimés	Raza *et al.* (2023)
Dispositif microfluidique : billes rapprochées : 1 µm d'espace	*E. coli*	Vitesse de nage ↗ en sortie de la contrainte confinement ; expliqué par trainée hydrodynamique	Yin *et al.* (2022)
Micro-canaux avec piliers (h : 1 -10 µm), sans écoulement	*E. coli*	Trajectoires plus rectilignes avec ↗ confinement. Dynamique « swim-and-stall », longueur des phases de nage (swim) ↘ et temps d'immobilisation (stall) ↗ sous confinement	Zhang *et al.* (2024)
Micro-canaux (h : 5 - 160 µm), sans écoulement	*E. coli*	↘ accumulation paroi ; trajectoires + rectilignes	Wei *et al.* (2025)

2.2.2 Caractérisation de la nage bactérienne d'un point de vue physique

2.2.2.1 Nager à faible nombre de Reynolds

Au-delà de l'analyse biologique de la nage bactérienne, il est essentiel de comprendre les principes physiques qui la régissent. Contrairement à nous, qui utilisons l'inertie pour nager en exerçant une force sur le fluide, les bactéries, en raison de leur taille micrométrique, ne peuvent bénéficier de cette dynamique. En effet, une bactérie, évoluant dans un milieu aqueux (ρ = 1000 kg/m^3 et η = 10^{-3} Pa.s) à une vitesse de 20 à 100 µm/s présente un nombre de Reynolds compris entre 10^{-6} à 10^{-4}, bien inférieur à 1 (Berg, 1993 ; Clément *et al*., 2016 ; Lauga, 2016 ; Lauga et Powers, 2009 ; Wadhwa et Berg, 2022). Dans ce régime où les forces visqueuses dominent sur les forces inertielles, le mouvement est régi par l'équation de Stokes (Chapitre 1 paragraphe 1.2). Cette équation présente une symétrie qui impose que tout mouvement symétrique et réversible au sein du fluide ne génère pas de déplacement net (Purcell, 1977). Connu sous le nom du « théorème de la coquille Saint-Jacques », ce théorème établit qu'un cycle de nage strictement réciproque ramène toujours l'organisme à son point de départ. Pour se déplacer dans un tel environnement, les microorganismes ont donc dû développer des stratégies pour rompre la symétrie de leurs mouvements. Chez les bactéries flagellées, cette asymétrie résulte de la structure hélicoïdale et chirale de leurs flagelles, c'est-à-dire non superposable à leur image miroir. Combinée à une rotation continue (~ 130 Hz (Darnton *et al*., 2007 ; Mazza, 2016)) cette configuration permet à la bactérie de se propulser. Pour comprendre ce mécanisme, on peut décomposer le flagelle en une succession infinie de segments droits (encadré Figure 7). Lorsqu'il tourne, chaque segment se déplace à une vitesse v en décrivant un mouvement oblique dans le fluide, avec une composante de vitesse parallèle ($v_{\parallel}$) et perpendiculaire ($v_{\perp}$) à son axe local (Lauga, 2016 ; Lauga et Powers, 2009, Wadhwa et Berg, 2022).

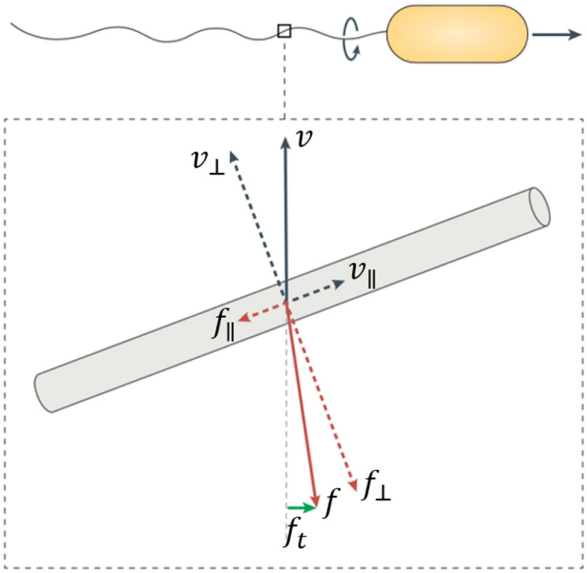


Figure 7. Illustration du mécanisme physique de propulsion d'une bactérie au sein d'un fluide. D'après Wadhwa et Berg (2022).

En milieu visqueux, la résistance au mouvement (trainée) est plus importante lorsque le segment se déplace perpendiculairement à son axe ($f_\perp$) que lorsqu'il se déplace parallèlement ($f_\parallel$) : c'est le principe de l'anisotropie de trainée (Elgeti *et al.*, 2015). Cette différence de frottement génère une force orientée le long de l'axe du flagelle (f_t en vert sur la figure), qui se traduit par une poussée de propulsion, de l'ordre de 0,1 à 1 pN dans l'eau par exemple (Berke *et al*., 2008 ; Clément *et al.*, 2016 ; Drescher *et al*., 2011). L'efficacité énergétique de cette propulsion reste faible, de l'ordre de 1 % (Purcell, 1977). En nageant, la bactérie pousse donc le fluide vers l'arrière avec une force égale et opposée à celle produite par le flagelle (f_t), conformément au principe d'action-réaction. Ce mouvement modifie localement l'écoulement : la bactérie crée un champ hydrodynamique répulsif à l'avant et à l'arrière d'elle, et attractif sur les côtés, comme illustré à la Figure 8. En physique, ce comportement qualifie la bactérie de « pusher », qu'on modélise comme un dipôle de forces dont l'intensité décroit avec la distance selon une loi en $1/r^2$ (Berke *et al.,* 2008 ; Drescher *et al*., 2011 ; Lauga, 2016 ; Elgeti *et al.*, 2015 ; Watari et Larson, 2010).

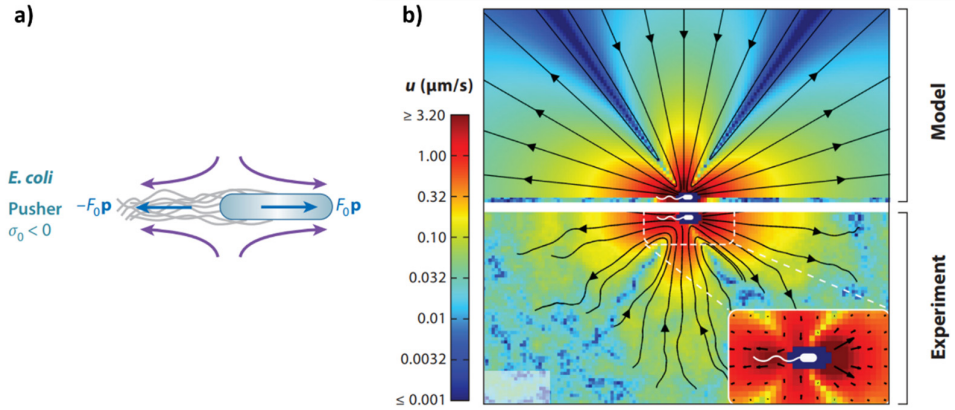


Figure 8. a) Schéma illustrant un pusher : la force de propulsion (F_0p) exercée par le flagelle est équilibrée par la force de trainée sur le corps bactérien (-F_0p) b) Champ de vitesse moyen induit par la nage d'*E. coli* mesuré expérimentalement par Drescher *et al*. (2011) en bas de la figure, comparé à un flux théorique généré par une bactérie de type pusher. D'après Saintillan (2018).

2.2.2.2 Dynamique et réorientation du mouvement bactérien

Au-delà de leur capacité de propulsion, les bactéries présentent une dynamique de nage complexe (Chapitre 1 paragraphe 2.2.1.2), alternant phases de déplacement rectiligne et phases de réorientation. Cette dynamique joue un rôle crucial dans leur transport et leurs interactions avec l'environnement, d'où l'élaboration de modèles théoriques et numériques. Ces derniers s'appuient principalement sur le comportement de nage de Run-and-Tumble de *E. coli* (Figure 9c), espèce la plus étudiée à ce jour. Les travaux pionniers de Berg et Brown (Berg et Brown, 1972) y ont grandement contribué en fournissant des données expérimentales précises (1200 bactéries suivies) : une vitesse de nage v_0 d'environ 15 µm/s, un temps de run (t_r) proche de 1 s, un temps de tumble (t_{tumble}) de 0,15 s et un angle moyen de réorientation θ d'environ 68° (± 36°) ; la distribution de ces angles étant présentée en Figure 9a.

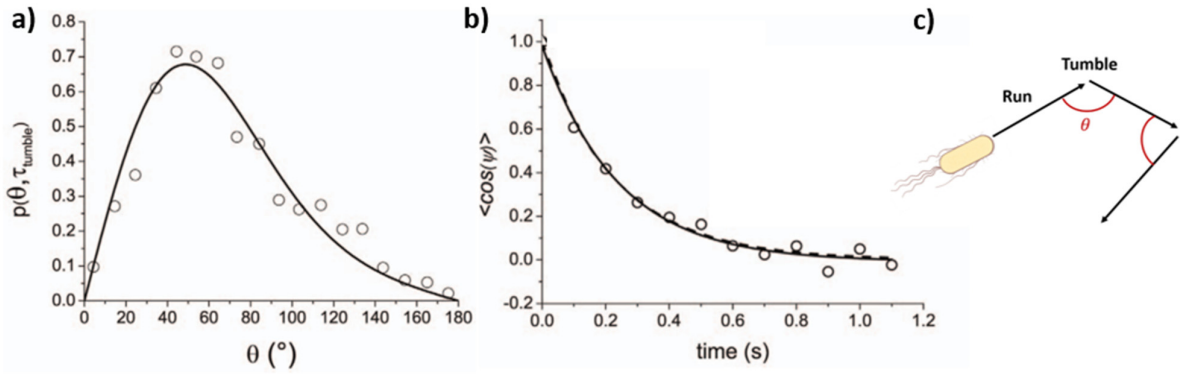


Figure 9. a) Distribution expérimentale des angles de tumble (θ) de *E. coli* (points) mesurés par Berg et Brown (1972), comparée à l'ajustement du modèle de diffusion rotationnelle active de Saragosti *et al*. (2011) avec un coefficient de diffusion D_R = 3,5 rad²/s (ligne continue). b) Fonction d'autocorrélation temporelle des orientations cos Ψ (angle de tumble Ψ dans cette étude) obtenues à partir de trajectoires de *E. coli* effectuant une nage Run-and-Tumble. Les données expérimentales (points) sont ajustées avec une exponentielle décroissante (ligne pleine) et une fonction théorique (ligne pointillée), aboutissant à une valeur D_R très proche : $D_R \approx 2.1$ rad².s^{-1}. D'après Saragosti *et al*. (2011). c) Schéma du mécanisme de Run-and-Tumble.

Ces grandeurs ont ensuite été intégrées à des modèles (Lovely et Dahlquist, 1975 ; Saragosti *et al*., 2011), qui ne seront pas détaillés ici ; l'objectif étant plutôt de comprendre ce qu'ils apportent à notre compréhension de la nage bactérienne, notamment en ce qui concerne le critère de persistance directionnelle. Ce concept sera illustré en comparant le comportement d'une bactérie motile à celui d'une particule passive.

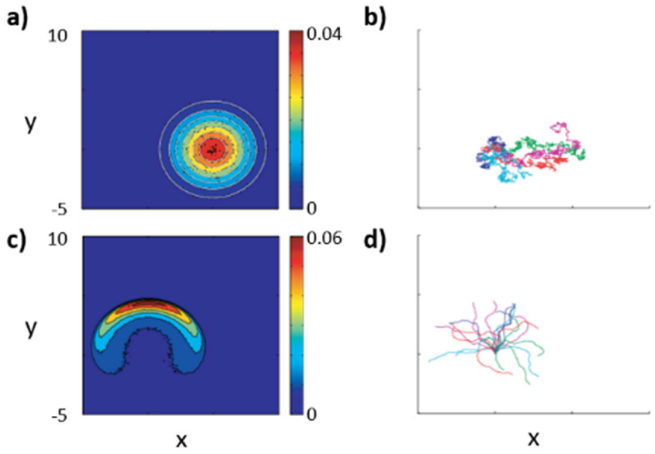


Figure 10. Simulations numériques de marches aléatoires. Densité (a,c) de probabilité et échantillons (b,d) de trajectoires. (a,b) Marche aléatoire brownienne ; à chaque temps, déplacement avec probabilité uniforme. (c,d) Marche à persistance directionnelle. À chaque temps, la particule conserve sa dernière direction et ne peut tourner qu'à gauche, aller tout droit ou à droite avec des probabilités différentes. Les densités de probabilités ont été calculées à partir de 10^6 particules. D'après Codling *et al.* (2008).

Dans le cas de la particule passive, soumise uniquement au mouvement brownien une diffusion isotrope est observée, avec des angles de réorientation distribués de manière uniforme (Figure 10 a,b), ce qui traduit une absence de mémoire directionnelle.

En revanche, pour les bactéries, la Figure 9 montre que : (i) la distribution des angles de réorientation de *E. coli* n'est pas isotrope mais favorise des angles modérés (a), et (ii) la bactérie perd rapidement son orientation, en moins d'une seconde (b). Un exemple de marche aléatoire avec persistance directionnelle est présenté Figure 10 (c,d) pour illustrer cette notion (Codling *et al*., 2008).

Cette persistance directionnelle peut être quantifiée à l'aide de deux coefficients (Berg, 1993 ; Clément *et al*., 2016 ; Garcia *et al.*, 2011) : le coefficient de diffusion rotationnelle (D_R) et le coefficient de diffusion translationnelle (D_T). Le coefficient D_R évalue la vitesse à laquelle une bactérie perd la mémoire de son orientation initiale. Plus ce dernier est élevé, plus la bactérie change fréquemment de direction. Il peut être déterminé à partir de la fonction d'autocorrélation de l'orientation (Saragosti *et al*., 2011) comme illustré Figure 9b. Cette courbe montre une décroissance rapide, atteignant rapidement 0 : la bactérie ne maintient pas longtemps son orientation. En ajustant cette courbe par une loi exponentielle décroissante, on extrait un temps caractéristique t_c, dit temps de persistance. Chez *E. coli*, ce coefficient de diffusion rotationnel est généralement estimé entre 2 et 3,5 rad²/s, soit un t_c compris entre 0,3 et 0,5 s (Berg et Brown, 1972 ; Clément *et al.*, 2016 ; Lemelle *et al.*, 2020 ; Lovely et Dahlquist, 1975 ; Saragosti *et al*., 2011). À titre comparatif, le coefficient de diffusion rotationnel d'une particule passive ellipsoïdale de 5 à 10 µm est compris entre 10^{-2} et 10^{-3} rad²/s (Clément *et al*., 2016).

Cette dynamique de réorientation impacte directement la manière dont les bactéries explorent leur environnement, leur dispersion spatiale. Pour des temps courts, une cellule active se déplace essentiellement en ligne droite du fait de sa persistance directionnelle : on parle de régime balistique. En revanche, à long terme, les réorientations successives provoquent une dispersion aléatoire de la bactérie dans l'espace, caractéristique d'un comportement diffusif. La transition entre ces deux régimes peut être appréciée à travers l'évolution temporelle du déplacement quadratique moyen, MSD (Mean Squared Displacement). Le MSD peut être interprété comme la surface explorée par la bactérie au cours du temps. En régime balistique, le MSD croît de manière quadratique ($MSD(t) \propto (v_0\, t)^2$, tandis qu'en régime diffusif, la croissance devient linéaire ($MSD(t) \propto D_T\, t$). Ce comportement diffusif à long terme peut être caractérisé par le coefficient D_T, qui dépend de la vitesse de nage de la bactérie, de la durée des runs et de sa fréquence de réorientation (Clément *et al.*, 2016 ; Garcia *et al.*, 2011 ; Lovely et Dahlquist, 1975 ; Saintillan, 2018)**:** $D_T = \frac{v_0^2 t_c}{3} = \frac{v_0^2}{6\, D_R}$. Ce coefficient permet de relier la dynamique individuelle (trajectoire) à une diffusion macroscopique à l'échelle de la population. Chez *E. coli*, D_T prend une valeur proche de 100 µm²/s, soit environ 500 fois supérieure à la diffusion brownienne d'une particule inerte de taille similaire (environ 0,2 µm²/s) (Berg, 1993 ; Clément *et al*., 2016 ; Wu et Libchaber, 2000).

2.3 Dynamique de nage sous cisaillement

Dans leur environnement, les bactéries motiles évoluent fréquemment dans des écoulements cisaillés qui interfèrent avec leur motilité et modulent leurs capacités de transport (Berne *et al.*, 2018 ; Padron *et al.*,

2023a ; Secchi *et al.*, 2020 ; Wheeler *et al.*, 2019). Pour comprendre cette dynamique, il faut non seulement considérer leur activité motrice intrinsèque, mais aussi les effets du profil de vitesse, du gradient de cisaillement et des interactions hydrodynamiques aux interfaces solides. Les sections suivantes examinent les connaissances actuelles sur le couplage entre la motilité bactérienne et un écoulement.

2.3.1 Cadre dimensionnel : Péclet hydrodynamique et de confinement

Avant d'aborder les comportements bactériens émergeant sous flux, il est essentiel de définir les temps caractéristiques associés au transport des bactéries dans un écoulement. D'après le schéma de la Figure 11, nous définissons trois temps caractéristiques : un temps $t_f \approx \frac{1}{\dot{\gamma}_w}$ rendant compte de l'intensité de l'écoulement, un temps $t_c \approx \frac{1}{D_r}$ introduit précédemment qui rend compte de la capacité des bactéries à conserver leur orientation et enfin un temps lié au confinement $t_h = \frac{h}{v_0}$ correspondant au temps que mettrait une bactérie de vitesse v_0 à passer d'une paroi à une autre séparées d'une distance h.

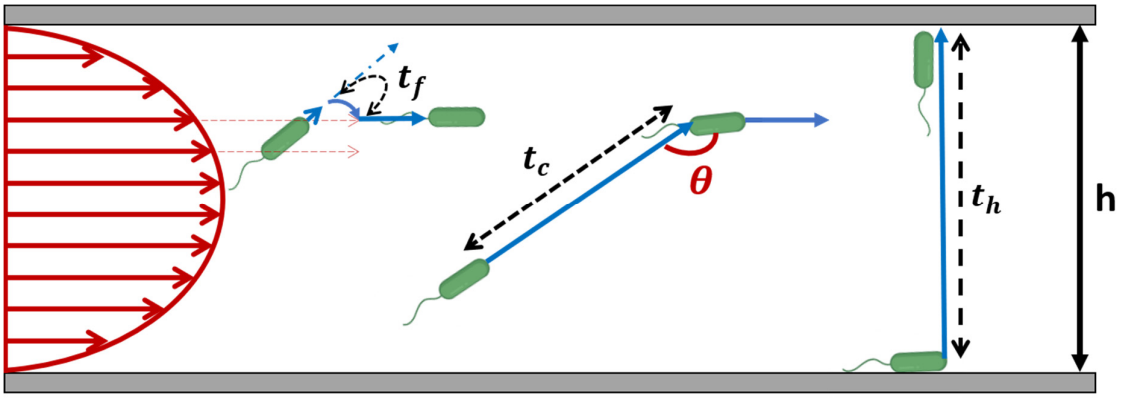


Figure 11. Illustration des temps caractéristiques d'une bactérie soumise à un écoulement cisaillé : t_f (temps d'alignement avec le cisaillement : orientation imposée par le gradient de vitesse) ; t_c (temps de persistance) ; t_h (temps nécessaire pour traverser la hauteur du système par nage bactérienne).

La comparaison de ces temps fait apparaitre deux nombres adimensionnés (Ezhilan et Saintillan, 2015 ; Ganesh *et al.*, 2023 ; Zöttl et Stark, 2016) :

- **Le Péclet hydrodynamique Pe_f :**

$$Pe_f = \frac{t_c}{t_f} = \frac{\dot{\gamma}_w}{D_r} \tag{20}$$

Pour Pe_f <<1 ($t_c \ll t_f$) ; la dynamique de nage de la bactérie n'est que peu impactée par l'écoulement et conserve sa capacité à croiser les lignes de courant. Dès que Pe_f >>1 ($t_c \gg t_f$) ; le cisaillement domine et tend à aligner les bactéries dans le sens de l'écoulement réduisant ainsi leur capacité à explorer leur environnement.

- **Le Péclet de confinement Pe_s :**

$$Pe_s = \frac{t_c}{t_h} = \frac{v_0}{D_r h} \tag{21}$$

Ce nombre mesure l'impact du confinement sur la motilité bactérienne : pour $Pe_s \gg 1$ (h petit) les effets de confinement sont importants. La bactérie durant sa phase de nage persistante interagit fréquemment avec les parois. En revanche pour $Pe_s \ll 1$ (h grand), la bactérie peut se réorienter librement dans l'écoulement sans interaction avec les parois. Ce nombre de Péclet de confinement peut également être vu comme le rapport de la longueur de persistance de nage sur la distance de confinement.

Ces deux grandeurs fournissent un cadre prédictif qui permet de positionner la bactérie dans un régime dynamique précis, en donnant des indications sur les contributions relatives de la motilité, du cisaillement et du confinement. En fonction de ces grandeurs, différents comportements de nage ont émergé qui vont maintenant être détaillés.

2.3.2 Comportement de nage dans le volume

2.3.2.1 Le modèle actif de nage de Bretherton-Jeffery

Une bactérie telle que *E. coli* (bacille) peut être approximée par une ellipsoïde rigide, dotée d'une orientation vectorielle p.

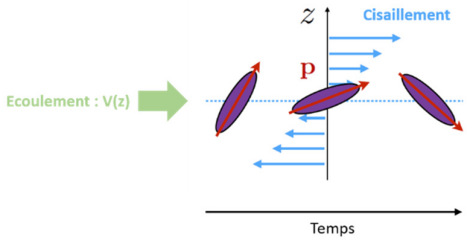


Figure 12. Représentation des orbites de Jeffery pour une ellipsoïde passive d'orientation $\vec{p}$ dans un écoulement cisaillant. Adaptée de Junot (2019).

Dans le cas d'une ellipsoïde passive soumise à un écoulement, comme présenté Figure 12, cette dernière est advectée et subit une rotation périodique autour de son centre de masse, phénomène connu sous le nom d'« orbites de Jeffery » (Jeffery, 1922 ; Bretherton, 1962 ; Ishimoto, 2023 ; Lauga, 2016). Ce modèle, introduit par Jeffery, puis complété par Bretherton décrit le mouvement d'un corps allongé dans un écoulement cisaillant. Cette rotation dépend fortement du rapport d'aspect de l'ellispoïde : plus il est élevé (ellipsoïde très allongée), plus la rotation est marquée.

Dans le cas d'une bactérie motile, du fait de ses propriétés de nage, l'ellipsoïde rigide (modèle Jeffery passif) est enrichi par une propulsion active : la bactérie peut traverser les lignes de courant, ajuster son orientation aux gradients de cisaillement, additionner sa vitesse à celle de l'écoulement local… Cette dynamique de nage couplée à l'écoulement est décrite par la modèle actif dit de Bretherton-Jeffery (B-J actif) (Junot *et al*., 2019), assimilant la bactérie à une ellipsoïde auto-propulsée dont l'orientation évolue sous l'influence du cisaillement local et de ses propriétés de nage.

À ce jour, seules quelques expériences ont permis de suivre en 3D des trajectoires individuelles de bactéries sous écoulement (Cao *et al*., 2022 ; Darnige *et al*., 2017 ; Figueroa-Morales *et al*., 2020 ; Junot *et al*., 2019 ; Mathijssen *et al*., 2019 ; Molaei *et al*., 2014; Molaei et Sheng, 2016 ; Taute *et al*., 2015 ; Torres Maldonado *et al*., 2024) montrant notamment que, sous flux, ces dernières sont modifiées (Figure 13). Parmi elles, l'étude de Junot *et al*. (2019) et celle de Mathijssen *et al.* (2019) sont les seules à avoir cherché et confirmé expérimentalement le modèle actif de Bretherton-Jeffery.

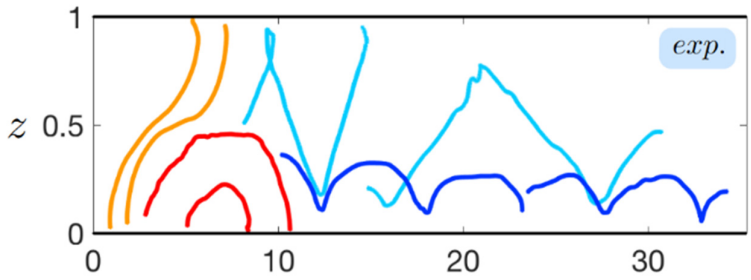


Figure 13. Trajectoires bactériennes 3D de *E. coli* obtenues dans un écoulement de Poiseuille, et projetées dans le plan de cisaillement (z-x). Les couleurs correspondent aux vitesses d'écoulement imposées. Écoulement croissant dans l'ordre de couleurs suivants : rouge, bleu clair, orange, rouge et bleu foncé. D'après Junot *et al.* (2019).

Malgré ce manque de données expérimentales, certains modèles théoriques ont été développés pour décrire le transport bactérien en milieu confiné. Parmi eux, le modèle cinétique proposé par Ezhilan et Saintillan (2015) qui permet notamment de relier les propriétés de la dynamique de nage des bactéries à des mesures macroscopiques mesurables, telles que les profils de concentration et d'orientation bactérienne (accumulation aux parois, déplétion à certains endroits…) ainsi que la nage à contre-courant. Par ailleurs, d'autres travaux théoriques/numériques se sont intéressés au couplage entre la motilité et l'écoulement afin d'analyser les propriétés de dispersion de la suspension (Dehkharghani *et al.*, 2019 ; Ganesh *et al.*, 2023).

2.3.2.2 Rhéotaxie

La rhéotaxie désigne le changement d'orientation, de déplacement induit par un gradient de vitesse dans un écoulement. À l'instar des poissons (Arnold, 1974), des insectes (Lytle *et al*., 2008) ou encore des spermatozoïdes (Bretherton et Rothschild, 1961), il a été démontré que les bactéries étaient capables de rhéotaxie. Premièrement observée chez *Bacillus subtilis* (Marcos *et al*., 2012), puis chez d'autres bactéries, en particulier *E. coli* (Jing *et al*., 2020 ; Mathijssen *et al*., 2019 ; Molaei et Sheng, 2016), elle se traduit dans le volume par une dérive des bactéries transverse au plan vitesse - cisaillement (suivant l'axe de la vorticité) par rapport à l'écoulement (Figure 14a). Ce phénomène est purement physique et trouve son origine dans la chiralité du flagelle. Le mécanisme suivant a été proposé (Marcos *et al*., 2012, 2009) (Figure 14b). Dans un écoulement cisaillé, les différents segments du flagelle (Chapitre 1 paragraphe 2.2.2.1) sont soumis à des forces de portance et de trainée. Si les forces de trainée se compensent, la résultante des forces de

portance est non nulle et dirigée dans un plan perpendiculaire au cisaillement. Comme le corps bactérien, assimilé à une sphère et dépourvu de chiralité, il subit une forcée de trainée qui est opposée à la force de portance agissant sur le flagelle. Ces deux forces génèrent un couple qui entraîne la rotation de la bactérie et donc une migration perpendiculairement au cisaillement.

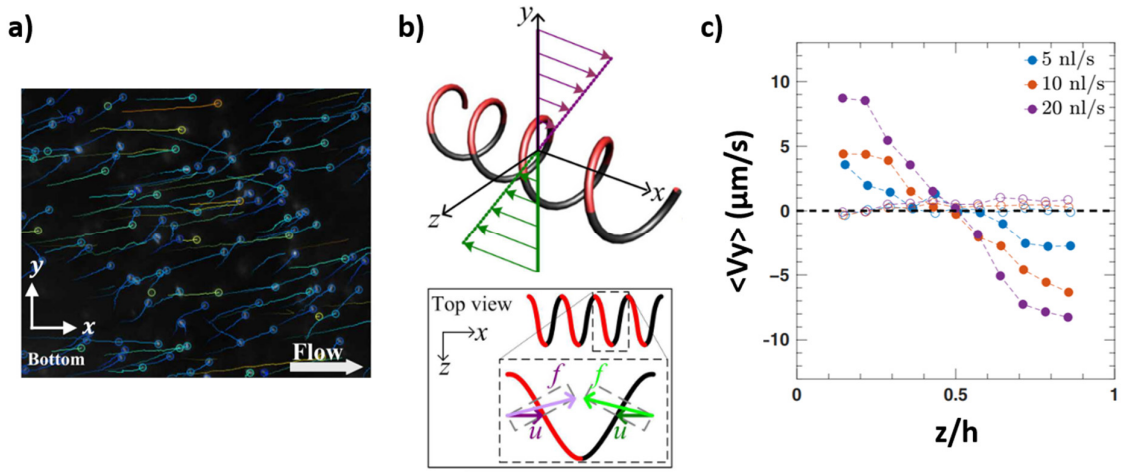


Figure 14. a) Trajectoires 2D représentatives de bactéries actives de *E. coli* dans un écoulement de Poiseuille (x : vitesse, y : vorticité, z : gradient de vitesse), dans le plan x-y, et montrant la dérive transverse (rhéotaxie). Les trajectoires ont été enregistrées dans la moitié inférieure du canal ; les cercles indiquent les positions finales des trajectoires. D'après Jing *et al.* (2020). b) Représentation schématique d'un flagelle dans un écoulement cisaillé et des forces de portance et de trainée agissant dessus. D'après Marcos *et al.* (2009). c) Vitesses moyennes de rhéotaxie $< Vy >$ obtenues pour des bactéries actives (cercles pleins) comparées à celles de traceurs passifs (cercles vides), en fonction de la position z et pour trois débits (5, 10 et 20 nl/s). D'après Jing *et al.* (2020).

Parmi les faits marquants concernant cette dérive rhéotactique et comme présenté Figure 14c, on note que la vitesse moyenne de dérive transverse ($< Vy >$) d'*E. coli* augmente avec le taux de cisaillement pouvant atteindre jusqu'à 30 % ou plus de sa vitesse se nage. De plus, dans un écoulement de Poiseuille, où le gradient de cisaillement change de signe au centre de canal, ce gradient détermine directement le signe, et donc le sens, de la dérive transverse (Jing *et al.*, 2020 ; Marcos *et al.*, 2012). Un modèle théorique a été élaboré (Jing *et al.*, 2020) pour tenter de lier Vy à la force de cisaillement, en intégrant un paramètre de chiralité flagellaire. Ce modèle révèle entre autres une inhibition de la dérive en y lorsque le cisaillement atteint un certain seuil.

2.3.2.3 Piégeage bactérien à fort ou faible cisaillement

Lorsqu'un écoulement est présent, l'orientation des bactéries motiles tend à s'aligner avec le flux (Junot *et al.*, 2019 ; Kaya et Koser, 2012 ; Kim *et al.*, 2022 ; Mathijssen *et al.*, 2019). Cette modification impacte la distribution spatiale des bactéries. Rusconi *et al.* (2014) ont par exemple observé en écoulement de Poiseuille (Figure 15), l'existence d'une zone de déplétion en bactéries au centre du canal (région de faible cisaillement), accompagnée d'une accumulation dans les zones de fort cisaillement, près des parois. On parle de « *high shear trapping* ». Dans ces zones de fort cisaillement, où le nombre de Péclet Pe_f est élevé,

les bactéries sont réorientées par le flux : l'effet de leur diffusion rotationnelle est limité. Elles ne peuvent plus passer au travers des lignes de courant et sont « piégées » dans ces zones. À l'inverse, dans les régions de faible cisaillement (Pe_f faible), les bactéries ont plus de liberté de mouvement. Cela leur permet soit de s'écarter de ces zones de capture, soit de s'en rapprocher, favorisant à leur tour leur piégeage.

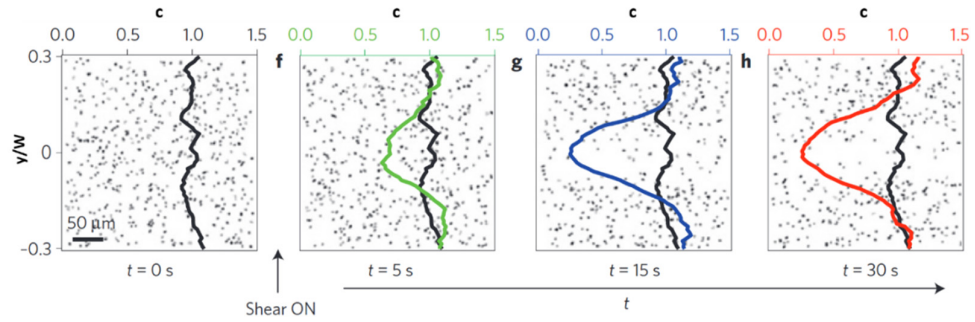


Figure 15. Série temporelle d'images en contraste de phase illustrant la répartition de *B. subtilis* au sein d'un canal lors de l'application d'un écoulement (10 s^{-1}) : profil $V_x(y)$. Les cellules sont initialement réparties de manière homogène dans le canal (profil noir à t = 0 ; reproduit sur chaque image pour la comparaison), puis rapidement éliminées de la région centrale lors de l'application d'un flux. La concentration bactérienne normalisée c, moyennée sur la zone d'imagerie (-0.3 < y/W < 0.3) est représentée. D'après Rusconi *et al*. (2014).

De nombreuses simulations numériques confirment ces observations (Chilukuri *et al.*, 2014 ; Ezhilan et Saintillan, 2015 ; Ganesh *et al.*, 2023) et montrent que ces profils de concentration tendent à se réhomogénéiser avec l'augmentation de l'écoulement (Figure 16). Certains modèles prédisent également l'émergence de zones de « *low-shear trapping* » pour de fort Péclet d'écoulement et pour de faibles rapports d'aspects bactérien (< 2).

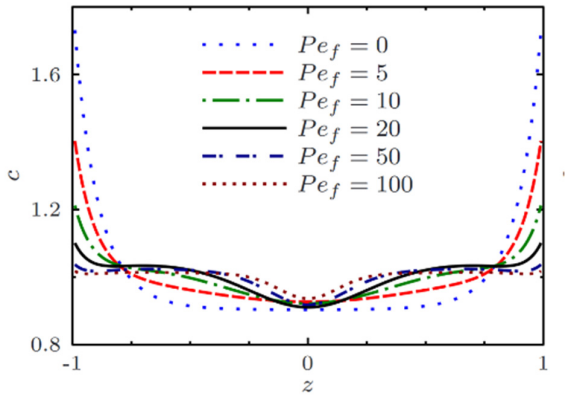


Figure 16. Profil de concentration pour Pe_s = 0,25 et pour différentes valeurs de Péclet d'écoulement ($\boldsymbol{Pe_f}$). D'après Ezhilan et Saintillan (2015).

2.3.3 Comportement de nage proche paroi

De nombreuses études soulignent l'effet des parois sur la motilité bactérienne. La première est une réduction de la vitesse de nage bactérienne à proximité des parois (Frymier *et al.*, 1995 ; Lauga et Powers, 2009).

Par exemple Frymier *et al*. (1995) observent une réduction d'un facteur 2 à 3 de la vitesse de nage de *E. coli* lorsqu'elle se rapproche de la surface. Cette diminution est attribuée à une augmentation des forces de trainée exercée sur la bactérie proche paroi. De plus, la fréquence de tumbles semble également être réduite proche paroi (Molaei *et al.*, 2014).

2.3.3.1 Modifications des trajectoires bactériennes

La deuxième conséquence de la nage proche paroi est une modification de leurs trajectoires, avec notamment l'apparition de trajectoires très circulaires aux parois comme observé Figure 17 chez *E. coli* (DiLuzio *et al*., 2005 ; Frymier *et al*., 1995 ; Hill *et al*., 2007 ; Lauga *et al*., 2006 ; Lauga et Powers, 2009 ; Molaei *et al*., 2014), mais également chez d'autres espèces bactériennes telles que *Caulobacter* (Li *et al*., 2008) ou *Pseudomonas aeruginosa* (Khong *et al.*, 2021). Ce comportement est associé à l'apparition d'interactions hydrodynamiques spécifiques à la paroi, qui ont pour conséquence de briser la symétrie axiale du flagelle bactérien. De manière très simplifiée, le mécanisme est le suivant (Figure 17) : proche paroi la rotation du flagelle engendre une force latérale parallèle à la surface, due à sa chiralité et la proximité de la paroi. À l'inverse, le corps cellulaire, tourne en sens inverse du flagelle et ressent une trainée opposée. Ces deux forces, s'exerçant à des points d'application différents, engendrent un couple qui induit une rotation de la bactérie. En conséquence, la bactérie décrit des trajectoires très courbées le long des parois (Elgeti *et al*., 2015 ; Lauga *et al.*, 2006 ; Lauga et Powers, 2009).

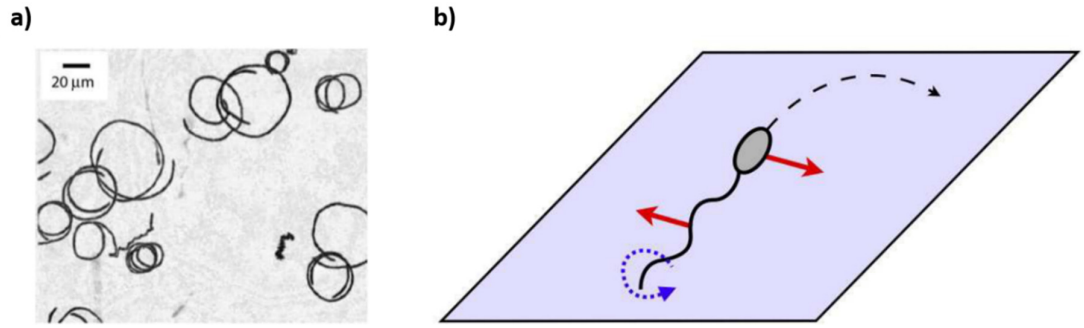


Figure 17. a) Trajectoires expérimentales d'*E. coli* proche d'une paroi en verre. b) Représentation schématique de la nage en cercle proche paroi. La rotation du flagelle (en bleu), couplée aux forces hydrodynamiques induites (en rouge) à proximité de la paroi réorientent la bactérie, conduisant à une trajectoire circulaire (en noir). Figure extraite de Lauga et Powers (2009).

En présence d'un écoulement, les bactéries situées proche paroi sont également sujettes au phénomène de rhéotaxie. Tout comme celles évoluant dans le volume (Chapitre 1 paragraphe 2.3.2.2), elles subissent un couple hydrodynamique induit par le cisaillement, provoquant une dérive latérale des bactéries, perpendiculaire à la direction de l'écoulement (Kaya et Koser, 2012 ; Mathijssen *et al*., 2019 ; Morales-Soto *et al.*, 2015). Certaines études ont mis en évidence un second type de rhéotaxie se produisant au niveau des parois : la migration des bactéries à contre-courant (« upstream swimming »), appelée rhéotaxie positive.

Ce phénomène est lié à l'asymétrie avant / arrière de la bactérie (corps bactérien vs flagelle). Proche de la paroi, en raison des interactions hydrodynamiques, le corps bactérien présente un coefficient de trainée plus élevé que celui du flagelle. Cette différence génère un couple qui oriente la bactérie vers l'amont. Une fois cette réorientation réalisée, et à condition que la vitesse du fluide soit suffisamment faible, ce qui est souvent le cas près des parois (condition de non glissement), les bactéries peuvent remonter le courant et migrer activement à contre-courant. Ce comportement a été principalement observé chez *E. coli* (Hill *et al*., 2007 ; Kaya et Koser, 2012 ; Mathijssen *et al*., 2019 ; Morales-Soto *et al*., 2015 ; Torres Maldonado *et al.*, 2024), comme illustré Figure 18.

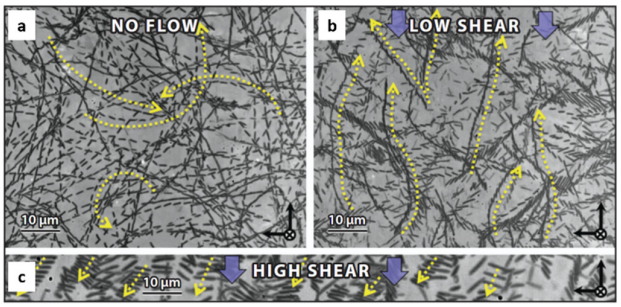


Figure 18. Nage à contre-courant d'*E. coli* le long d'une surface en PDMS : a) sans flux, b) sous cisaillement modéré (6 s^{-1}) et c) sous cisaillement élevé (35 s^{-1}). La nage en amont (« upstream swimming ») est observée pour des cisaillements intermédiaires (b) et dès que le cisaillement est trop important (c), les bactéries sont exclusivement entrainées dans le sens du flux. D'après Lauga (2016).

De plus, il semblerait que ce comportement soit possible jusqu'à une valeur seuil de cisaillement, proche de 10 s^{-1} (Hill *et al.*, 2007; Kaya et Koser, 2012; Mathijssen *et al.*, 2019), l'hypothèse étant qu'au-delà, l'intensité de l'écoulement est trop importante pour que les bactéries puissent s'y opposer ; ce qui conduit à un réalignement des trajectoires dans le sens du flux (Figure 18). Finalement, précisons qu'à notre connaissance, aucune étude n'a démontré une nage à contre-courant dans le bulk sous écoulement.

2.3.3.2 Accumulations aux parois

Une autre propriété de la nage bactérienne proche paroi est leur tendance à s'y accumuler, un phénomène qui s'avère être de nature hydrodynamique. Reprenons l'exemple d'une bactérie de type « pusher » telle que *E. coli* (Chapitre 1 paragraphe 2.2.2.1). À l'approche de la paroi, en raison de la condition de non-glissement à la paroi, le champ hydrodynamique généré par la bactérie est modifié. Les lignes de courant produites, qui se répartissent de manière symétrique autour de la cellule en l'absence de paroi sont perturbées. Cette asymétrie provoque une convergence des lignes de courant du côté de la paroi, créant un effet d'aspiration qui attire la bactérie vers la surface (Berke *et al*., 2008 ; Clément *et al*., 2016 ; Drescher *et al.*, 2011 ; Mazza, 2016). Ce mécanisme, explique l'accumulation de bactéries dans cette zone, phénomène observé dans de nombreuses études expérimentales (Berke *et al*., 2008 ; Rusconi *et al*., 2014) et numériques (Chilukuri *et al.*, 2014 ; Ezhilan et Saintillan, 2015 ; Ganesh *et al.*, 2023).

Par exemple, chez une population motile de *E. coli* (Figure 19), Berke *et al.* (2008) ont déterminé une concentration dix fois plus importante proche de la paroi que dans le bulk.

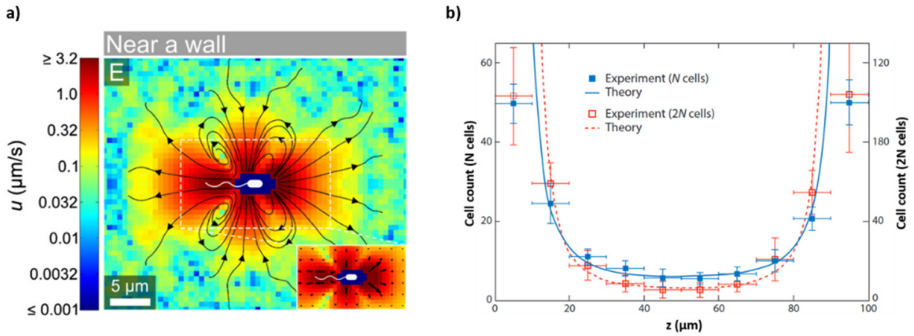


Figure 19. a) Champ hydrodynamique expérimental moyen créé par *E. coli* à 2 µm des parois (Drescher *et al.,* 2011). b) Profil de concentration d'une suspension d'*E. coli* entre deux plaques parallèles séparées de 100 µm. Figure adaptée de Lauga *et al.* (2016).

Ce phénomène attractif couplé à une réduction de la vitesse de nage proche paroi, augmente le temps de résidence des bactéries dans la zone proche paroi (Drescher *et al*., 2011 ; Rusconi *et al*., 2014), ce qui accroît les probabilités de contact avec la surface, et potentiellement d'adhésion. C'est ce point que nous aborderons dans la section suivante.

3 Adhésion des bactéries aux surfaces

Une fois la bactérie parvenue à proximité d'une surface, le processus d'adhésion peut débuter, ouvrant potentiellement la voie à la formation d'un biofilm bactérien. Ce mécanisme se déroule en deux étapes successives. La première, dite réversible, correspond à l'interaction initiale de quelques bactéries individuelles avec la surface, via des forces d'interactions faibles. Deux issues sont alors possibles : soit ces cellules se détachent et retournent à l'état planctonique, soit l'interaction avec la surface se renforce, conduisant à une phase d'adhésion dite irréversible. Ce processus est complexe et régi par de nombreux paramètres tels que les propriétés physico-chimiques de la surface à coloniser, de la membrane bactérienne, ainsi que les conditions environnementales (Berne *et al*., 2018). Sans prétendre à l'exhaustivité, cette section s'intéresse au mécanisme d'adhésion des bactéries sur une surface abiotique Elle présente brièvement les aspects mécanistiques et les forces en présence qui permettent l'adhésion des bactéries, et s'attache à identifier les principaux facteurs influençant ce processus. Une attention particulière est portée à l'influence des conditions hydrodynamiques, qui sont au cœur de ce sujet de thèse.

3.1 Aspects physico-chimiques de l'adhésion bactérienne

3.1.1 Adhésion bactérienne réversible : interactions physico-chimiques en jeu

L'étape dite réversible correspond à une interaction initiale, généralement faible entre les cellules bactériennes et une surface.

Elle résulte d'un équilibre physico-chimique entre plusieurs forces qui agissent à une distance spécifique entre la bactérie et la surface (Figure 20) :

- Les forces de Van der Walls, toujours attractives, interviennent les premières et sont les seules capables d'agir à relativement longue portée (> 50 nm), bien que leur intensité diminue avec la distance. Elles restent perceptibles jusqu'à environ 100 nm.
- Les forces électrostatiques, qui peuvent être attractives ou répulsives selon les charges portées par les surfaces en présence (surface à coloniser et interface bactérienne), mais aussi influencées par le pH et la force ionique du milieu environnant.
- Les interactions hydrophobes ou hydrophiles, qui dépendent de la nature chimique des deux surfaces (Krsmanovic *et al.*, 2021).

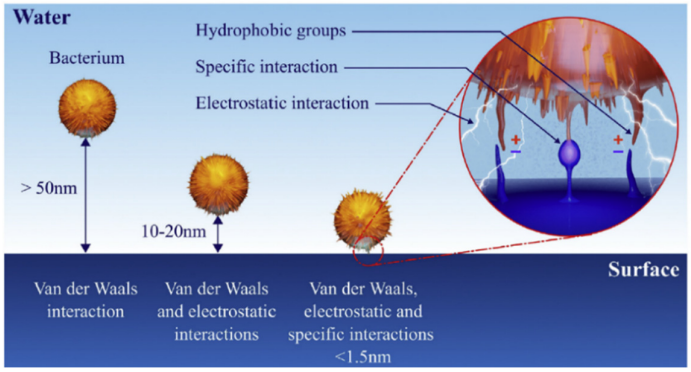


Figure 20. Stratification des forces d'interactions entre bactérie et surface (Krsmanovic *et al.*, 2021).

L'adhésion des bactéries à une surface peut être analysée d'un point de vue thermodynamique, afin d'évaluer la spontanéité du processus et les conditions qui le favorisent. Deux approches, initialement développées pour décrire le comportement de particules colloïdales peuvent être appliquées :

- Le modèle thermodynamique de surface (Bos, 1999 ; Carniello *et al.*, 2018) qui suppose un état d'équilibre et ne permet en conséquence ni de prédire une adhésion irréversible, ni de prendre en compte les interactions électrostatiques.
- La théorie DLVO (Derjaguin Landau Verwey Overbeek) qui modélise l'équilibre entre les forces de van der Walls et les forces électrostatiques, complétée de son extension x-DLVO (x pour « extended ») qui intègre les interactions acide-base liées à l'hydrophobicité des surfaces (Bos, 1999 ; Carniello *et al.*, 2018 ; Krsmanovic *et al.*, 2021). Les contributions respectives de ces forces dépendent de la distance entre le microorganisme et la surface, ce qui se traduit par une courbe de l'énergie totale d'interaction présentant généralement deux minima (Figure 21) : un premier minimum (minimum secondaire), peu profond et à distance relativement éloignée de la surface, correspondant à l'attachement réversible ; et un second minimum (minimum primaire), plus profond et plus proche surface, associé à l'adhésion irréversible. Selon la thermodynamique, les bactéries s'établissent d'abord dans le premier minimum, puis, avec suffisamment d'énergie, peuvent franchir la barrière énergétique pour atteindre le second,

renforçant leur adhésion. Nous reviendrons sur les phénomènes permettant ce franchissement par la suite.

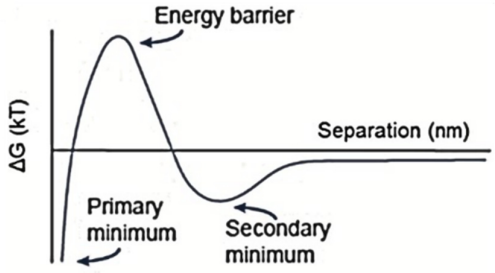


Figure 21. Représentation schématique de l'énergie totale d'interaction entre une bactérie et une surface selon la théorie DLVO classique et son extension. D'après Carniello *et al*. (2018).

Ces approches présentent toutefois des limites (Conrad et Poling-Skutvik, 2018 ; Krsmanovic *et al*., 2021); la bactérie y est généralement modélisée comme une particule colloïdale, sphérique et rigide, et la surface comme lisse et homogène. Ces simplifications négligent des paramètres essentiels, liés à la nature même de la bactérie ainsi qu'aux propriétés physico-chimiques de la surface. Le rôle de ces différents facteurs sont présentés dans les paragraphes ci-dessous.

3.1.2 Influence des propriétés physico-chimiques de la surface et du milieu environnant

Dans leur environnement naturel, les bactéries peuvent entrer en contact avec une grande variété de surfaces, qui finissent inévitablement par être colonisées. Cependant, les propriétés physico-chimiques de ces surfaces sont des paramètres déterminant dans l'efficacité de l'adhésion bactérienne. La Figure 22 illustre les principaux facteurs liés aux propriétés de surface qui influencent l'adhésion bactérienne.

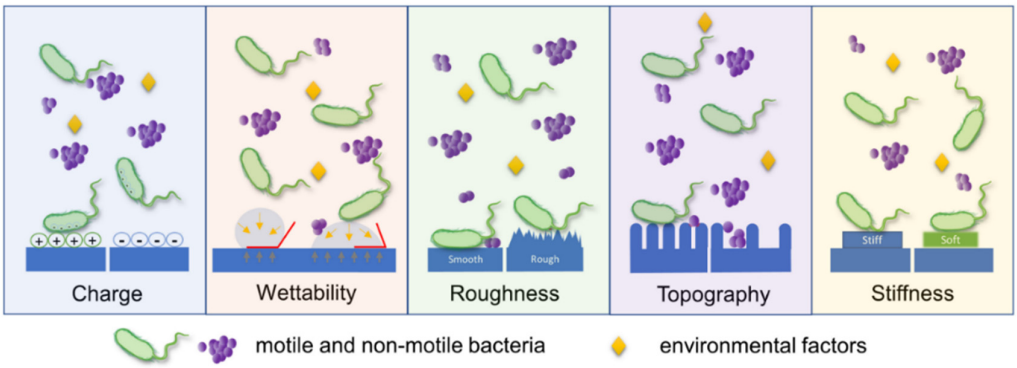


Figure 22. Paramètres de surface impactant l'adhésion bactérienne : charge, mouillabilité, rugosité, topographie et rigidité de surface. D'après Zheng *et al*. (2021).

- **La charge de surface**

Les propriétés chimiques de l'enveloppe bactérienne (ou interface) peuvent varier selon les espèces, mais en règle générale, les bactéries présentent une charge à leur interface cellulaire globalement négative en raison de la présence de groupements carboxyle, amine ou phosphate. Par conséquent, les surfaces à coloniser possédant une charge positive sont généralement mieux colonisées que les surfaces chargées négativement ou neutre (attraction électrostatique) (Gottenbos, 2001 ; Terada *et al*., 2012 ; Kovačević *et*

al., 2016 ; Oh *et al.*, 2018), avec cependant une affinité entre les bactéries et les surfaces fortement souche-dépendante (Zhu *et al.*, 2015) comme présenté Figure 23.

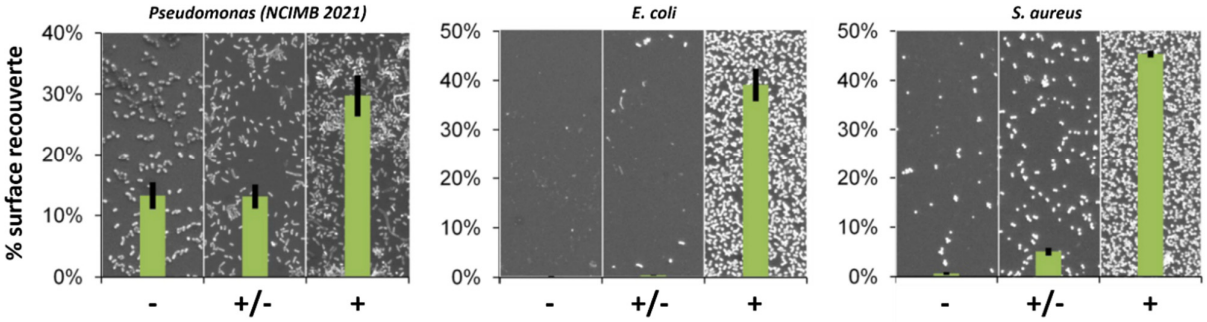


Figure 23. Pourcentage de surface recouverte par *Pseudomonas* (NCIMB 2021), *E. coli* et *S. aureus* après 1 h d'adhésion sur des surfaces à charge négative (-), neutre (+/-) ou positive (+). D'après Zhu *et al.* (2015).

Néanmoins cette tendance peut être nuancée par des études aux résultats moins contrastés (Ueshima *et al.*, 2002 ; Rzhepishevska *et al.*, 2013 ; Kao *et al.*, 2017 ; Shen *et al.*, 2020), soulignant l'influence d'autres paramètres, comme la capacité des bactéries à surmonter la répulsion électrostatique via la modification de leur interface ou par la présence d'appendices (fimbriae, LPS) par exemple.

- **La mouillabilité de la surface du matériau**

La mouillabilité, qui dépend des interactions physico-chimiques entre les molécules du liquide et du solide, désigne la capacité d'un liquide à s'étaler sur une surface : une surface est qualifiée d'hydrophile si le liquide s'y étale bien (bonne mouillabilité) ou d'hydrophobe dans le cas contraire. Cette propriété influence l'adhésion bactérienne aux surfaces, en agissant de pair avec leur hydrophobicité de surface. De manière simplifiée, il est admis que des bactéries aux interfaces hydrophobes adhèrent préférentiellement aux surfaces hydrophobes, et inversement pour les bactéries hydrophiles (An et Friedman, 1998 ; Berne *et al.,* 2018 ; Krasowska et Sigler, 2014 ; Yuan *et al.*, 2023 ; Zheng *et al.*, 2021). Et des études montrent que les bactéries hydrophobes colonisent de manière plus étendue les surfaces et présentent des forces d'interaction avec le matériau plus élevées (Boks *et al.*, 2008b). Cependant, le caractère multifactoriel de l'adhésion bactérienne rend ces comportements d'adhésion bactériens vis-à-vis de l'hydrophobicité / hydrophilie des surfaces plus complexes (Lorenzetti *et al.*, 2015 ; Wassmann *et al.*, 2017 ; Yuan *et al.*, 2017).

- **La rugosité et topographie de surface**

De nombreuses investigations ont permis d'établir le consensus suivant : une augmentation de la rugosité de surface favorise l'adhésion bactérienne en amplifiant la surface disponible et en protégeant les bactéries des forces de cisaillement (Achinas *et al.*, 2019 ; Arnold et Bailey, 2000 ; Berne *et al.*, 2018 ; Bollenl *et al.*, 1997 ; Medilanski *et al.*, 2002 ; Palmer *et al.*, 2007 ; Yoda *et al.*, 2014). La topographie, qui décrit la forme et la répartition des reliefs à l'échelle micro et nanométrique, joue également un rôle clé (Anselme *et al.*, 2010 ; Marguier *et al.*, 2020 ; Ploux *et al.*, 2010 ; Zheng *et al.*, 2021). Des motifs de texturisation micrométriques facilitent l'adhésion en offrant des creux protecteurs où les forces de cisaillement sont

réduites (Berne *et al.*, 2018 ; Krsmanovic *et al*., 2021). En revanche, l'effet des *nanopatterns* est plus complexe (Hochbaum et Aizenberg, 2010 ; Jeong *et al*., 2013 ; Krsmanovic *et al.*, 2021 ; Palmer *et al.*, 2007) et varie selon la taille et la forme des bactéries. À titre d'exemple, certaines études ont montré que des surfaces présentant des motifs de taille nanométrique limitaient l'adhésion de *Staphylococcus*, alors que celle de *P. aeruginosa* et *E. coli* restait inchangée (Bagherifard *et al*., 2015 ; Ivanova *et al.*, 2011).

- **La rigidité des surfaces du matériau**

La rigidité des matériaux (*stifness* en anglais), représentée par le module de Young, et qui désigne la résistance d'un matériau à la déformation élastique, est un paramètre émergeant dans le contrôle de l'adhésion bactérienne (Zheng *et al.*, 2021). Cependant, la question de l'impact de la rigidité ou la mollesse de la surface sur l'adhésion bactérienne demeure une question ouverte puisque des résultats contradictoires ont été obtenus sur des polymères synthétiques et des hydrogels (Guégan *et al*., 2014 ; Keskin *et al*., 2019 ; Kolewe *et al*., 2015 ; Pan *et al*., 2022 ; Song et Ren, 2014 ; Straub *et al*., 2019 ; Vigué *et al*., 2022). Il n'existe pas de consensus sur le rôle de la rigidité des matériaux dans l'initiation des biofilms. L'une des raisons de ces disparités pourrait être l'influence d'autres facteurs, tels que le degré d'hydratation, l'hydrophobicité ou la topographie, qui moduleraient l'influence de la rigidité de la surface sur l'adhésion bactérienne, masquant ainsi l'effet que l'élasticité du substrat peut avoir sur l'adhésion bactérienne. Notons également que la rigidité du substrat impacte la motilité bactérienne : chez *E. coli* , une surface rigide augmente la motilité flagellaire (Song *et al.*, 2017) , tandis que chez *P. aeruginosa* la motilité par twitching (pili de type IV) est renforcée affectant la formation du biofilm (Gomez *et al*., 2023).

- **Le milieu environnant**

Le milieu environnant influence l'adhésion bactérienne, en modifiant à la fois les propriétés de la surface à coloniser et celles des bactéries. Parmi ces facteurs, nous pouvons citer :

- Les molécules organiques présentes dans le liquide contenant les bactéries, dont la nature varie selon le contexte (conditions naturelles, industrielles ou de laboratoire). En raison de leur petite taille, ces molécules diffusent plus rapidement que les bactéries (Bos, 1999) et se déposent sur la surface avant l'adhésion bactérienne (Berne *et al.*, 2018 ; Francius *et al*., 2017). Ce film conditionnant modifie les propriétés physico-chimiques de la surface (hydrophobicité, charge, énergie) ce qui peut soit favoriser (Bhagwat *et al*., 2021 ; Hakim *et al*., 2020 ; Rummel *et al*., 2021 ; Tuck *et al.*, 2022), soit inhiber l'adhésion bactérienne (Chapman *et al*., 2001 ; Garrido *et al*., 2014 ; Hwang *et al*., 2013), en fonction de la nature des composants adsorbés.
- Le pH et la force ionique influencent directement les interactions bactéries / surface (Park et Abu-Lail, 2011 ; Sheng *et al*., 2008). Le pH agit sur la charge électrique des surfaces (interfaces bactériennes et surfaces à coloniser), modifiant ainsi les forces d'attraction ou de répulsion, tout en pouvant aussi altérer la conformation ou l'activité des structures de l'interface bactérienne. Quant à la force ionique, elle module l'intensité des interactions électrostatiques : une force ionique élevée peut compenser les

répulsions électrostatiques, facilitant ainsi l'approche cellulaire (Sheng *et al.*, 2008), tandis qu'une faible force maintient une barrière électrostatique défavorable à l'adhésion (Hori et Matsumoto, 2010 ; Zheng *et al*., 2021).

- La présence d'ions calcium ou magnésium peut également stabiliser ces interactions en neutralisant partiellement les charges négatives, favorisant l'adhésion (Bhosle *et al.*, 1998 ; De Kerchove et Elimelech, 2008 ; Geesey *et al*., 2000 ; Wang *et al.*, 2019).
- Le statut physiologique des bactéries influence également leur capacité à adhérer (Amsler *et al.*, 1993 ; Arora *et al*., 2007 ; Fletcher, 1977 ; Garrett *et al*., 2008).
- Les conditions hydrodynamiques du milieu jouent un rôle majeur dans les processus d'adhésion, un aspect qui sera détaillé dans la partie 3 de ce sous-chapitre.

3.1.3 Influence des interfaces bactériennes

L'enveloppe cellulaire, en interaction avec l'environnement, joue un rôle clé dans le processus d'adhésion, elle est modulée par ses propriétés physico-chimiques et par la surface à coloniser. Sa composition est hétérogène, dynamique et variable selon les conditions environnementales (Berne *et al*., 2018), ce qui complique l'analyse de l'adhésion et limite la pertinence des modèles physico-chimiques classiques tels que la théorie DLVO (Carniello *et al.*, 2018 ; Hori et Matsumoto, 2010). De plus, les composés de l'interface bactérienne tels que flagelles, pili, fimbriae, lipopolysaccharides, curli, mais aussi des adhésines non fimbriaires, qui s'étendent de quelques dizaines de nanomètres à l'échelle du micromètre, interviennent dans les premières étapes de l'interaction avec la surface, notamment en multipliant les points de contact (Berne *et al*., 2018 , 2015). En particulier, nous pouvons citer :

- Les protéines Bap (Biofilm-associated proteins) et LapA (Large adhesion protein A) participent à l'adhésion bactérienne, notamment dans la transition vers l'adhésion irréversible, ainsi que dans la formation du futur biofilm (Berne *et al*., 2015 ; Cucarella *et al.*, 2001 ; Fuqua, 2010 ; Hinsa *et al*., 2003 ; Lasa et Penadés, 2006).
- Le flagelle joue un rôle important dans l'ancrage initial en augmentant la surface de contact entre la bactérie et la surface et en facilitant les interactions et ce même à longue distance grâce à sa taille (jusqu'à 10 µm). Sa structure protéique présente de nombreux domaines hydrophobes, d'où l'observation d'une meilleure affinité pour les surfaces hydrophobes (Bruzaud *et al.,* 2015 *;* Friedlander *et al*., 2015). Une fois le contact établi, il peut également être mobilisé pour explorer localement la topographie de la surface (Friedlander *et al.*, 2013), favorisant la colonisation des microcavités. Des études sur des souches mutantes dépourvues de flagelle montrent une capacité réduite à coloniser les surfaces (McClaine et Ford, 2002 ; Pratt et Kolter, 1998 ; Secchi *et al*., 2020).
- Les pili, plus courts (1 à 2 µm) mais plus nombreux, participent également au contact initial et à l'établissement des interactions avec la surface (Berne *et al.*, 2015 ; Hori et Matsumoto, 2010 ; Pratt et Kolter, 1998 ; Wang *et al.*, 2014). Bien que certains pili, tels que ceux de type I d'*E. coli,* possèdent des

récepteurs spécifiques qui se lient à des substrats particuliers, la majorité des pili peut se fixer à une large gamme de substrats (Berne *et al.*, 2018). Par ailleurs, certains types de pili, notamment les pili de type IV, influencent l'organisation des bactéries aux surfaces, et la structuration ultérieure potentielle du biofilm grâce à leur rôle dans la motilité par twitching (Burrows, 2012 ; Klausen *et al*., 2003 ; O'Toole et Kolter, 1998).

3.2 Passage de l'adhésion réversible à une adhésion irréversible

Une fois l'initiation du premier contact bactérien avec la surface, cette adhésion peut être consolidée afin de générer un attachement plus permanent, qualifié d'adhésion irréversible. Ce passage est permis par différents processus, à la fois physico-chimiques et biologiques, qui peuvent agir de manière concomitante, mais que nous décrirons successivement, par souci de clarté. Une fois cette étape d'adhésion irréversible atteinte, la colonisation de la surface et l'établissement d'un biofilm bactérien peuvent débuter. Ces étapes ne seront toutefois pas détaillées ici, afin de se concentrer exclusivement sur les toutes premières phases de la formation du biofilm, qui ont constitué le cœur de ces travaux de thèse.

3.2.1 Renforcements des interactions

L'adhésion irréversible des bactéries à une surface repose sur une maturation progressive des interactions initialement faibles et réversibles, qui commence dès les premières minutes suivant le contact (Berne *et al*., 2018 ; Boks *et al*., 2008a ; Bozec *et al*., 2016 ; Carniello *et al.*, 2018 ; Vadillo-Rodríguez *et al*., 2004). À titre d'exemple, chez *Streptococcus thermophilus* la force d'interaction bactérie/surface double en 200 secondes (Figure 24) (Vadillo-Rodríguez *et al.*, 2004).

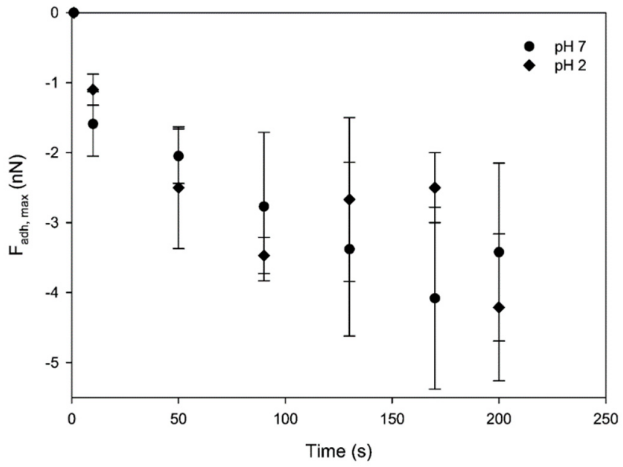


Figure 24. Force maximale d'adhésion de *Streptococcus thermophilus* mesurée par AFM en fonction du temps de contact avec la surface. Les valeurs négatives représentent la traction exercée par la pointe pour détacher la bactérie. D'après Vadillo-Rodríguez *et al.* (2004).

Cette maturation des interactions résulte de différents mécanismes coordonnés et débute probablement par l'élimination de l'eau interfaciale entre la bactérie et la surface, permettant un rapprochement étroit des deux entités et la formation d'interactions acide-base, favorisées sur des surfaces hydrophobes.

Certaines protéines de surface, bien que globalement hydrophiles, possèdent des domaines hydrophobes exposés qui facilitent cette exclusion de l'eau interfaciale (Berne *et al*., 2015 ; Olsson *et al*., 2010 ; Vadillo-Rodríguez *et al*., 2004) et il s'ensuit des réarrangements moléculaires qui renforcent l'adhésion par exemple en augmentant le nombre de points d'ancrage (Berne *et al*., 2013 ; DeBenedictis *et al*., 2016 ; Thomas *et al*., 2006).

Le repositionnement du corps bactérien à la surface, passant notamment d'un attachement polaire à longitudinal, augmente le contact avec la surface et renforce l'adhésion (Berne *et al*., 2018 ; Cooley *et al*., 2013 ; Gibiansky *et al*., 2010 ; Petrova et Sauer, 2012), facilité par la production de composés extracellulaires (Cooley *et al*., 2013). Ce processus peut aussi permettre à la bactérie d'exposer à la surface à coloniser ses structures les plus adhésives ou les plus favorables à l'interaction (Mouton *et al.*, 1980 ; Ronis *et al*., 2019), souvent couplées à une détection de la surface, déclenchant des réponses cellulaires qui renforcent l'adhésion et préparent la cellule à une colonisation durable.

3.2.2 Surface sensing

De nombreuses études ont montré que le premier contact avec une surface déclenche chez les bactéries une série de réponses biologiques complexes, leur permettant de renforcer leur ancrage aux surfaces et d'initier la formation du biofilm bactérien. Cette réponse traduit leur capacité à percevoir et interpréter des signaux à la fois mécaniques et chimiques. La détection de ces stimuli, appelée mécanosensation lorsqu'elle concerne un stimulus mécanique (tel que le contact avec une surface) peut conduire à une mécanotransduction si elle déclenche une réponse cellulaire spécifique. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la détection de surface restent actuellement difficiles à caractériser dans leur globalité, en raison des défis expérimentaux que pose l'étude de réponse cellulaires dynamiques, à l'échelle individuelle, et sur des échelles temporelles variables, allant de quelques secondes à plusieurs jours. Néanmoins, l'état de l'art est le suivant. À l'approche d'une surface, trois grands types de signaux semblent être détectés par les bactéries et peuvent conduire à une réponse adaptative : des modifications physico-chimiques de leur environnement proche, l'attachement de leurs appendices cellulaires aux surfaces ou encore le contact direct de l'enveloppe cellulaire avec la surface (Kimkes et Heinemann, 2020 ; Persat, 2017). Ces signaux (Figure 25), ainsi que les réponses qu'ils induisent font l'objet des paragraphes suivants.

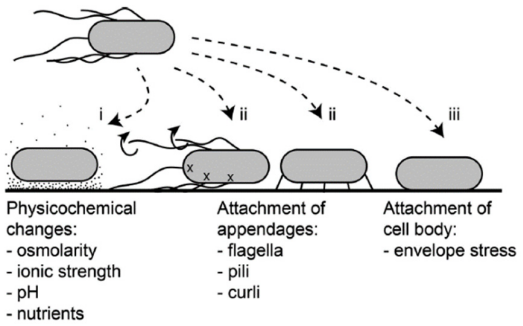


Figure 25. Vue schématique des différents signaux perçus par une cellule à l'approche d'une surface. D'après Kimkes et Heinemann (2020).

- **Modifications physico-chimiques proche paroi**

Le microenvironnement proche d'une surface diffère de celui du liquide environnant (Berne *et al.*, 2018 ; Goodman et Marshall, 1995). Par exemple, les surfaces chargées négativement, attirent des contre ions, provoquant une baisse locale du pH pouvant atteindre deux unités (Hong et Brown, 2010 ; Kimkes et Heinemann, 2020). Des variations locales de force ionique et d'osmolarité ont également été rapportées. La formation d'un film conditionnant à la surface peut enrichir localement l'environnement en nutriments, favorisant au passage la croissance bactérienne (Berne *et al.*, 2018 ; Kjelleberg *et al*., 1982 ; Marshall, 1988; Tuson et Weibel, 2013). Les bactéries détectent ces variations via des systèmes à deux composants, formés d'une histidine kinase sensorielle membranaire et d'un régulateur cytoplasmique, induisant une réponse adaptative. Bien que ces variations puissent également se produire dans le volume (bulk), le fait que certains de ces systèmes régulent des gènes liés à la formation du biofilm, comme la motilité dans le cas du système EnvZ/OmpR chez *E. coli* (Heyde et Portalier, 1987.; Sato *et al*., 2000 ; Thomas et Booth, 1992), suggère qu'ils participent indirectement à la détection de surface.

- **Attachement des appendices extracellulaires**

Lorsqu'une bactérie motile entre en contact avec une surface, la rotation de son flagelle peut être entravée, pouvant entraîner, selon les espèces, une augmentation du couple moteur et une modification du flux ionique à travers le stator (Belas, 2014 ; Kimkes et Heinemann, 2020). Ce signal mécanique, interprété comme un signal de contact, est converti en signaux biochimiques et conduit à des cascades de signalisations qui déclenchent des programmes transcriptionnels favorisant l'adhésion et la formation du biofilm. Ces mécanismes de mécanosensing et mécanotransduction, décrits dans de nombreuses revues de la littérature (Belas, 2014 ; Dufrêne et Persat, 2020 ; Kimkes et Heinemann, 2020 ; Persat, 2017) illustrent la capacité des bactéries à percevoir et traduire les contraintes physiques imposées par la surface.
L'inhibition de la rotation flagellaire active par exemple la production de la matrice du biofilm chez *Bacillus subtilis* (Cairns *et al*., 2013), ou encore stimule la production de c-di-GMP via la diguanylate cyclase SadC chez *P. aeruginosa* (Belas, 2014 ; Caiazza *et al*., 2007 ; Merritt *et al*., 2007). Les pili, notamment de type IV ou Tad, détectent la surface et leur rétractation génère une tension qui modifie leur conformation et déclenche des cascades de signalisation intracellulaire via des messagers tels le cAMP ou c-di-GMP. Ces signaux régulent la motilité de surface, l'adhésion et la synthèse de la matrice du biofilm, favorisant ainsi la transition vers un état sessile (Ellison *et al*., 2017 ; Kimkes et Heinemann, 2020 ; Persat, 2017).

- **Attachement du corps cellulaire**

Le contact d'une bactérie avec une surface provoque de légères déformations de l'enveloppe cellulaire (courbure membranaire, compression de l'interface cellulaire), qui peuvent être perçues comme un stress membranaire et stimuler la production d'adhésines (Berne *et al*., 2018 ; Kimkes et Heinemann, 2020). Par exemple, chez *E. coli*, il a été montré que ce contact active le système à deux composants Cpx, favorisant la transcription des curli et l'adhésion (Otto et Silhavy, 2002 ; Persat, 2017).

Chez *P. aeruginosa*, les déformations membranaires induites par le contact activent le système Wsp, augmentant le niveau de c-di-GMP, ce qui favorise la production de la matrice et la répression des gènes flagellaires (Francis *et al*., 2017 ; Güvener et Harwood, 2007).

3.2.3 Production des EPS

Enfin, le renforcement et la fixation irréversible des bactéries aux surfaces est complété par la synthèse de substances polymériques extracellulaires (EPS) (Berne *et al*., 2015 ; Carniello *et al*., 2018 ; Stoodley *et al*., 2002). Ces substances secrétées par les microorganismes sont essentiellement constituées de polysaccharides, de protéines, de glycoprotéines, de glycolipides et d'ADN extracellulaire (Flemming et Wingender, 2010 ; Azerado *et al*., 1999 ; Ras *et al.*, 2011). Elles forment un réseau capable de se lier à la fois à la cellule bactérienne et à la surface, via l'établissement de multiples liaisons polymériques qui consolident les forces d'adhésion initiales et sécurisent l'implantation bactérienne. La production d'EPS peut être stimulée dès les premiers contacts / minutes avec la surface, comme démontré chez *P. aeruginosa* par exemple (Crouzet *et al.*, 2017 ; Davies *et al*., 1993 ; Davies et Geesey, 1995 ; Rodesney *et al.,* 2017). Cette production se poursuit dans le temps, et, combinée à la croissance bactérienne à la surface, elle contribue à l'établissement d'un biofilm mature, structure dynamique qui évolue avec le temps, incluant des phénomènes d'attachement, de détachement et de remodelage (Dunne, 2002 ; Petrova et Sauer, 2016 ; Sauer *et al.*, 2022 ; Stoodley *et al*., 2002).

3.3 Influence de l'hydrodynamique sur l'adhésion bactérienne

Après avoir développé les principaux facteurs environnementaux présents à proximité de la surface à coloniser et susceptibles d'influencer l'adhésion bactérienne, il reste à aborder une dernière contrainte, non traitée jusqu'ici et constituant le cœur de ce travail : les conditions hydrodynamiques. Les paragraphes suivants décrivent les principaux effets connus de l'hydrodynamique sur l'adhésion pionnière aux surfaces.

- **Effets antagonistes du cisaillement sur le transport et l'adhésion bactérienne**

L'augmentation de la vitesse d'écoulement au sein d'un système est à l'origine de deux effets antagonistes sur l'adhésion bactérienne (Berne *et al*., 2018 ; Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Meinders *et al*., 1995). D'un côté, l'intensification des conditions hydrodynamiques, se traduisant par une augmentation de la vitesse d'écoulement, améliore l'efficacité de transport des bactéries vers la surface augmentant ainsi la probabilité de contact et donc les chances d'adhésion du microorganisme au support. Néanmoins, cette augmentation de vitesse s'accompagne d'un renforcement des contraintes de cisaillement exercées sur les bactéries. Celles qui ne parviennent pas à établir une interaction suffisamment forte avec la surface pour y résister sont rapidement détachées, sans avoir le temps d'instaurer une adhésion pérenne à la surface. Ces effets opposés entre transfert de masse et adhésion expliquent l'existence d'un seuil critique du taux de cisaillement, en dessous duquel le cisaillement est bénéfique à l'adhésion bactérienne, et au-delà duquel

elle est défavorisée (Bakker *et al*., 2002 ; Boks *et al*., 2008b). Cette valeur seuil dépend notamment de la nature du microorganisme et des caractéristiques physico-chimiques de la surface. Cette dualité a été mise en évidence dans de nombreuses études (Alves *et al.*, 2020 ; Chang *et al*., 2020 ; Korber *et al*., 1989 ; Lecuyer *et al*., 2011 ; Nejadnik *et al*., 2008 ; Park *et al*., 2011).

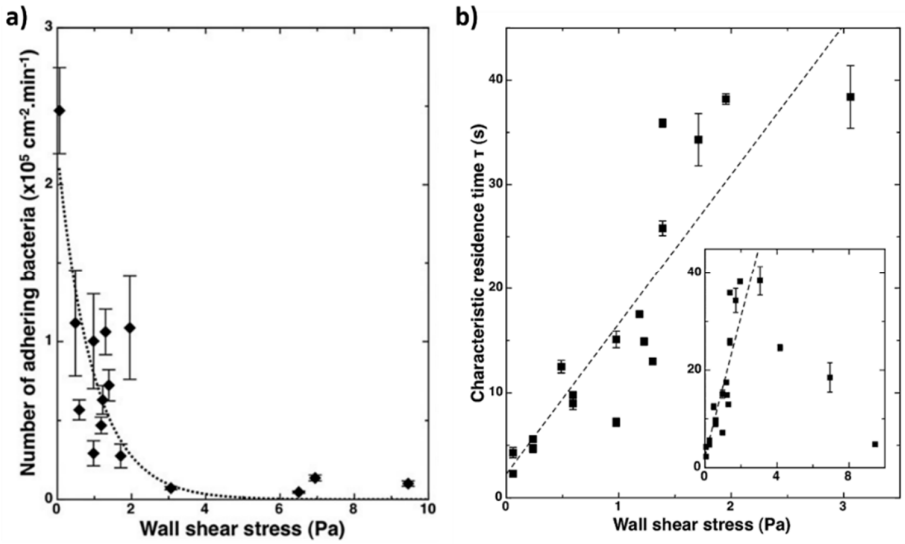


Figure 26. a) Nombre de bactéries adhérées et b) temps de résidence à la surface de *Pseudomonas aeruginosa* sur surface verre. D'après Lecuyer *et al*. (2011).

À titre d'exemple, Lecuyer *et al*. (2011) ont observé qu'une augmentation de la contrainte de cisaillement à la paroi du matériau, comprise entre 0,05 et 10 Pa (soit un taux de cisaillement de 50 à 10 000 s^{-1}) entraînait une diminution exponentielle du nombre de *Pseudomonas aeruginosa* adhérés sur du verre après 25 minutes d'exposition (Figure 26a). Cette dualité entre cisaillement et nombre de bactéries adhérées se reflète également sur un autre paramètre clé dictant le passage de l'adhésion réversible à irréversible : le temps de résidence sur la surface. Les auteurs ont montré que ce temps augmente de manière quasi linéaire avec le cisaillement jusqu'à un certain seuil critique proche de 3 Pa (Figure 26b). Pour expliquer cette adhésion cisaillement-dépendante, Lecuyer *et al*. (2011) avancent deux hypothèses principales : (i) une augmentation du nombre de liaisons formées entre la bactérie et la surface avec l'augmentation du cisaillement, ou (2) à nombre de liaisons équivalent, la formation de liaisons présentant une affinité plus forte. Les auteurs n'ont pas pu départager entre ces deux mécanismes, mais d'autres travaux ultérieurs sur d'autres espèces, détaillés ci-après, semblent davantage soutenir la seconde hypothèse.

- **Adhésion cisaillement-dépendante**

L'hypothèse selon laquelle l'affinité des adhésines peut augmenter sous cisaillement, et donc renforcer les forces de liaisons, a été confirmée expérimentalement. Ce mécanisme a d'abord été décrit chez *E. coli* sur la fimbrine de type I portant l'adhésine FimH (Thomas *et al*., 2002, 2006, 2008). Cette dernière renforce sa liaison au mannose sous stress mécanique par un changement conformationnel allostérique, phénomène

connu sous le nom de *catch-bond* (Dufrêne et Persat, 2020 ; Thomas *et al.*, 2006 ; Yakovenko *et al*., 2008). Comme illustré en Figure 27, Thomas *et al*. (2008) ont montré que plus l'adhésion est réalisée sous fort cisaillement, plus la fraction de bactéries restant attachée dans le temps est grande, indiquant une liaison plus stable.

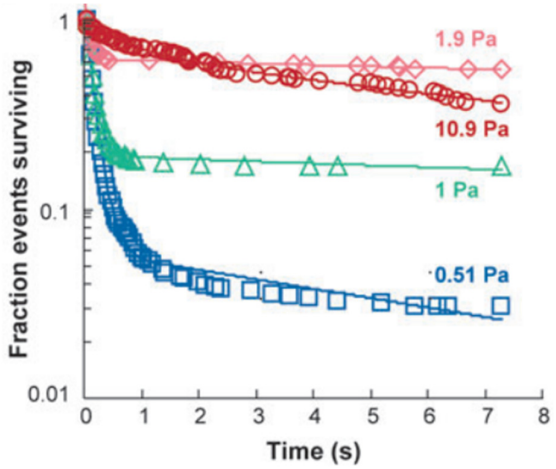


Figure 27. Fraction de bactéries restant adhérées dans le temps selon différentes forces de cisaillement : données expérimentales (symboles) et ajustement au modèle de catch-bond. D'après Thomas *et al*. (2008).

Sokurenko *et al*. (2008) suggèrent dans sa revue que de nombreuses adhésines pourraient avoir la capacité de former de tels *catch bonds* sous contrainte, et que ce mécanisme pourrait être répandu. Venant appuyer cette théorie, certaines études plus récentes utilisant l'AFM ont montré que certaines adhésines chez *Staphylococcus aureus* (SdrG, ClfA, ClfB) peuvent développer des forces d'adhésion atteignant l'ordre du nanonewton sous fort cisaillement (El-Kirat-Chatel *et al*., 2020 ; Herman *et al*., 2014 ; Kerrigan *et al*., 2008; Padron *et al.*, 2023a).

- **Modulation génétique de l'adhésion sous contrainte hydrodynamique ?**

Les mécanismes décrits précédemment sont purement physiques et ne dépendent pas de modifications de l'expression génétique. Cependant, quelques études ont montré que le flux pouvait déclencher des réponses transcriptionnelles (Alsharif *et al*., 2015 ; Ramachandran *et al*., 2024 ; Rodesney *et al*., 2017 ; Sanfilippo *et al*., 2019). Bien que peu nombreuses, ces recherches suggèrent des réponses transcriptionnelles en réponse au cisaillement. Par exemple, chez un *E. coli* entérohémorragique, Alsharif *et al.* (2015) ont montré que l'expression du locus de l'effacement des entérocytes (LEE), codant pour un système de sécrétion de type III (T3SS) et des protéines effectrices responsables des lésions d'attachement et d'effacement (A/E), est induite par le flux, avec une expression qui augmente proportionnellement au cisaillement. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, Rodesney *et al.* (2017) ont observé que l'adhésion sous flux stimule la production de di-GMPc de manière plus importante qu'en condition statique (Figure 28a), contribuant à la transition vers le mode de vie en biofilm. Toujours chez *Pseudomonas aeruginosa*, Sanfilippo *et al.* (2019) ont identifié un opéron sensible au flux, nommé froA-D, dont l'expression croît avec le cisaillement et est indépendante de l'attachement à la surface.

À titre d'exemple, son expression est 5 fois plus importante à 800 s^{-1} qu'à 8 s^{-1} après 2h de colonisation (Figure 28b). Cet opéron a été identifié comme nécessaire à la colonisation (Skurnik *et al.*, 2013), bien que son rôle précis sur l'activité cellulaire reste encore à élucider.

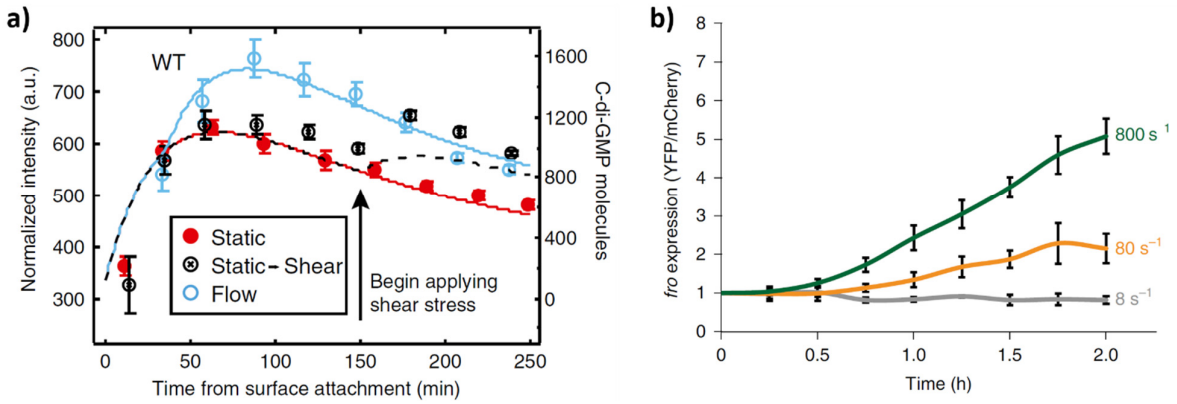


Figure 28. Réponse de *P. aeruginosa* au cisaillement : production de c-di-GMP (a) et expression de l'opéron fro (b). D'après Rodesney *et al.* (2017) et Sanfilippo *et al.* (2019).

- **Organisation spatiale et adaptations morphologiques des bactéries aux surfaces**

Enfin, certaines études ont montré que le cisaillement peut induire des adaptations morphologiques et des structurations spatiales chez les bactéries adhérées. Chez *Bacillus sp*. par exemple, une augmentation du cisaillement entraîne une réduction de la longueur des bactéries et une augmentation de leur largeur (Chang *et al.*, 2020). Young (2006) suggère que des modifications morphologiques pourraient permettre aux bactéries de limiter la surface exposée au flux et d'améliorer l'ancrage à la surface. Pour les coques, réduire la taille serait avantageux, tandis que chez les bacilles, l'alignement dans le sens du flux, éventuellement accompagné d'un allongement, pourrait diminuer les contraintes hydrodynamiques et augmenter les points de contact. Bien que ces hypothèses ne soient pas toujours confirmées, notamment pour le critère de la taille, comme le montrent les résultats de Chang *et al.* (2020), certaines études ont toutefois observé un alignement préférentiel des bactéries dans le sens du flux sous cisaillement (Korber *et al*., 1990 ; Liu *et al.*, 2011 ; Palalay *et al.*, 2023 ; Xu *et al*., 2021).

La formation de *clusters* (agrégats cellulaires), qui augmentent le nombre de points de fixation à la surface et réduisent le cisaillement perçu individuellement par les cellules (Hallinen *et al.*, 2025 ; Saur *et al*., 2017) est également observée à mesure que l'intensité de l'écoulement augmente. Par exemple, Saur *et al*. (2017) ont montré que l'augmentation du cisaillement (0,09 - 7,3 Pa) entraîne la formation de *clusters* à partir de 3,7 Pa, dont la taille croît avec le cisaillement. Enfin, au regard de certains résultats obtenus sur des particules colloïdales (Adamczyk, 2012, 2003 ; Ko et Elimelech, 2000 ; Van Loenhout *et al*., 2009), certaines études (Alves *et al*., 2020 ; Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Camesano *et al*., 2000) suggèrent qu'une bactérie adhérée peut créer autour d'elle une zone de « blocage hydrodynamique », limitant la fixation de nouvelles cellules à proximité. L'ampleur de cette zone augmenterait avec le cisaillement, influençant ainsi l'organisation et la densité bactérienne à la surface du support.

Bien que cette section se soit concentrée sur l'adhésion initiale des bactéries, il convient de noter que l'hydrodynamique influence également d'autres étapes de la formation du biofilm, telles que sa structuration 3D (Persat *et al*., 2014 ; Rossy *et al*., 2019 ; Santore, 2022 ; Secchi *et al.*, 2020), l'apport en nutriments et en oxygène des cellules au sein du biofilm (Pereira *et al*., 2002 ; Stoodley *et al*., 1999 ; Thomen *et al*., 2017), l'épaisseur et la compaction du biofilm (Mathieu *et al*., 2014 ; Pan *et al*., 2022 ; Wang *et al*., 2022b), son érosion (Chambless, 2022 ; Wang *et al*., 2022b) ou encore la composition de sa matrice d'EPS (Hou *et al.*, 2018 ; Lemos *et al*., 2015). Ces aspects, bien que importants, ne seront pas détaillés ici, car ils dépassent le cadre de cette étude.

4 Caractérisation du transfert et de l'adhésion des bactéries à la paroi

Les deux phénomènes que nous venons d'aborder, à savoir le transport et l'adhésion des bactéries aux parois, sont les précurseurs de la formation d'un biofilm. Comprendre ces deux processus est nécessaire pour envisager des stratégies de contrôle ciblées et efficaces. Ce contexte a donné naissance à un essor considérable d'approches expérimentales au cours des dernières décennies, grâce aux progrès réalisés dans les domaines de la microscopie, du traitement d'images et de la microfluidique. Sans prétendre à l'exhaustivité, cette section propose un état de l'art des méthodes traditionnellement utilisées pour le suivi individuel des bactéries, ainsi qu'une analyse de leurs limites. Nous présenterons ensuite les techniques innovantes qui émergent pour caractériser le déplacement bactérien en 3D, tout en discutant des obstacles à leur popularisation.

4.1 La microfluidique au service de l'étude des évènements pionniers

Apparus à la fin des années 1990 (Mosier et Cady, 2011), les systèmes microfluidiques se sont rapidement imposés dans de nombreuses applications microbiologiques telles que la détection rapide de bactéries pathogènes (Daniel *et al*., 2022 ; Spatola Rossi *et al*., 2023 ; Trinh *et al*., 2022 ; Zhang *et al*., 2025), leur dénombrement en suspension (Song *et al.*, 2010) ou encore l'évaluation de leur résistance aux antibiotiques (Bamford *et al*., 2017 ; Fradique *et al*., 2020 ; Pérez-Rodríguez *et al*., 2022). En lien avec nos travaux, ces dispositifs ont également permis d'évaluer la motilité bactérienne, ainsi que les interactions bactérie/paroi jusqu'au développement du biofilm (Kim *et al*., 2012 ; Lee *et al.*, 2008 ; Pérez-Rodríguez *et al*., 2022 ; Pousti *et al.*, 2019 ; Tang *et al.*, 2022 ; Yawata *et al.*, 2016 ; Yuan *et al.*, 2023 ; Zhang *et al*., 2019). Ces dispositifs ont des dimensions allant de quelques centaines de nanomètres à un millimètre et sont principalement fabriqués par lithographie douce en PDMS (polydiméthylsiloxane) : un matériau présentant plusieurs atouts pour la microbiologie microfluidique. Il est biocompatible, chimiquement inerte, souple, perméable aux gaz (notamment à l'oxygène), optiquement transparent et peu auto-fluorescent, sans oublier son absence de toxicité et son faible coût (Chen *et al.*, 2021 ; Mosier et Cady, 2011 ; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2022 ; Weibel *et al.*, 2007).

L'utilisation de ces systèmes permet de réduire les consommables et les déchets (faible volume de travail) tout en permettant de travailler à faible densité cellulaire. Ils sont faciles à utiliser, automatisables et parallélisables, ce qui en fait des outils expérimentaux puissants (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2022). Néanmoins, leurs atouts majeurs sont les suivants. Pour commencer, en raison de leur compacité et de leur transparence optique, ils permettent une imagerie microscopique en temps réel, ce qui est essentiel pour étudier des phénomènes dynamiques tels que la nage bactérienne ou l'adhésion initiale (Binz *et al.*, 2010 ; Ducret *et al*., 2009 ; Kaya et Koser, 2012 ; Lecuyer *et al.*, 2011 ; Tokárová *et al*., 2021 ; Ugolini *et al*., 2024). De plus, ils permettent d'imposer des conditions expérimentales précises et reproductibles, notamment en ce qui concerne l'hydrodynamique. Fonctionnant généralement en régime laminaire ($Re < 1$), ces systèmes assurent un profil de vitesse stable et dépourvu de turbulence, permettant un écoulement fluide entièrement prévisible et strictement contrôlé. Cette maîtrise autorise la mise en place de gradients chimiques ou hydrodynamiques dosés (nutriments, oxygène, cisaillement), reproduisant fidèlement les conditions environnementales rencontrées *in vivo* par les bactéries. Dans ce cadre, de nombreuses études microfluidiques ont permis de mettre en lumière des phénomènes biologiques fortement dépendent du cisaillement. Par exemple, les comportements de nage près des parois ou au sein du volume (*bulk*) (Kaya et Koser, 2012 ; Lauga, 2016 ; Marcos *et al.*, 2012 ; Rusconi *et al*., 2014) ou encore le caractère cisaillement-dépendant de l'adhésion bactérienne (Arpa-Sancet *et al*., 2012 ; Lecuyer *et al*., 2011 ; Park *et al*., 2011). À titre d'exemple, le système microfluidique utilisé par Lecuyer *et al*. (2011) pour étudier l'adhésion de *P. aeruginosa* sous différents cisaillements est présenté Figure 29a.

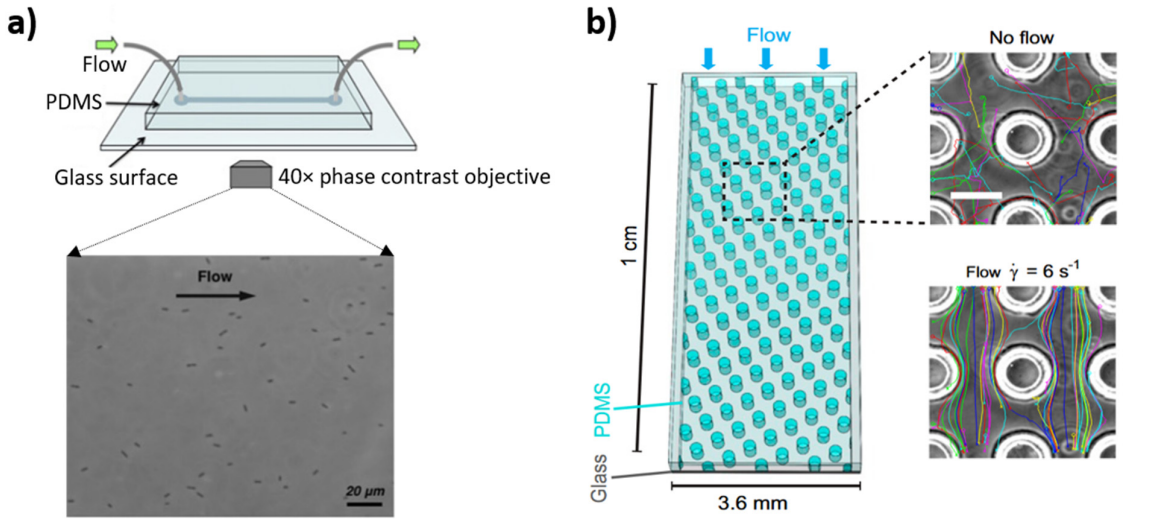


Figure 29. a) Exemple de dispositif microfluidique monté sur un microscope à contraste de phase pour l'étude en temps réel de l'adhésion bactérienne sous écoulement. Adapté de Lecuyer *et al.* (2011). b) Exemple de dispositif microfluidique (h = 100 µm) présentant un réseau de piliers circulaires, associé à des exemples de trajectoires individuelles de *Bacillus subtilis* en absence de flux et en présence d'un cisaillement modéré. Barre d'échelle : 65 µm. D'après Dehkharghani *et al.* (2019).

Les systèmes microfluidiques offrent également la possibilité de modifier localement les propriétés physico-chimiques de leurs parois internes (rugosité, topographie, mouillabilité, rigidité, hydrophilie,

hydrophobie) à l'aide de traitements de surface ciblés (plasma d'oxygène, dépôts chimiques, greffages de polymères, etc) (Manz *et al*., 2020). Cette propriété est particulièrement intéressante pour étudier l'influence de ces propriétés de surface sur les interactions bactéries / paroi (Chun *et al*., 2022 ; Zheng *et al*., 2021 ; Zhu *et al*., 2020) ou sur leur mouvement à la paroi de type twitching par exemple (Gomez *et al*., 2023 ; Shen *et al*., 2012). Enfin, ces systèmes permettent d'intégrer des architectures microstructurées (Manz *et al.,* 2020) : des piliers (Secchi *et al.*, 2020), des chicanes (Kumar *et al.*, 2013) que l'on peut placer au sein d'un canal ou répartir sur l'ensemble du dispositif pour créer une architecture de milieu poreux (Aufrecht *et al*., 2019 ; Dehkharghani *et al*., 2019 ; Valiei *et al*., 2012) comme présenté Figure 29b. Ces structures modifient l'écoulement et influencent directement le comportement bactérien (motilité, adhésion) comme le montrent ces études. La possibilité de créer également avec précision des gradients de molécules attractives ou répulsives en fait des outils idéaux pour l'étude du chimiotactisme bactérien et de l'observation de la nage qui en découle (Adler *et al*., 2012 ; Ahmed *et al*., 2010 ; Ahmed et Stocker, 2008 ; Li *et al*., 2025 ; Roggo *et al.*, 2018 ; Berg et Brown, 1972).

4.2 Méthodes optiques pour le *tracking* 2D de bactéries à proximité et à la paroi

Combinée aux dispositifs microfluidiques, la microscopie permet l'observation en temps réel du comportement bactérien. Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons aux premières bactéries colonisatrices des surfaces, ainsi qu'à celles se déplaçant par nage ou convection dans le *bulk* ou à proximité des parois. Cette section propose un aperçu des techniques de microscopie existantes adaptées au *tracking* de ces bactéries (Tableau 3).

Proche des parois, les bactéries sont généralement visualisées à l'aide de techniques de microscopie optique classiques (Madigan et Martinko, 2007 ; Dubay *et al.*, 2023 ; Palma *et al*., 2022 ; Zhang *et al*., 2023). Parmi celles-ci, la microscopie optique à champ clair est la plus simple et accessible. Elle repose sur la transmission directe de la lumière à travers l'échantillon, ce qui permet la visualisation directe des bactéries sans besoin au préalable de préparer l'échantillon. Cette approche a par exemple été utilisée pour suivre l'adhésion initiale de *Shewanella oneidensis* (Lee *et al.*, 2016), de *E. coli (Alves et al.*, 2020) ou pour suivre la nage à contre-courant de *E. coli* (Kaya et Koser, 2012). De plus, du fait du faible contraste d'indice de réfraction entre la bactérie et son milieu (eau le plus souvent), l'observation est rendue compliquée et nécessite bien souvent un post-traitement des images. C'est le cas dans les études mentionnées ci-dessus.

La microscopie à champ sombre peut alors être envisagée pour améliorer le contraste. Cette dernière recueille uniquement la lumière diffusée par les bactéries, ce qui permet d'améliorer la netteté des contours cellulaires. Elle a par exemple été utilisée pour mettre en évidence le comportement de nage en « tire-bouchon » des spirochètes (Sultan *et al*., 2013) ou pour dénombrer le nombre de bactéries d'*E. coli* adhérées sur une surface (La Spina *et al*., 2019). Elle est néanmoins sensible aux impuretés du milieu (artefacts visuels) qui peuvent nuire à l'interprétation des images.

Tableau 3. Principales techniques microscopiques utilisées pour le tracking des bactéries : principe, avantages et limites.

Techniques microscopiques	Principe	Avantages	Limites	Suivi 2D / 3D
Microscopie à champ clair	Lumière transmise uniformément. Le contraste est créé uniquement par l'absorption de la lumière par les bactéries. Ces dernières apparaissent ainsi légèrement plus sombres que le fond clair.	• Accessible • Faible coût • Rapide / Visualisation directe • Pas besoin de préparation	• Résolution limitée • Faible profondeur de champ • Faible contraste	2D
Microscopie à champ sombre	Éclairage oblique, seule la lumière diffusée par les bactéries est captée. Les cellules apparaissent blanches sur fond noir.	Comme microscopie à champ clair + contraste amélioré	• Résolution limitée • Faible profondeur de champ • Sensibilité accrue aux impuretés	2D
Microscopie à contraste de phase	Échantillon bactérien traversé par la lumière qui subit un déphasage ; converti en contraste visible.	Comme microscopie à champ clair + contraste amélioré	• Résolution limitée • Faible profondeur de champ • Effet de halo autour des cellules	2D
Microscopie à fluorescence	Utilisation de fluorochromes exogènes ou endogènes pour marquer spécifiquement les bactéries ; excitation par lumière spécifique et émission détectée pour observation.	• Forte spécificité • Imagerie en temps réel • Quantification • Plusieurs marquages à la fois possibles	• Faible profondeur de champ • Altération possible de la physiologie • Phototoxicité / Photoblanchiment • Coût important	2D
Microscopie couplée à un moteur piézoélectrique	Microscopie couplée à un moteur piézoélectrique qui permet un déplacement nanométrique automatique rapide en z. Permet de suivre le déplacement bactérien en z par focalisation en continue.	• Très bonne résolution • Suivi 3D	• Non adapté à des suspensions denses • Coût important • Vitesse de balayage en z	3D
Microscopie différentielle dynamique (DDM)	Technique basée sur l'enregistrement par un suivi vidéo de la lumière transmise ou diffusée par les bactéries. Puis traitement fréquentiel pour analyser les fluctuations locales de densité permettant d'en déduire le mouvement bactérien.	• Analyse de population dense • Obtention de paramètres collectifs • Utilisation d'équipements standards	• Pas de suivi à l'échelle individuelle	3D partiel
Microscopie holographique numérique (DHM)	L'échantillon est éclairé par un laser cohérent. La bactérie diffracte l'onde ; l'interférence qui en résulte entre l'onde de référence et celle diffractée est enregistrée sur un capteur ce qui forme un hologramme. Ce dernier est traité pour reconstruire les plans du volume. Les bactéries sont ensuite localisées et leurs trajectoires reconstruites.	• Suivi 3D de plusieurs centaines de bactéries • Analyse individuelle + comportement collectif • Moins coûteux qu'un moteur piézo	• Traitement des hologrammes long • Ressources numériques nécessaires	3D

Une autre approche plus fréquemment adoptée est la microscopie à contraste de phase (Dubay *et al.*, 2023). Cette dernière exploite les différences de phase induites par les variations d'indice de réfraction entre les cellules et le milieu environnant. Cette méthode a permis de suivre le phénomène de rhéotaxie chez *B. subtilis* (Marcos *et al.*, 2012), le déplacement surfacique de *P.aeruginosa* par twiching (Shen *et al*., 2012) ou encore l'adhésion des bactéries pionnières sous flux (Benoit *et al*., 2010 ; Lecuyer *et al*., 2011 ; Palalay *et al.*, 2023).

Enfin, la microscopie à fluorescence est aujourd'hui largement utilisée pour analyser le comportement des bactéries à la surface ou pour identifier la fonction de certaines de leurs structures extracellulaires pour l'adhésion bactérienne (Bridier *et al*., 2015). Cette méthode repose sur l'excitation de fluorophores exogènes (fluorochromes) ou endogènes (protéines fluorescentes produites par la bactérie telles que la GFP), qui émettent une lumière à une longueur d'onde précise. Elle permet notamment :

- De minimiser le bruit de fond et d'améliorer la détection et visualisation des bactéries (Dubay *et al.*, 2023).
- De suivre les bactéries par imagerie time-lapse aux parois, permettant ainsi de suivre leur attachement et leur mouvement à la surface.
- De visualiser les structures externes bactériennes impliquées dans la motilité et l'adhésion, telles que les flagelles, les pili ou les fimbriae, grâce à des marqueurs fluorescents spécifiques. Par exemple, Turner *et al.* (2000) ont utilisé un marquage fluorescent des flagelles pour analyser en temps réel les changements conformationnels associés au mouvement run-and-tumble chez *E. coli*, apportant une meilleure compréhension de sa nage. De même, Ellison *et al.* (2019) ont développé une méthode de marquage des pili de type IV de *V. cholerae* avec des molécules conjuguées au maleimide, permettant de suivre en temps réel leur dynamique d'extension et de rétraction. Ces travaux ouvrent la voie à une étude plus approfondie des propriétés fonctionnelles de ces structures lors de l'adhésion bactérienne. Pour une observation encore plus ciblée, des variantes de la microscopie à fluorescence ont été développées. C'est le cas de la microscopie TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*), qui excite uniquement les fluorophores situés dans une fine couche proche de la paroi ($\sim 100\ nm$) et permet un suivi en temps réel des interactions entre les structures bactériennes et la surface. Elle a par exemple été utilisée par Skerker et Berg (2001) pour suivre en temps réel les cycles d'extension et de rétraction à la paroi des pili de type IV chez *C. crescentus*, marqués au fluorophore Cy3, ainsi que les déplacements à la paroi de type twitching résultants. Notons ici que certaines techniques, issues de la microscopie à épifluorescence et dites de super résolution, telles que la microscopie STED (*Stimulated Emission Depletion*), STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) ou PALM (*PhotoActivated Localization Microscopy*), bien que ne permettant pas de suivi dynamique en temps réel, pourraient s'avérer prometteuses pour cartographier l'organisation spatiale des structures d'adhésion bactérienne au contact des surfaces avec une précision nanométrique (Coltharp et Xiao, 2012 ; Godin *et al*., 2014).

- Enfin, la microscopie à fluorescence permet également de quantifier l'expression de gènes d'intérêt, à l'échelle de la cellule unique, grâce à l'utilisation de systèmes rapporteurs fluorescents (Sanchez- Vizuete *et al.*, 2022 ; Sanfilippo *et al.*, 2019). Par exemple, Sanfilippo *et al*. (2019) ont mesuré l'expression de l'opéron *fro* chez *P. aeruginosa*, en calculant le ratio de fluorescence YFP (promoteur fro) / mCherry (marqueur constitutif), sur plusieurs centaines de cellules (Figure 30).

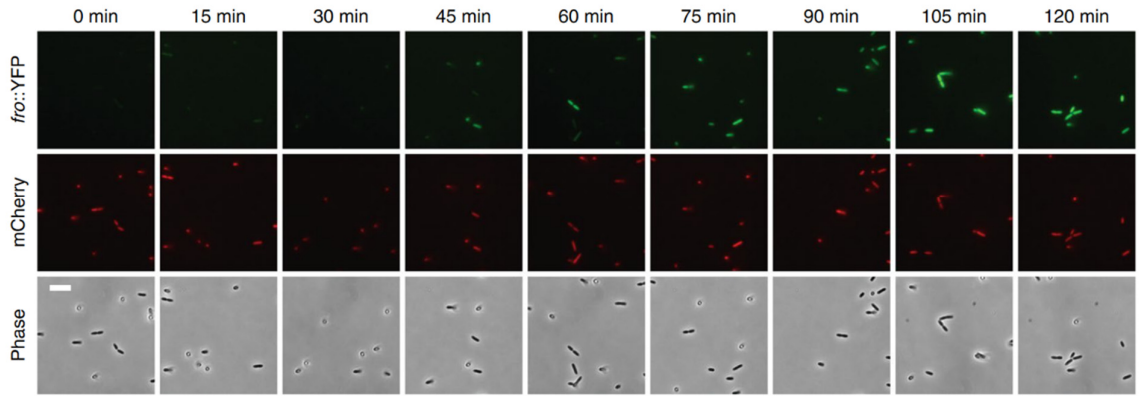


Figure 30. Cellules de *P. aeruginosa* exposées à un taux de cisaillement de 800 s^{-1} pendant 120 min. Canal supérieur : signal YFP (*fro* reporter), qui s'induit progressivement sous cisaillement. Canal intermédiaire : mCherry exprimé de façon constitutive (témoins de normalisation). Canal inférieur : contraste de phase. Barre d'échelle : 5 µm. D'après Sanfilippo *et al*. (2019).

Cependant, cette méthode présente également certaines limites. Parmi celles-ci, notons que le recours à des marqueurs fluorescents, qu'ils soient exprimés génétiquement ou introduits chimiquement, peut altérer la physiologie bactérienne. Dans le cas des protéines fluorescentes, leur expression, souvent assurée par un plasmide, impose une charge métabolique supplémentaire, liée à la production de la protéine ainsi qu'au maintien du vecteur. Certaines études ont ainsi mis en évidence un allongement du temps de génération, une altération morphologique (élongation cellulaire) probablement liée à une interférence avec les processus de division cellulaire (Leff et Leff, 1996 ; Rang *et al.*, 2003 ; Virgile *et al.*, 2019), une diminution de la virulence (Knodler *et al*., 2005), ainsi qu'une sensibilité accrue aux antibiotiques (Allison et Sattenstall, 2007) . D'autres travaux rapportent également une réduction de la motilité bactérienne ; de la vitesse de nage en raison de cette surcharge métabolique (Virgile *et al.*, 2019) ou encore, dans le cas de fusions de protéines fluorescentes à des composantes du moteur flagellaire, une diminution de la vitesse de rotation et des performances du moteur (Heo *et al*., 2017 ; Morimoto *et al*., 2020). Le marquage par fluorochromes peut également contribuer à ces altérations physiologiques, notamment en raison de la toxicité qu'ils peuvent engendrer à certaines concentrations cellulaires (Avalos Vizcarra *et al*., 2013 ; Deng *et al*., 2020 ; Hatzinger *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2021 ; Ullrich *et al.*, 1996). De plus, le suivi des bactéries par fluorescence nécessite une exposition prolongée à la lumière d'excitation pouvant induire des effets de phototoxicité ou entraînant un photoblanchiment des fluorophores, ce qui conduit à une perte de l'objet suivi (Demchenko, 2020 ; Dubay *et al*., 2023 ; Icha *et al.*, 2017 ; Sinnecker *et al.*, 2005).

La dilution progressive des marqueurs lors des divisions cellulaires peut aboutir au même résultat (Atwal *et al.*, 2016). Par ailleurs, la maturation nécessaire des protéines fluorescentes avant d'être détectables (Cambré et Aertsen, 2020 ; Hebisch *et al.*, 2013 ; Huang *et al.*, 2021), ainsi que certaines exigences comme la présence d'oxygène (Dubay *et al.*, 2023 ; Romei et Boxer, 2019), peuvent limiter leur utilisation. Enfin notons que le coût d'investissement (sources lumineuses, filtres spécifiques) est plus élevé que pour les autres méthodes citées auparavant.

Des techniques de microscopie plus avancées, telles que la microscopie confocale (CLSM) peut également permettre de suivre à l'échelle individuelles des bactéries et de leur dynamique dans un biofilm naissant (Ravel *et al.*, 2022) ou mature (Houry *et al.*, 2012). La CLSM, associée à la spectroscopie Raman, peut également être utilisée en systèmes microfluidiques pour caractériser l'architecture et la composition du biofilm (Kniggendorf *et al.*, 2016 ; Sandt *et al.*, 2007 ; Straub *et al.*, 2020 ; Tran *et al.*, 2022 ; Yawata *et al.*, 2010). Mais ces méthodes ne seront pas développées ici, car peu adaptées, compte tenu des processus de transfert et d'adhésion précoce que nous cherchons à étudier.

4.3 Méthodes optiques pour le *tracking* 3D des bactéries au sein du bulk

Les techniques de microscopie en 2D sont couramment utilisées pour observer les bactéries et leur accumulation en surface. Toutefois, leur application à l'étude du transport bactérien et de la motilité en milieu fluide présente des limitations. En effet, en raison de leur faible profondeur de champ, ces méthodes ne permettent qu'une visualisation partielle du mouvement bactérien, uniquement limitée à un plan focal. Cette contrainte rend impossible la reconstitution de trajectoires tridimensionnelles. En effet, lorsque les cellules sortent du plan focal, leurs trajectoires sont interrompues. Cette coupure biaise les statistiques représentatives du comportement des bactéries (vitesses, orientation) surtout lorsque celles-ci sont confinées. Pour limiter ces ambiguïtés, certains travaux se restreignent à l'observation des cellules demeurant dans le plan focal. Cette approche, bien qu'opérationnelle, introduit un biais de sélection, ne reflétant pas totalement le comportement global de la population (Acres *et al.*, 2021 ; Dubay *et al.*, 2023 ; Taute *et al.*, 2015).

Pour surmonter ces limitations, quelques techniques d'imagerie tridimensionnelles ont émergé. L'une des premières a été proposée par Berg et ses collaborateurs (Berg, 1971 ; Berg et Brown 1972). En couplant un microscope optique à une platine motorisée, pilotée par une boucle de rétroaction, ils ont conçu un dispositif capable de maintenir une bactérie focalisée en permanence dans les 3 dimensions. Bien que ne permettant uniquement le suivi d'une bactérie à la fois, cette étude a fortement contribué à la compréhension et la modélisation de la motilité bactérienne comme nous l'avons détaillé au paragraphe 2.2.2.2 de ce chapitre.

Dans la même logique méthodologique, une approche, illustrée Figure 31, a vu le jour très récemment (Darnige *et al.*, 2017). Elle consiste à combiner un moteur piézoélectrique avec une platine motorisée, ce qui permet d'acquérir rapidement des images sur différents plan z. Le principe repose sur l'acquisition séquentielle de plusieurs plans d'imagerie à haute cadence, suivie d'un post-traitement des images obtenues pour reconstruire les trajectoires dans les trois dimensions. Cette reconstruction s'appuie sur la détection des positions bactériennes sur chaque plan, puis sur l'interpolation spatio-temporelle de leurs déplacements. Cette configuration est très sensible ; néanmoins elle reste limitée par la vitesse de balayage en z, ainsi que par le temps d'exposition requis par plan (Palma *et al.*, 2022). De ce fait, elle est restreinte à l'analyse de quelques bactéries individuelles et ne permet pas un suivi à l'échelle populationnelle, ce qui la rend par exemple inadaptée à l'étude des comportements collectifs pouvant émerger lors de la nage bactérienne. Néanmoins, au sein du laboratoire à l'origine de cette méthode, sa mise en œuvre a généré des données quantitatives très pertinentes sur la nage bactérienne sous écoulement (Figueroa-Morales *et al.*, 2020 ; Junot *et al.*, 2022, 2019 ; Mathijssen *et al.*, 2019), qui ont permis d'affiner notre compréhension du couplage nage / écoulement (paragraphe 2.3 du chapitre).

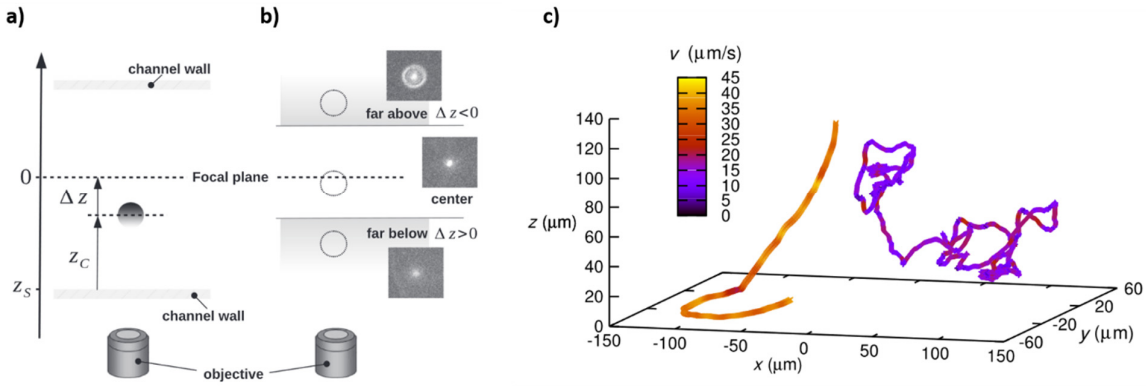


Figure 31. Fonctionnement du système de microscopie contrôlé par moteur piézoélectrique. (a) Schéma des positions relatives de la particule, de la platine et du plan focal. La correction axiale Δz représente la distance entre la particule et le plan focal. (b) Exemples de motifs optiques générés selon la position axiale de la particule (Darnige *et al.,* 2017). (c) Exemples de trajectoires 3D de *E. coli* obtenues avec cette méthode de suivi (Figueroa-Morales *et al*., 2020).

En parallèle de ces approches reposant sur un balayage mécanique du volume, d'autres techniques ont été explorées pour accéder aux dynamiques tridimensionnelles des bactéries. Parmi elles, la microscopie différentielle dynamique (DDM) s'avère être un outil intéressant pour caractériser la motilité bactérienne à l'échelle collective. Cette dernière fournit des informations statistiques globales sur la population en suspension (vitesses moyennes, coefficients de diffusion, etc), mais ne permet pas de reconstruire les trajectoires individuelles ou de localiser les bactéries en 3D... Son principe repose sur l'étude des fluctuations temporelles de densité locale de particules dans des séquences d'images acquises en champ clair. Cette méthode est adaptée à des suspensions concentrées en bactéries (10^8 - 10^9 cellules/mL), et présente l'avantage d'être rapide, non intrusive et compatible avec des configurations de microscopie optique standard (Arlt *et al*., 2018 ; Germain *et al.*, 2016 ; Martinez *et al.*, 2012 ; Wilson *et al*., 2011).

Enfin, pour accéder au suivi individuel tridimensionnel tout en s'affranchissant des contraintes liées à un balayage mécanique le long de l'axe z et en permettant le suivi d'une population bactérienne, la microscopie holographique numérique (*Digital Holographic Microscopy, DHM*) s'impose comme une technique de choix. Développée au milieu du XXème siècle par Denis Gabor (Gabor, 1948), la DHM a d'abord été appliquée à des domaines comme la physique et la science des matériaux (Tanner *et al*., 1966 ; Lee et Kim, 1986 ; Kumar et Hong, 2025 ; Katz et Sheng, 2010). Grâce aux progrès technologiques récents en optique laser, en capteurs numériques et en traitement d'images, elle suscite aujourd'hui un intérêt croissant en biologie pour caractériser la dynamique cellulaire (Kim et Lee, 2024). Elle a par exemple été appliquée au suivi de cellules sanguines (Nette *et al.,* 2022 ; Choi *et al*., 2012), de spermatozoïdes (Su *et al*., 2016 ; Jikeli *et al*., 2015), d'algues (Jericho *et al*., 2010) et, de manière particulièrement pertinente pour notre étude, de bactéries en suspension (Molaei et Sheng, 2016 ; Junot *et al*., 2019 ; Wang *et al*., 2016 ; Qi *et al*., 2017 ; Vater *et al*., 2014). Le principe de la DHM repose sur l'enregistrement, en une seule image, appelée hologramme, de l'ensemble de l'information optique d'un volume donné, c'est-à-dire à la fois l'amplitude et la phase du champ lumineux. L'échantillon est illuminé par un faisceau laser cohérent, et les interférences entre l'onde de référence et l'onde diffractée par les objets présents dans le champ sont capturées par une caméra (Kim, 2010 ; Kim et Lee, 2024 ; Katz et Sheng, 2010). Cette figure d'interférence est ensuite traitée par des algorithmes de rétropropagation numérique de la lumière, ce qui permet de reconstruire une série de plans focaux tout au long de l'axe optique. Les objets étudiés, dans notre cas les bactéries sont ensuite localisées sur chaque plan, et leurs positions reliées dans le temps par des algorithmes de *tracking* (Katz et Sheng, 2010 ; Kim et Lee, 2024 ; Kim, 2010). L'un des atouts majeurs de cette méthode réside dans sa capacité à reconstruire un grand volume 3D à partir d'une seule acquisition. Elle offre des profondeurs de champ pouvant atteindre jusqu'à 1 mm (Kühn *et al*., 2014), et permet de suivre simultanément des centaines de bactéries dans un volume sans marquage ni mise au point mécanique (Figure 32). Ce suivi à haute densité cellulaire fournit une puissance statistique élevée et permet des analyses à la fois individuelles et populationnelles. Par ailleurs, la DHM ne requiert pas d'équipement complexe ou coûteux au-delà d'une configuration optique relativement simple, typiquement un laser, un capteur numérique et un microscope (Kumar et Hong, 2025).

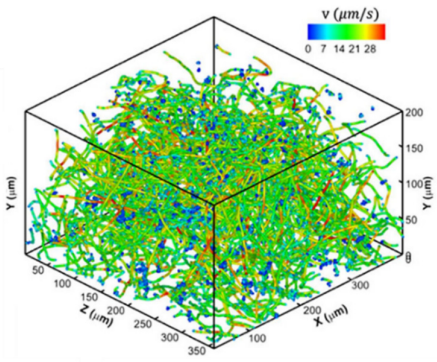


Figure 32. Trajectoires 3D de cellules d'*E. coli* obtenues par DHM. D'après Molaei et Sheng (2016).

Toutefois, plusieurs limitations techniques restreignent encore sa diffusion à plus grande échelle dans les laboratoires de recherche (Dubay *et al.*, 2023). Le traitement des hologrammes est à la fois chronophage et coûteux en ressources numériques : il nécessite souvent l'accès à des clusters informatiques ou à des systèmes de calcul haute performance. De plus, le faible contraste optique entre les bactéries et le milieu environnant nécessite souvent des traitements avancés et optimisés des hologrammes. Ces verrous techniques, à la fois optiques et informatiques limitent leur utilisation généralisée. En conséquence, de nombreuses études se concentrent à optimiser les algorithmes de reconstruction, les performances de détection…pour pallier à ces limites.

Les Tableau 4 et Tableau ***5*** présentent une synthèse des travaux identifiés dans la littérature ayant recours à la microscopie holographie pour le suivi en 3D de bactéries en suspension. Comme nous pouvons le constater, beaucoup d'études visent à améliorer la méthode elle-même et très peu ont réussi à mettre en œuvre la DHM dans des conditions expérimentales complexes, impliquant un grand nombre de trajectoires reconstruites ou la présence d'un écoulement. À ce jour, seules cinq études ont permis le suivi de plus de 1000 bactéries, et une seule a été réalisée en présence d'un écoulement. (Kühn *et al.*, 2018 ; Molaei *et al.*, 2014 ; Molaei et Sheng, 2016, 2014 ; Wang *et al.*, 2020a).

5 *Shewanella oneidensis MR-1*

En raison de sa facilité de culture en laboratoire et de sa capacité à coloniser des surfaces, la souche *Shewanella oneidensis* MR-1 a été choisie comme organisme d'étude. Sans prétendre à l'exhaustivité, cette dernière section vise à fournir un aperçu des principales caractéristiques de cette bactérie. Une attention particulière sera portée à sa motilité en milieu liquide ainsi qu'aux facteurs connus qui gouvernent sa capacité à adhérer aux surfaces, deux processus qui sont au cœur de nos investigations. Une légère disgression sera réalisée pour élargir le propos aux éléments qui influencent la capacité des bactéries à se développer et à former des biofilms à la surface une fois l'adhésion réalisée. Enfin, nous aborderons les connaissances disponibles concernant l'influence de l'hydrodynamique sur ces processus d'adhésion à la paroi par *S. oneidensis*, bien que très peu d'études aient traité ce sujet à ce jour.

5.1 Généralités sur la souche de *Shewanella oneidensis* MR-1

- **Origine écologique et taxonomique**

Shewanella oneidensis MR-1 (MR pour *Manganese Reducing*) est une bactérie environnementale, historiquement connue sous le nom *d'Alteromonas putrefaciens* MR-1 qui appartient au genre *Shewanella*. Ce genre, nommé en l'honneur du microbiologiste écossais James M. Shewan a été établi en 1985 sur la base des séquences des ARN 5S (MacDonell et Colwell, 1985), bien que certaines de ces espèces isolées dès 1931 aient longtemps été classées parmi les *Pseudomonas* (Sampson *et al.*, 2018).

Tableau 4. Résumé comparatif des travaux de recherche sur l'holographie 3D appliquée aux bactéries

Années	Bactérie étudiée	Nombre de trajectoires	Présence d'un flux	Objectifs de l'étude	Références
2014	*Pseudomonas aeruginosa*	35 trajectoires	Non	Caractérisation des motifs de nage de *P. aeruginosa*	Vater *et al.* (2014)
2014	*Escherichia coli*	2750 trajectoires	Non	Caractérisation du comportement de nage d'*E. coli* proche paroi et au sein du bulk	Molaei *et al.* (2014)
2014	*Escherichia coli*	2193 trajectoires	Non	Démontrer la faisabilité de leur algorithme de traitement des hologrammes pour suivre des suspensions bactériennes denses pendant une longue période de temps (10 min)	Molaei et Sheng (2014)
2015	*Escherichia coli* *Agrobacterium tumefaciens* *Pseudomonas aeruginosa*	~ 300 trajectoires	Non	Montrer la faisabilité de leur méthode de traitement des hologrammes (gain de temps) Application : effet antibiotique sur nage bactérienne	Cheong *et al*. (2015)
2016	*Escherichia coli*	10 trajectoires	Non	Tester l'utilisation d'un modèle de diffusion de la lumière pour la reconstruction du volume	Wang et al. (2016)
2016	*Escherichia coli*	6481 trajectoires	Oui / [0 30] s^{-1}	Caractérisation de la nage de *E. coli* sous écoulement	Molaei et Sheng (2016)
2017	*Escherichia coli*	278 trajectoires	Non	Caractérisation du mécanisme de capture bactérien à la paroi	Bianchi *et al*. (2017)
2017	*Escherichia coli*	Non précisé → mais très diluée (D0 = 0.0021)	Non	Faisabilité d'utiliser 2 lasers pour réduire les artefacts / améliorer traitement hologrammes	Farthing *et al.* (2017)
2017	*Escherichia coli* *Pseudomonas sp. nov776*	[100 : 500] trajectoires	Non	Etude adhésion sur une surface formée de polymères dégradables Caractérisation de la nage	Qi *et al.* (2017)
2018	*Bacillus subtilis* *Collwellia psychrerythraea*	~ 100 trajectoires	Non	Mise au point d'un algorithme détection des bactéries par machine learning	Bedrossian *et al*. (2018)
2018	*Escherichia coli* *Shewanella* spp.	4887 trajectoires	Non	Influence viscosité sur la nage bactérienne	Kühn *et al.* (2018)

Tableau 5. Résumé comparatif des travaux de recherche sur l'holographie 3D appliquée aux bactéries (suite)

Années	Bactérie étudiée	Nombre de trajectoires	Présence d'un flux	Objectifs de l'étude	Références
2019	*Escherichia coli* *Pseudomonas sp. nov776*	[100 : 500] trajectoires	Non	Etude rigidité de la surface sur le comportement de nage proche paroi	Peng *et al.* (2019)
2019	*Pseudomonas aeruginosa*	< 60 trajectoires	Non	Nage proche paroi	Hook *et al.* (2019)
2020	*Escherichia coli*	~1000 trajectoires	Non	Mise au point d'un algorithme pour reconstruire les trajectoires interrompues et étude de sa vérification	Wang *et al.* (2020a)
2021	*Vibrio alginolyticus* *Shewanella putrefaciens*	~10 trajectoires	Non	Comparaison d'une méthode d'analyse de la motilité en 2D VS en 3D	Acres et Nadeau (2021)
2022	*Escherichia coli*	~15 trajectoires	Non	Mise au point méthode reconstruction volumique - détection centre de masse particule	Tai *et al.* (2023, soumise)
2023	*Enterrobacter sakazakii*	[100 : 500] trajectoires	Non	Comportement de nage proche paroi du pathogène *Enterrobacter* en présence d'une surface recouverte de cellules probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus*)	He *et al.* (2023)
2023	*Shewanella sp. (strains UMDC1 et UMDC19)*	~500 trajectoires	Non	Comparaison de l'accumulation aux parois pour 2 souches différentes	Elius *et al.* (2023)
2024	*Escherichia coli*	200 trajectoires	Non	Utilisation et validation d'un système de neurones connectés pour accélérer la détection bactérienne lors du traitement des hologrammes	Mattews *et al.* (2024)

Le genre *Shewanella* compte environ 70 espèces bactériennes, appartenant à la famille des Shewanellaceae, à l'ordre des Alteromonadales et à la classe des γ-protéobactéries (Dikow, 2011). Parmi ce genre, *Shewanella oneidensis* MR-1 est probablement la plus étudiée par la communauté scientifique (Kouzuma *et al.*, 2014). Elle a été isolée pour la première fois en 1988 dans les sédiments du lac Oneida aux États-Unis (Heidelberg *et al*., 2002 ; Myers et Nealson 1988 ; Venkateswaran *et al*., 1999), un lac d'eau douce, bien qu'une origine marine de la bactérie soit défendue (Venter *et al.*, 2004). C'est une bactérie que l'on trouve dans les fonds marins, les habitats d'eau douce, le sol ou encore les sédiments (Myers et Nealson, 1988).

- **Caractéristiques morphologiques, physiologiques et métaboliques**

Shewanella oneidensis MR-1 est un bacille à Gram négatif non sporulé, mesurant 2 à 3 µm de long et 0,4 à 0,7 µm de large. Dans certaines conditions, elle présente des appendices de surface tels qu'un flagelle polaire, des pili de type IV ou des lipopolysaccharides (LPS) (Bouhenni *et al*., 2010 ; Korenevsky *et al.*, 2002 ; Krapf *et al*., 2016). C'est une bactérie mésophile dont la température optimale de croissance se situe vers 30°C (Venkateswaran *et al.*, 1999). Néanmoins, elle peut croître sur une large gamme de température (Abboud *et al.*, 2005), allant de 0 et 40°C, même si sa croissance à basse température engendre des modifications morphologiques et physiologiques (Abboud *et al.*, 2005 *;* Denich *et al*., 2003).
Shewanella oneidensis est une bactérie chimiohétérotrophe, capable de métaboliser divers substrats carbonés, notamment de petits acides organiques (acétate, pyruvate, lactate par exemple), des acides gras, des acides aminés, des peptides ou encore des nucléosides (Driscoll *et al*., 2007 ; Ringø *et al*., 1984 ; Yang *et al*., 2006). Certaines études ont également montré son caractère prototrophe (Serres et Riley, 2006), ou encore sa capacité à se développer en utilisant uniquement de l'ADN comme source nutritive (Pinchuk *et al*., 2011). La glycolyse est théoriquement incomplète chez *S. oneidensis* en raison de l'absence de l'enzyme 6-phosphofrutokinase (Heidelberg *et al*., 2002 ; Serres et Riley 2006), ce qui limite sa capacité à métaboliser des sucres à 5-6 carbones tels que le glucose. Néanmoins, des mutants capables de le métaboliser peuvent apparaître après seulement 24h d'exposition (Howard *et al.*, 2012).

Cette bactérie aérobie facultative présente plusieurs oxydases qui lui permettent de survivre dans des environnements oxygénés en utilisant le dioxygène comme accepteur d'électrons. Cependant la très efficace oxydase A, bien que codée dans le génome, n'est pas produite dans des conditions standard chez *S. oneidensis* MR-1 et ne participe donc pas à la réduction du dioxygène (Le Laz *et al*., 2016 , 2014). Par ailleurs, *Shewanella* est également non fermentative, ce qui constitue un obstacle à son établissement dans des niches strictement anoxiques, où elle y serait concurrencée par des organismes fermentatifs, acétogènes ou méthanogènes. Incapables de rivaliser à la fois dans des environnements aérobies et anaérobies strictes, le genre colonise très bien des zones stratifiées où les conditions redox variées lui sont favorables, en particulier les environnements microaérobies en raison du réseau respiratoire polyvalent de *Shewanella*.

En effet, en plus de l'oxygène, elle est capable de respirer sur plus d'une dizaine d'accepteurs d'électrons (Beblawy *et al.*, 2018). Que ce soit des composés carbonés (TMAO, fumarate, DMSO), inorganiques (nitrate, nitrite, sulfite, thiosulfate, soufre) ou encore des métaux (manganèse (Mn^{4+}/Mn^{3+}), fer (Fe^{3+})) (Krause et Nealson, 1997 ; Moser et Nealson, 1996 ; Myers et Nealson, 1988 ; Newman et Kolter, 2000). En conditions naturelles, le fer (Fe^{3+}) et le manganèse (Mn^{4+}/Mn^{3+}) sont majoritairement sous forme de précipités insolubles, difficiles à réduire. Néanmoins *S. oneidensis* dispose de plusieurs mécanismes (Figure 33) pour les réduire (Beblawy *et al*., 2018 ; Marsili *et al*., 2008 ; Subramanian *et al*., 2018 ; Lemaire *et al*., 2020) : soit 1) Par contact direct : certains cytochromes de la membrane externe peuvent transférer des électrons directement aux métaux lorsqu'il existe un contact étroit entre les deux ; 2) par sécrétion de flavines, qui servent de navettes à électrons pour réduire les métaux à distance ; 3) Par synthèse de nanowires. *S. oneidensis* peut synthétiser des excroissances de la membrane externe de 10 µm de long environ, riches en cytochromes et qui fonctionnent comme des fils conducteurs pour transférer les électrons aux métaux insolubles.

En dehors de ses accepteurs d'électrons, *S. oneidensis* peut réduire des métaux comme l'uranium ou le chrome (Cherkouk *et al.,* 2016 ; Myers *et al.,* 2001). Ces derniers ne semblent pas être utilisés comme substrats respiratoires mais leur réduction diminue leur solubilité, donc leur toxicité, ce qui permet à *S. oneidensis* de survivre dans des environnements contaminés.

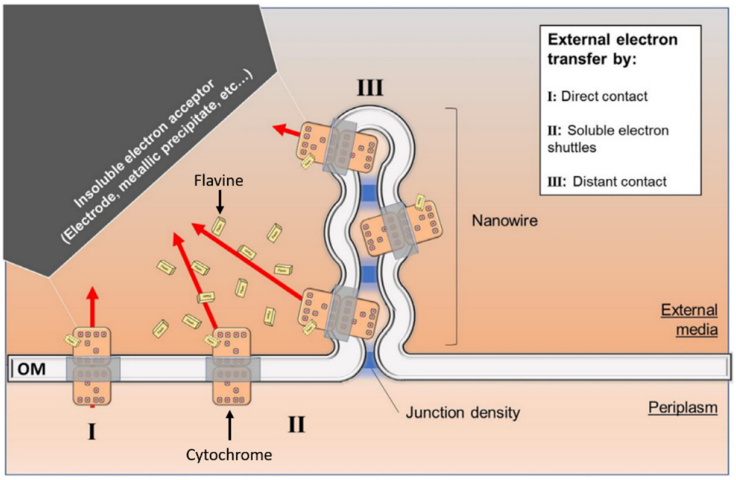


Figure 33. Mécanismes de transfert extracellulaire d'électrons vers des accepteur d'électrons insolubles chez *S. oneidensis*. D'après Lemaire *et al.* (2020).

- **Génome**

Le génome de *S. oneidensis MR-1*, séquencé en 2002 (Heidelberg *et al*., 2002), comprend un chromosome circulaire de 4,9 mégabases contenant 4758 cadres de lecture ouverts (CDS), ainsi qu'un plasmide (appelé « mégaplasmide ») d'environ 161 kilobases contenant 173 CDS. Outre les autres espèces de son genre, son plus proche parent génétique est *Vibrio cholerae*, qui est également une γ-protéobactérie.

Parmi les spécificités de son génome qui ne sont pas abordées précédemment, nous pouvons citer :

- Présence de 4 prophages (LambdaSo, MuSo1, MuSo2 et CP4So), dont trois sont capables de s'induire et de se répliquer : LambdaSo, MuSo2 et CP4So, ce dernier uniquement par le froid. (Binnenkade *et al*., 2014 ; Gödeke *et al.,* 2011 ; Gao *et al*., 2004 ; Zeng *et al.,* 2016 ; Guo *et al*., 2019).
- Une richesse en éléments génétiques mobiles, avec 219 gènes codant pour des transposases et 41 types de séquences d'insertion identifiés (Romine *et al.*, 2008).
- Un réseau sensoriel et régulatoire développé, comprenant 47 gènes codant pour des systèmes à une composante, 211 à deux composantes (Heidelberg *et al.*, 2002), ainsi que l'un des plus grands ensembles de gènes liés à la signalisation au c-di-GMP avec 51 gènes codant pour des diguanylate cyclases, 27 de phosphodiestérases et 20 protéines hybrides (Fredrickson *et al.*, 2008).
- Un nombre élevé de gènes codant pour des cytochromes c : 41 cytochromes c prédits chez *S. oneidensis*, contre 5 à 7 pour *E. coli*, ce qui contribue à sa forte versatilité respiratoire (Fredrickson *et al*., 2008 ; Gao *et al.*, 2010 ; Romine *et al.*, 2008).

- ***S. oneidensis* et biotechnologies**

S. oneidensis suscite un grand intérêt en raison de ses applications potentielles dans divers domaines biotechnologiques (Hau et Gralnick 2007 ; Ikeda *et al*., 2021 ; Lemaire *et al*., 2020). Tout d'abord, sa capacité à réduire des métaux solides et toxiques (chrome, uranium, plutonium…) en fait un candidat prometteur pour le développement de stratégies de bioremédiation d'environnements contaminés (Cherkouk *et al*., 2016 ; Myers *et al*., 2001). De plus, sa capacité à transférer des électrons vers des accepteurs insolubles fait d'elle une bactérie très étudiée pour la conception de piles microbiennes (*Microbial Fuel Cell*, MCF) (Pinck *et al*., 2017 ; Zou *et al.,* 2019 ; Newton *et al*., 2009). Dans ces systèmes, *S. oneidensis* forme des biofilms sur l'anode, oxyde les substrats organiques du milieu en utilisant l'anode comme accepteur terminal d'électrons, ce qui génère un courant électrique. Les mécanismes de transfert extracellulaire d'électrons (Figure 34) sont mobilisés. Enfin, de manière plus anecdotique, sa capacité à utiliser le nitrate comme accepteur d'électrons pourrait être exploitée pour la synthèse de nanoparticules d'argent aux propriétés antimicrobiennes à large spectre (Ng *et al*., 2013).

5.2 Motilité de *Shewanella oneidensis* MR-1

Shewanella oneidensis MR-1 possède différents appendices extracellulaires (un flagelle et des pili de type IV), qui lui confèrent la capacité de se déplacer en milieu liquide (« swimming » : nage bactérienne) ou sur une surface (« swarming » ou « twitching ») selon la classification actuelle de la motilité (Partridge, 2022 ; Wadhwa et Berg, 2022). Dans les paragraphes suivants nous avons choisi de limiter les informations à l'appendice de nage de *S. oneidensis*, le flagelle, car c'est ce dernier qui est principalement impliqué dans le transfert des bactéries du fluide à la paroi, sujet de cette étude.

5.2.1 Flagelle de *Shewanella oneidensis*

S. oneidensis MR-1 se déplace en nageant grâce à son unique flagelle polaire non gainé. Ce dernier a la particularité de présenter 2 systèmes de stator différents pour la motorisation de son flagelle : pomAB (sodium dépendant) et motAB (proton dépendant) (Duhl *et al.,* 2018 ; Paulick *et al*., 2009). Ces deux systèmes se suffisent à eux-mêmes pour permettre la rotation du flagelle, même si pomAB semble avoir un rôle majoritaire. La présence de motAB devient en effet pertinente uniquement lorsque la concentration en sodium est faible (< 5mM), ce gène ayant probablement été acquis par transfert horizontal en réponse à un environnement pauvre en sodium (Paulick *et al*. 2009 ; Paulick *et al*., 2015).

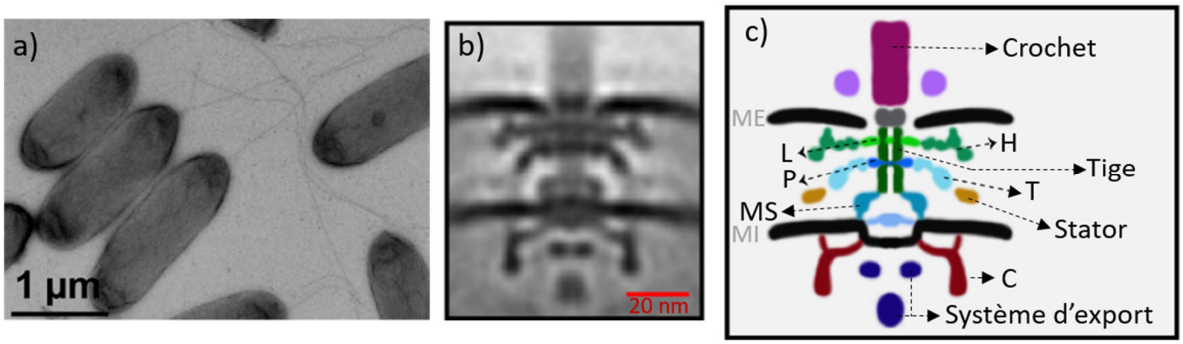


Figure 34. a) Image TEM de *S. oneidensis* après marquage du flagelle. D'après Wu *et al.* (2011). (b-c) Visualisation de la base du flagelle de *S. oneidensis* par cryo-tomographie électronique (b) et schéma correspondant (c). ME : membrane externe ; MI : membrane interne. Les autres annotations indiquent les composants du moteur flagellaire (les anneaux : L, P, MS, H, T, C ; les stators et la tige mobile), ainsi que le crochet et le système de sécrétion de type III. D'après Kaplan *et al*. (2019).

De manière simplifiée, la composition connue du flagelle de *S. oneidensis* comprend (Figure 34) (Kaplan *et al*., 2019 ; Lou *et al*., 2025) :

- 7 à 11 stators en moyenne. L'incorporation des stators MotAB augmente lorsque la concentration en sodium du milieu diminue ; alors que celle des stators PomAB est indépendante des conditions environnementales (Paulick *et al*., 2015).
- En plus des anneaux (L, P, MS et C) entourant la tige mobile du moteur flagellaire, *S. oneidensis* possède 2 autres anneaux périplasmiques : T et H; le rôle précis de chacun d'entre eux restant à déterminer (Kaplan *et al*., 2019).
- Un filament composé de 2 types de flagellines : FlaA et FlaB, aux rôles distincts. Les mutants ΔFlaB présentent une motilité réduite, tandis que les mutants ΔFlaA nagent comme la souche sauvage. (Shi *et al*., 2013 ; Wu *et al*., 2011). Ces flagellines contribuent à la stabilité du flagelle lors de sa rotation. Le filament est relié au corps basal via le crochet (FlgE) et la jonction du crochet (FlgK et FlgL).
- Un corps basal comprenant un système de sécrétion de type III spécifique au flagelle, constitué de 5 protéines membranaires (FlhA, FlhB, FliP, FliQ et FliR) et de 3 protéines cytoplasmiques (FliH, Flil et FliJ).

L'assemblage du flagelle de *S. oneidensis* nécessite l'expression de plus de 70 gènes exprimés en cascade (Heidelberg *et al.,* 2002 ; Wu *et al.,* 2011).

À l'exception de ceux codants pour les moteurs (pomAB, motAB, motX et motY), tous les gènes impliqués dans la synthèse des constituants du flagelle sont regroupés dans une région de 155 kb. Trois clusters, notés A-I, A-II et A-III ont été identifiés et 17 opérons ont été définis (Wu *et al.*, 2011) (Figure 35).

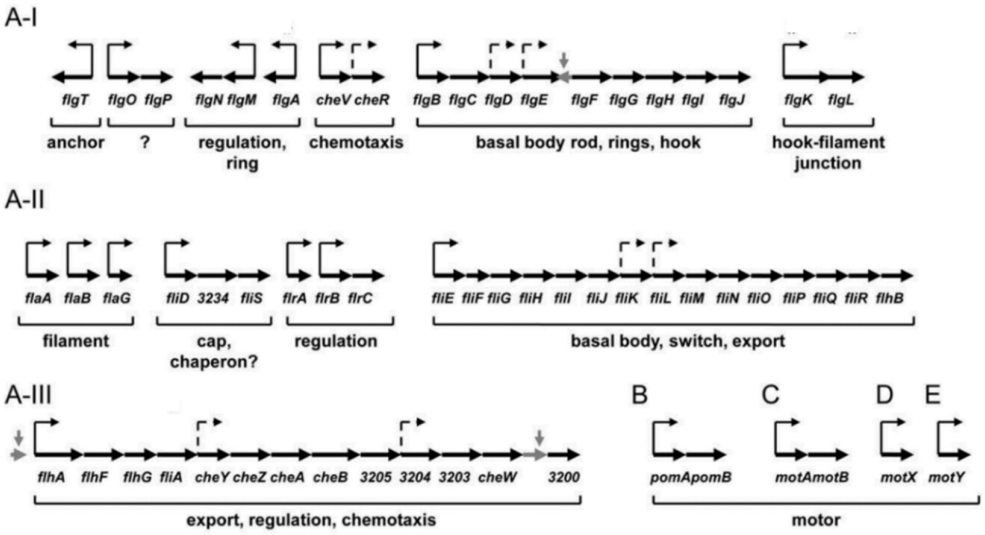


Figure 35. Représentation de l'organisation des gènes flagellaires de *S. oneidensis*. D'après Wu *et al.* (2011).

Notons également que cet assemblage est sous le contrôle de facteurs transcriptionnels (4 principaux : FlrA, σ^{54}, FlrC et FliA (σ^{28})) et qu'il fait intervenir des protéines du chimiotactisme, capables de moduler la rotation du flagelle et la direction de nage (Gao *et al.*, 2018). Comme tout flagelle, son assemblage est énergivore et chronophage, et il est donc fortement régulé. Cette régulation, combinée à la possession d'un unique flagelle polaire, confère à la bactérie un avantage sélectif en optimisant le compromis motilité/coût énergétique par rapport à des souches *S. oneidensis* mutantes en possédant zéro ou plusieurs (Yang et Chen, 2020).

5.2.2 Comportement de nage de *Shewanella oneidensis*

Le comportement de nage et de réorientation de *S. oneidensis MR-1* est à ma connaissance peu documenté. Pour rappel, les différents comportements de nage sont présentés à la partie 2 du chapitre 1. Une étude récente réalisée au sein d'un dispositif microfluidique montre que *S. oneidensis* MR-1 présente un mode de locomotion hybride (Stricker *et al.*, 2020). D'une part, elle peut se déplacer suivant un comportement typique des bactéries monoflagellées, dit « Run-Reverse-Flick » (Grognot et Taute 2021 ; Thormann *et al.*, 2022), où la cellule alterne propulsion avant, inversion de sens et réorientation. Stricker *et al.* (2020) montrent que ce mode est associé à des trajectoires droites ou légèrement courbées et à une vitesse d'environ 75 µm/s. Néanmoins, ils observent également que certaines bactéries adoptent un comportement plus proche du « Run-and-Tumble » des bactéries péritriches, avec des réorientations plus fréquentes, des changements d'angles plus faibles (<70°) et une vitesse réduite (~ 25 µm/s).

L'alternance de ces deux modes permet de diversifier les trajectoires au sein de la population, favorisant ainsi une exploration plus efficace de l'environnement.

D'autres études ont permis d'estimer la vitesse moyenne de nage de *S. oneidensis* à environ 53 ± 8 µm/s (Paulick *et al*., 2009 ; Sun *et al.,* 2013); proche des valeurs observées par Stricker *et al*. (2020) si l'on considère la coexistence des deux comportements dans la population. Comme pour toutes bactéries, cette vitesse de nage est modulée en fonction des conditions environnementales. La concentration en sel notamment module sa nage en lien direct avec l'activation de sa pompe sodium. À titre d'exemple, en milieu LM supplémenté avec 25 mM de NaCl, la vitesse est d'environ 65 µm/s, tandis qu'en absence de NaCl la vitesse est quasiment réduite de moitié (Paulick *et al.*, 2009). La viscosité du milieu peut également modifier le comportement de nage de *S. oneidensis*, induisant à forte viscosité l'enroulement du flagelle autour du corps cellulaire pour maintenir la propulsion (Kühn *et al.*, 2018, 2017 ; Lou *et al*., 2025).

Enfin, la direction de nage peut être modulée par des signaux chimiques attractifs ou répulsifs, via la chimiotaxie. Il a été démontré que *S. oneidensis* est capable de percevoir et de répondre à certains signaux chimiques. On sait notamment qu'elle est attirée vers certains composés, correspondant principalement aux nombreux accepteurs terminaux d'électrons qu'elle peut utiliser pour sa respiration, tels que l'O_2 (aérotaxie) (Armitano *et al.,* 2013 ; Stricker *et al*., 2020), ainsi que le TMAO, le DMSO, le fumarate, le nitrate, le fer et le manganèse (Marsili *et al.,* 2008 ; Oram et Jeuken 2019 ; Baraquet *et al*., 2009).
Baraquet *et al*. (2009) ont montré que le signal chimiotactique perçu par les chimiorécepteurs (MCPs) résulte de la force proton motrice générée par la respiration sur ces accepteurs ; et non de la présence des accepteurs en eux-mêmes. L'aérotaxie est particulièrement étudiée chez *S. oneidensis,* car elle est un facteur clé, en lien avec la motilité et des protéines régulant le chimiotactisme et c-di-GMP (Armitano *et al*., 2013 ; Boyeldieu *et al*., 2020 ; Gambari *et al*., 2019 ; Liang *et al*., 2012), pour l'initiation et la formation du biofilm à l'interface air-liquide (ALI) (Armitano *et al.,* 2014) ou pellicule, qui constitue une niche écologique favorable concentrant oxygène et nutriments (Armitano *et al.*, 2014). *S. oneidensis* est également attirée par des flavines oxydées (Marsili *et al*., 2008 ; Oram et Jeuken, 2019), le malate, le cuivre et le chromate (Armitano *et al*., 2011). Parmi les signaux répulsifs on compte le nickel (Bencharit et Ward, 2005) et le cobalt (Armitano *et al.*, 2011).

Le génome de *S. oneidensis* contient 27 gènes codant pour des MCPs, un nombre élevé par rapport à d'autres espèces bactériennes, ainsi que 3 clusters de gènes *che* distincts (Fredrickson *et al.*, 2008) :

- Le système Che1, qui est impliqué dans la régulation globale en conditions de stress de *S. oneidensis* mais qui n'intervient pas dans le chimiotactisme (Armitano *et al.*, 2013 ; Bouillet *et al*., 2017 ; Gumerov *et al*., 2020).

- Le système Che2, qui potentiellement n'est pas fonctionnel ; le séquençage du génome de *S. oneidensis* montrant en effet l'interruption du gène codant l'histidine kinase ainsi que d'un MCP par une séquence d'insertion (Heidelberg *et al.*, 2002).
- Le système Che3, contenant les gènes codant pour CheA3, CheY3, CheW3, CheZ et CheB3 et qui est dédié au chimiotactisme chez *S. oneidensis* (Armitano *et al*., 2013 ; Gumerov *et al*., 2020).

5.3 Capacité de *S. oneidensis MR-1* à coloniser les surfaces

Nos travaux portant sur l'adhésion pionnière de *S. oneidensis* MR-1 à une surface, nous nous sommes intéressés aux paramètres connus dans la littérature impactant ce processus d'adhésion. Les facteurs impactant les étapes ultérieures de formation du biofilm ont également été considérés. Bien que *S. oneidensis* MR-1 puisse également former des biofilms à l'interface air/liquide (pellicules), ces structures reposent sur des mécanismes différents et ne seront pas abordées ici. Pour les lecteurs intéressés, nous renvoyons à la revue d'Armitano *et al*. (2014).
Nous nous focalisons donc sur les biofilms de surface. Pour rappel, leur formation se déroule en plusieurs étapes (Figure 36) : le transfert (passif ou actif) des bactéries vers la paroi, leur adhésion via des interactions, puis leur croissance à la paroi avec la production de la matrice, ce qui conduit à un biofilm mature avec une structure tridimensionnelle. Cette structure est dynamique et évolue avec le temps jusqu'au détachement des cellules (Flemming *et al*., 2016 ; Sauer *et al*., 2022).

La partie 3 de la synthèse bibliographique a mis en évidence l'importance des propriétés physico-chimiques de l'enveloppe bactérienne dans sa capacité à interagir et adhérer à une surface. *S. oneidensis* MR-1 possède une enveloppe complexe, dont la composition varie selon les conditions de croissance (pH, accepteurs d'électrons) (Furukawa et Dale, 2013). Cette enveloppe est caractérisée par une hétérogénéité chimique (Jahnke *et al*., 2016) et une charge de surface relativement faible pour une Gram négative. *S. oneidensis* est en effet beaucoup moins électronégative que d'autres souches de *Shewanella*, probablement en raison de la composition de son LPS et la présence d'une microcapsule (20-30 nm) de faible charge (Korenevsky et Beveridge, 2007). Cette faible électronégativité peut suggérer que la bactérie rencontre moins de répulsion électrostatique en approche d'une surface négative et en conséquence que son adhésion n'est pas dominée par les interactions électrostatiques.

L'adhésion initiale de *S. oneidensis* repose également sur des structures de surface telles que les pili de type IV, le flagelle et des adhésines. Des mutants dépourvus de pili présentent une adhésion réduite, bien que la formation du biofilm mature ne soit pas impactée (Thormann *et al.*, 2004). À l'inverse, l'adhésion de *S. oneidensis* mutée pour les gènes du système flagellaire n'est pas modifiée comparativement à la souche sauvage, suggérant qu'il n'est pas déterminant pour l'attachement initial dans leurs conditions expérimentales (Thormann *et al*., 2004 ; Lee *et al.,* 2016).

Enfin par analogie au système Lap de *P. fluorescens*, *S. oneidensis* MR-1 possède un système Bpf, « Biofilm Promoting Factor », comprenant l'adhésine BpfA et le complexe de sécrétion composé des protéines AggA, AggB et AggC (Zhou *et al*., 2015). Un mutant déficient dans ce système conduit à une adhésion plus faible que la souche WT (De Vriendt *et al*., 2005 ; De Windt *et al*., 2006).

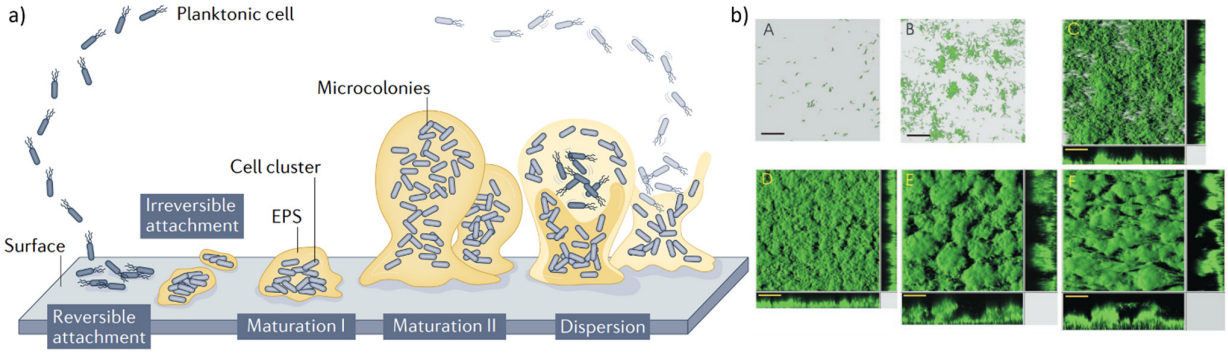


Figure 36. a) Formation d'un biofilm en 5 étapes : 1) Transfert et attachement réversible des bactéries à la surface. 2) Adhésion irréversible avec renforcement des interactions et début de production d'EPS. 3) Maturation I avec la formation de clusters à la paroi. 4) Maturation II avec le développement d'un biofilm mature riche en EPS. 5) Dispersion, détachement de cellules ou d'amas de la structure 3D. D'après Sauer *et al*. (2022). b) Illustration par microscopie confocale d'un biofilm de *S. oneidensis* MR-1 (gfp+) après 1, 8, 16, 24, 48 et 120 h (A-F). Barre d'échelle = 80 µm. D'après Thormann *et al.* (2004).

Concernant les étapes de maturation du biofilm de *S. oneidensis*, les études montrent l'implication du quorum sensing, via l'auto inducteur AI-2 par LuxS (Learman *et al*., 2009), molécule universelle permettant la communication inter-espèce (Cao et Meighen, 1989). En effet, le génome de *S. oneidensis* se distingue par une abondance de gènes codant pour des protéines impliquées dans la signalisation du c-di-GMP (Fredrickson *et al.*, 2008 ; Heidelberg *et al.*, 2002). Des travaux ont confirmé que les niveaux intracellulaires de c-di-GMP contrôlent la stabilité du biofilm de *S. oneidensis* (Thormann *et al*., 2006).

La production de la matrice de son biofilm, permise par la synthèse des exopolysaccharides est sous le contrôle de l'opéron mxdABCD (Saville *et al.*, 2010). La transcription de cet opéron est régulée par le système Arc (Anoxic Respiration Control), dont un mutant de délétion est incapable de former un biofilm mature (Binnenkade *et al.*, 2011).Enfin sa matrice se caractérise par une richesse en ADN extracellulaire, provenant probablement de la lyse cellulaire induite par ses prophages (Gödeke *et al*., 2011). Le retrait de cet ADNe met en évidence son importance à toutes les étapes de formation du biofilm : adhésion initiale et développement comme montré chez de nombreuses espèces (Vilain *et al*., 2009 ; Das *et al*., 2010), et ensuite pour structurer le biofilm.

Enfin, les facteurs environnementaux influencent également la formation du biofilm. Il a été montré que la disponibilité en nutriments et carbone régule la dynamique de formation du biofilm (Martín-Rodríguez *et al*., 2014 ; Thormann *et al.*, 2004 ;Chen et Ding 2023). La supplémentation du milieu de culture en fer (Fe^{2+} ou Fe^{3+}) ou en riboflavine (Arinda *et al*., 2019 ; Erben *et al*., 2021; Gödeke *et al.,* 2012) stimule la croissance du biofilm et son architecture. De même, l'oxygène jouerait un rôle crucial (Wu *et al.*, 2013).

5.4 Influence hydrodynamique sur la capacité de colonisation de *S. oneidensis* MR1

Le rôle clé des conditions hydrodynamiques dans la formation des biofilms bactériens est bien documenté dans la littérature (Mathieu *et al*., 2014 ; Persat *et al*., 2015 ; Santore, 2022 ; Thomen *et al.*, 2017 ; Wang *et al*., 2022b), tout comme les caractéristiques de notre souche d'étude (Beblawy *et al.*, 2018 ; Fredrickson *et al*., 2008 ; Heidelberg *et al*., 2002 ; Lemaire *et al.*, 2020). En revanche, à notre connaissance, peu de travaux (6 en 20 ans) se sont intéressés à l'influence de l'hydrodynamique sur l'adhésion initiale, la croissance et la formation d'un biofilm mono-espèce mature de *S. oneidensis*. Les études recensées, dont les observations principales sont résumées Tableau 6, se sont majoritairement focalisées sur l'effet de l'hydrodynamique sur le détachement de biofilms matures, même si certaines se sont attachées à des étapes plus précoces de formation. Ces travaux montrent un comportement des biofilms de *S. oneidensis* sous flux très comparable à ce qui est connu pour les biofilms d'autres modèles bactériens.

Tableau 6. Influence de l'hydrodynamique sur la colonisation, la formation et la stabilité des biofilms de *S. oneidensis* MR-1 en régime laminaire. Les conditions hydrodynamiques sont reportées telles que décrites dans les articles.

Système d'étude	Conditions hydrodynamiques	Paramètre évalué	Observations principales	Références
Flow cells (verre) Biofilms de 12-48 h	Q = 66 µL/min Arrêt flux : 15-60 min	Biomasse détachée après arrêt flux	→ L'arrêt du flux entraîne un détachement rapide : jusqu'à 80% de la biomasse pour un biofilm de 12h après 15 min d'arrêt. → Le déclencheur principal est la chute [O_2] (absence de renouvellement)	Thormann *et al.* (2005)
Micro-canal PDMS avec chicanes (l = 450 µm, h = 125 µm) Biofilms de 4-20 h	$Q \in [0{,}8 : 8]$ µL/h $Re \in [4*10^{-4} ; 4*10^{-3}]$	Distribution spatiale des bactéries, surface recouverte, production EPS	→ L'augmentation du flux entraîne une colonisation plus hétérogène (clusters + zones moins colonisées). → La production d'EPS augmente avec le cisaillement → Surface colonisée × 4 lorsque le débit est multiplié par 10.	Kumar *et al.* (2012, 2013)
Colonne de sable/quartz Bactéries de la phase liquide	V = 0,41 cm/min Arrêt flux : 1-12 h	Biomasse en amont / aval de la colonne	→ L'arrêt du flux entraîne un relargage partiel des bactéries retenues → Plus le temps d'arrêt est long, plus le relargage est important → 2 mécanismes : 1) relargage diffusif des bactéries adhérées ou 2) détachement hydrodynamique lors de la reprise du flux (bactéries faiblement adhérées)	Ning *et al.* (2019)
Flow cells (verre) (40 × 4 × 1 mm) Biofilms de 9-14 jours	$Q \in [0{,}1 : 0{,}8]$ mL/min $Re \in [6{,}7 ; 54]$	Épaisseur, rugosité, détachement du biofilm	→ Le détachement du biofilm est contrôlé par l'hydrodynamique et sa morphologie (zones épaisses et rugueuses = détachement accru). → Présence d'une couche basale résistante, difficile à détacher malgré le cisaillement	Wang *et al.* (2022b)
Flow cells (verre) Biofilms de 5-10 jours	$\dot{\gamma} \in [1 : 5] \times 10^{-3}$ s^{-1} $Re \in [0{,}1 ; 0{,}4]$	Épaisseur, surface recouverte, détachement, bioréduction du Fe^{3+}	→ L'hydrodynamique module la structure et la stabilité du biofilm → L'augmentation du cisaillement entraîne un détachement accru et une réduction de la biomasse adhérée → Cela entraîne une diminution de l'efficacité de bioréduction du Fe^{3+} (moins de biomasse fixée)	Wang *et al.* (2025)

$\boldsymbol{Q}$ = débit ; $\boldsymbol{Re}$ = nombre de Reynolds ; $\boldsymbol{V}$ = vitesse d'écoulement ; $\boldsymbol{h}$ = hauteur ; $\boldsymbol{l}$ = largeur ; $\boldsymbol{\dot{\gamma}}$ = taux de cisaillement

Bilan de l'état de l'art

L'état de l'art a mis en évidence certains manques, listés ci-dessous, auxquels notre étude a tenté d'apporter de nouveaux éléments de réponse :

Hydrodynamique et dynamique de nage de *Shewanella oneidensis*

Bien que *S. oneidensis* soit très étudiée par la communauté scientifique pour sa capacité à former des biofilms par exemple, l'influence de l'hydrodynamique sur ce processus reste relativement peu explorée. De même sa dynamique de nage est peu documentée, ce qui en fait un modèle d'étude d'intérêt. Par ailleurs, nous notons que la majorité des modèles théoriques et numériques décrivant le transport bactérien reposent sur les propriétés de nage de *E. coli*, bactérie péritriche dont la motilité diffère de celle de *S. oneidensis*. Essayer de confronter ces modèles à des observations expérimentales réalisées sur des espèces bactériennes douées d'autres processus de nage peut permettre de les affiner et d'élargir leur portée.

Adhésion bactérienne : du global à l'individuel

L'adhésion bactérienne aux surfaces est un phénomène bien documenté dans la littérature, notamment en ce qui concerne les propriétés physico-chimiques de la surface à coloniser et des bactéries impliquées. En revanche, la dimension dynamique de l'adhésion l'est moins. De plus, la plupart des études se placent à l'échelle populationnelle, en considérant l'adhésion comme une résultante globale. Or il est probable que l'hétérogénéité des comportements bactériens influence ces processus.

Limites des méthodologies de suivi 3D

Les méthodologies de *tracking* tridimensionnel des trajectoires bactériennes dans un volume restent peu répandues. De ce fait, et bien que de nombreux modèles existent pour caractériser le transport des bactéries dans des milieux confinés, ces derniers souffrent d'un manque de confrontation à des données expérimentales. La microscopie holographique est une alternative prometteuse mais souffre encore d'un manque de popularisation en raison des ressources informatiques importantes qu'elles nécessitent.

Réponse cellulaire individuelle au stress hydrodynamique

Enfin, si l'influence de l'hydrodynamique sur un biofilm mature et ses processus de détachement est bien étudiée par la communauté scientifique, la réponse cellulaire des bactéries exposées à ce stress mécanique reste peu examinée. Quelques études transcriptomiques suggèrent pourtant que les bactéries sont capables de percevoir le stress hydrodynamique et de déclencher une réponse cellulaire.

CHAPITRE 2 :

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Préambule

Ce chapitre présente la méthodologie adoptée dans le cadre de ce travail de thèse. Afin de caractériser l'influence de l'hydrodynamique sur le transport et l'adhésion des bactéries aux parois, des expériences ont été réalisées sous différents écoulements au sein de dispositifs microfluidiques en utilisant une souche pure ; ces éléments sont détaillés ci-dessous. Ces expériences ont permis de caractériser et de quantifier ces étapes clés par observation in situ sous microscope, ainsi qu'à l'aide d'approches innovantes de tracking 2D et 3D qui seront, entre autres, présentées ci-après. Les techniques de mesure, communes à l'ensemble des expérimentations, utilisées pour la caractérisation de la biomasse planctonique dans le système sont également développées, tout comme les méthodes de caractérisation de la motilité bactérienne en soft agar ou l'analyse de l'expression des gènes bactériens. Les démarches expérimentales spécifiques à une expérimentation sont en revanche décrites dans le chapitre correspondant, en amont de la présentation des résultats.

1 Souches de *Shewanella oneidensis* et conditions de culture

1.1 Souches utilisées

Les souches de *Shewanella oneidensis* utilisées dans le cadre de cette étude, ainsi que leurs caractéristiques, sont présentées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Souches de *Shewanella oneidensis* utilisées au cours de cette étude

Nom	Caractéristiques	Références
MR-1	Souche sauvage de *S. oneidensis* MR-1	Teal *et al.* (2006)
MR-1 gfp^+	Souche isogénique de la souche MR-1 avec expression constitutive chromosomique de la GFP suite à l'intégration d'un transposon (mini-Tn7), contenant le gène codant pour la GFP (transposition site-spécifique au niveau du locus attTN7 du génome de MR-1)	Teal *et al.* (2006)
MR-1-R Δfla	Souche isogénique d'une souche WT de *S. oneidensis (*Bordi *et al.*, 2003) avec délétion (mutagenèse par recombinaison homologue) de 3 gènes codant des gènes de la flagelline (SO_3236 à 3238). Absence de synthèse du flagelle.	Armitano *et al.* (2013)

1.2 Conservation et repiquage des souches en milieu solide

Ces souches ont été conservées à -80°C dans un tampon de stockage, préalablement stérilisé par filtration (0,2 µm). Ce dernier est composé de 50 % de glycérol et de 50 % de tampon bactérien, contenant : KH_2PO_4 (3g/L), Na_2HPO_4 (7g/L), NaCl (4 g/L) et $MgSO_4$ (0,2 g/L). Le repiquage de ces souches a été réalisé sur milieu gélosé LB (Lennox Lysogeny Broth, Sigma-Aldrich, réf. L3022) préalablement stérilisé à 121°C pendant 15 minutes.

Ce milieu nutritif riche contient de l'extrait de levure (5 g/L), de la tryptone (10 g/L), du NaCl (5 g/L) et est supplémenté par 15 g/L agar (Millipore, réf. 05040). Les boîtes nouvellement ensemencées à partir du stock à -80°C, ont été incubées pendant 24 h à 30°C, puis conservées à température ambiante (21°C ± 2°C) pendant une durée maximale de 5 jours.

1.3 Milieux de culture testés

Outre le milieu LB et sa version diluée au 1/10e ($LB_{1/10}$), dont la composition a été présentée ci-dessus, des cinétiques de croissance ont été réalisées sur les 3 milieux suivants :

- Milieu commercial TSB (Tryptic Soy Broth, Sigma-Aldrich, réf. 22092) : milieu nutritif riche composé de peptone (17 g/L), soytone (3 g/L), dextrose (2,5 g/L), NaCl (5 g/L) et K_2HPO_4 (2,5 g/L).
- Milieu à base de lactate, couramment utilisé pour la culture de *S. oneidensis* en laboratoire (Binnenkade *et al.*, 2018 ; Paulick *et al.*, 2009 ; Teal *et al.*, 2006). Il contient de l'extrait de levure (0,2 g/L), du peptone (0,1 g/L), du tampon HEPES (2,5 g/L), du fumarate (3,2 g/L) ainsi que du lactate (5 mM).
- Milieu minimal de Fouad, composé d'extrait de levure (0,0035 g/L), NaCl (5 g/L), K_2HPO_4 (5 g/L), KH_2PO_4 (5 g/L), du $(NH_4)_3PO_4$ (2 g/L), du $MgSO_4$, $7H_2O$ (0,2 g/L), $MnSO_4$, 4 H_2O (0,02 g/L) et $FeCl_3$ (0,005 g/L).

1.4 Réalisation des pré-cultures

L'ensemble des pré-cultures bactériennes a été réalisé dans du bouillon nutritif LB Lennox pur ou dilué au 1/10e ($LB_{1/10}$), quel que soit le milieu de croissance testé pour la cinétique de croissance. Une stérilisation par autoclave (15 min, 120°C) a été effectuée avant utilisation. Les pré-cultures de nuit (O/N, *overnight*) ont systématiquement été réalisées comme suit : 2 colonies isolées des boites de repiquage précédentes ont été prélevées à l'öse puis ensemencées dans 50 mL de milieu $LB_{1/10}$ contenus dans un erlenmeyer de 250 mL. Les cultures liquides des souches ont été réalisées dans un bain-marie (INOVA 3100, New Brunswick) en conditions aérobiques, avec une agitation orbitale (160 rpm) et à 30°C.

1.5 Cinétique de croissance bactérienne

Les paramètres cinétiques de croissance des souches sur les différents milieux présentés ci-dessus ont été déterminés de la manière suivante. À partir d'une pré-culture O/N, 5 mL ont été inoculés dans 45 mL du milieu considéré, dans un erlenmeyer stérile de 250 mL placé dans un bain-marie à 30°C sous agitation orbitale à 160 rpm. L'évolution de la biomasse a été suivie par mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) au spectrophotomètre (Fischer Scientific ; Colorimeter model 45) à intervalles de temps réguliers pendant 10 heures. Ce suivi a permis d'obtenir les courbes de croissance primaires (DO_{600nm} = f(temps)) et secondaires (ln(DO_{600nm}) = f(temps)). Le taux de croissance spécifique maximal (μ) a été estimé à partir de la pente de la droite ajustée à la phase exponentielle de la courbe secondaire. Le temps de doublement (Td) a été calculé selon la formule suivante : $Td = \ln(2)\ /\mu$.

2 Caractérisation de la biomasse planctonique au sein du système

2.1 Détermination de la biomasse totale et des bactéries à membranes endommagées par cytométrie en flux

Afin de déterminer la biomasse totale et la fraction de bactéries à membrane altérée des inocula de *S. oneidensis*, des prélèvements réguliers (1 mL) ont été effectués au cours des expériences. Cette détection s'est faite par cytométrie en flux (CMF) après marquage à l'aide de fluorochromes. La cytométrie est une technique d'analyse cellulaire à haut débit, qui repose sur la mesure et l'analyse des propriétés optiques des bactéries soumises à une excitation lumineuse. Ces propriétés concernent la diffusion de la lumière par les cellules ; aux grands angles (90°) ou aux petits angles (45°), ce qui renseigne respectivement sur la structure interne, la granularité des cellules (paramètre Side Scatter SSC) ou sur leur taille (paramètre Forward Scatter FSC)). De plus, la fluorescence émise par les bactéries, qu'elle soit naturelle (possession de gènes codant pour des protéines fluorescentes) ou induite (marquage à l'aide de fluorochromes), est détectée grâce à des miroirs dichroïques et à des filtres qui sélectionnent et dirigent certaines longueurs d'ondes vers des photomultiplicateurs, qui transforment l'intensité lumineuse en signal électrique.

Dans le cadre de ce travail de thèse, les analyses ont été réalisées avec le cytomètre en flux BD Accury^{TM} C6 Plus (BD Biosciences, USA) équipé d'un laser bleu (488 nm) et rouge (640 nm), de deux détecteurs de diffusion de la lumière et de quatre détecteurs de fluorescence (FL1 (533 nm ± 30) ; FL2 (585 nm ± 20) ; FL3 (670 LP nm) et FL4 (675 nm ± 25)). De manière succincte, son principe de fonctionnement est le suivant : l'échantillon à analyser est injecté à l'aide d'une pompe calibrée dans un capillaire en quartz (ID = 200 µm) où il converge en un flux laminaire étroit qui traverse le faisceau laser (idéalement cellule par cellule). L'ensemble des particules de l'échantillon est ainsi exposé au laser choisi et la lumière qu'elles émettent et diffusent est enregistrée en temps réel sur le logiciel d'exploitation du cytomètre BD Accuri^{TM} C6Plus. Cela permet d'accéder aux paramètres FSC, SSC, à la fluorescence émise de chaque particule ; ainsi qu'à la quantification de la concentration cellulaire de l'échantillon final. Les données acquises sont représentées sous forme de nuages de points ou de cytogrammes, comme présenté par exemple Figure 37 et sont traitées à l'aide du logiciel BD Accuri^{TM} C6Plus.

Un paramétrage préliminaire de l'appareil a été réalisé avant utilisation afin de déterminer des seuils sur les paramètres de FSC et de fluorescence. Le but étant de s'affranchir du bruit de fond électronique de l'appareil, d'éventuels débris ou composants cellulaires afin de distinguer avec certitude les bactéries. Les résultats de ce paramétrage, non présentés dans ce manuscrit, ont permis la détermination d'un seuil commun sur la FSC à 2500 u.a. Concernant la fluorescence, les seuils ont été déterminés spécifiquement en fonction des marqueurs considérés. La biomasse bactérienne totale a été évaluée par marquage au SYBR Green I (S7563, Invitrogen) ($\lambda_{émission}$ = 520 nm ; $\lambda_{excitation}$ = 497 nm, concentration finale 1X) avec un temps de marquage de 15 minutes à l'obscurité. Les bactéries avec une perte de perméabilité membranaire

(assimilée à une perte de viabilité), ont été marquées avec de l'iodure de propidium (PI, B34954, Invitrogen) ($\lambda_{émission}$ = 530 nm ; $\lambda_{excitation}$ = 620 nm). Le PI, à la différence du SYBR Green I est un fluorochrome lipophobe pouvant pénétrer uniquement dans les cellules perméables (« altérées ») pour se fixer à l'ADN. Le marquage PI a été effectué à une concentration finale de 20 µM et un temps de marquage de 15 minutes à l'obscurité, selon les instructions du fournisseur.

Les analyses par cytométrie ont toutes été réalisées sur 2 minutes à un débit de 35 µL/min. Les échantillons étant préalablement dilués avec de l'eau distillée stérile apyrogène (Otec, réf. 069802A) avant marquage (concentration cellulaire proche de 10^6 cellules/mL). Les bactéries qui émettent une fluorescence verte à la suite du marquage SYBR Green I ont été détectées sur le détecteur FL1 (533 ± 30) avec un seuil sur la fluorescence de 1000 u.a (Figure 37b) ; alors que les bactéries émettant une fluorescence rouge (PI+) ont été détectées sur le détecteur FL2 (585 nm ± 20) avec un seuil de fluorescence de 950 u.a. Dans le cas particulier de la souche MR-1-gfp$^+$, les bactéries émettent en continu une fluorescence verte suite à la synthèse de la gfp ($\lambda_{émission}$ = 510 nm ; $\lambda_{excitation}$ = 488 nm). Leur détection a donc été possible sans marquage sur le détecteur FL1 (seuil de 700 u.a) ; et après une étude préliminaire visant à évaluer la stabilité temporelle de cette fluorescence sur la durée totale d'expérience (Chapitre 3 paragraphe 1.3).

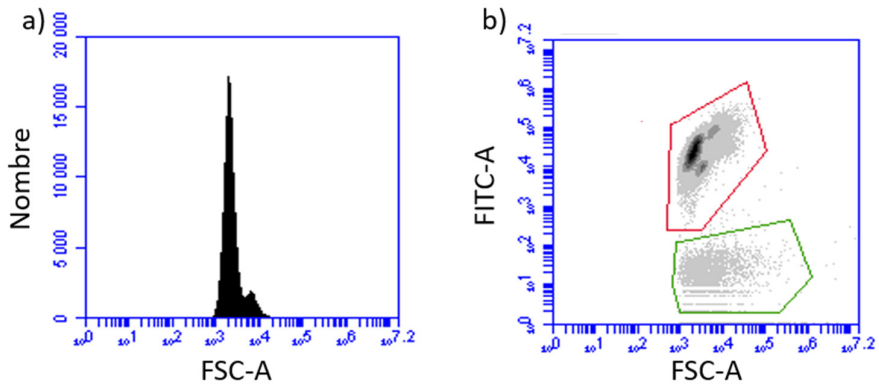


Figure 37. Exemples de cytogrammes obtenus sur un échantillon de *S. oneidensis* MR-1. a) Histogramme monoparamétrique : nombre de cellules détectées en fonction du paramètre FSC (taille). b) Histogramme biparamétrique : fluorescence (détectée sur le détecteur FL1) des bactéries marquées au SYBR en fonction de leur taille. Un seuil a été fixé à 1000 u.a. pour séparer les bactéries (cadre en rouge : 97,7 %) du bruit de fond de l'appareil (en vert).

2.2 Détermination de la biomasse cultivable

Le nombre de bactéries cultivables présentes dans les suspensions bactériennes, ainsi que son évolution au cours du temps expérimental, ont été suivis par comptage de nombre de colonies développées sur géloses agar $LB_{1/10}$, après dépôt par spot de 10 µL d'échantillon à différentes concentrations cellulaires (dilution en cascade). Les résultats ont été exprimés en unités formant colonies (UFC) par mL après incubation à 30°C pendant 48h. Le calcul des concentrations est effectué en multipliant le nombre de colonies dénombrées par le facteur de dilution appliqué afin d'obtenir la concentration en UFC/mL.

3 Caractérisation de la motilité de la souche en milieu soft agar

Comme décrit dans la littérature, dans le cas de *S. oneidensis* (Yang et Chen, 2020 ; Armitano *et al.*, 2013 ; Paulick *et al*., 2009 ; Koerdt *et al*., 2009) ou d'autres bactéries flagellées (Pfeifer *et al*., 2022 ; Guttenplan *et al.,* 2013), les tests de motilité ont été réalisés comme présenté dans la Figure 38. À partir d'une pré-culture de nuit de la souche à étudier, les cellules ont été récupérées par centrifugation (3500 × g) pendant 4 minutes, puis le culot bactérien a été remis en suspension dans du milieu $LB_{1/10}$ stérile en étant dilué au besoin de manière à obtenir une DO_{600nm} voisine de 0,2, soit une concentration proche de 10^8 cellules/mL. Deux µL de cette suspension bactérienne ont ensuite été ensemencés par piqûre en profondeur (à mi-hauteur) dans un milieu de culture soft agar. Différents milieux ont été testés, avec des concentrations en agar variant de 2 à 5 %. Les boîtes ont ensuite été incubées à température ambiante ou à 30°C pendant plusieurs jours. La migration bactérienne a été suivie soit par prise d'images manuelle à l'aide d'un téléphone à une fréquence de 3 images par jour, soit par acquisition automatisée en time-lapse à l'aide d'une caméra, avec une fréquence d'acquisition de 1 image toutes les 20 minutes. Chaque condition expérimentale a été répétée au minimum trois fois.

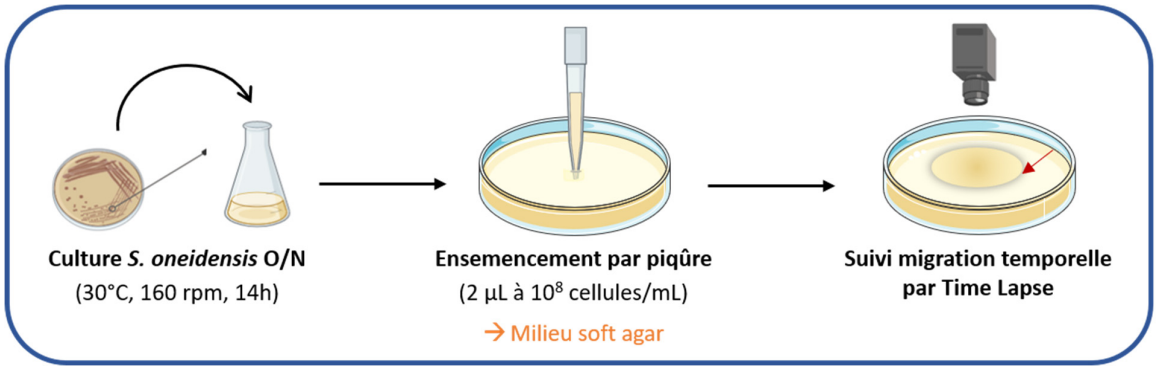


Figure 38. Principe du test de motilité réalisé

4 Dispositif expérimental pour l'étude du transfert et de l'adhésion des bactéries à la paroi

4.1 Description du système microfluidique utilisé : un capillaire en verre

Le dispositif microfluidique utilisé pour nos essais de caractérisation de l'adhésion et du transfert bactérien (chapitres 3 et 4) est un capillaire rectangulaire en verre (VitroCom, USA), de hauteur h, de largeur w et de longueur L, avec un fort rapport d'aspect $w/h = 10$. Trois gammes de hauteurs h différentes ont été utilisées au cours de nos travaux, respectivement de 50, 100 et 200 µm, mais en conservant le même rapport d'aspect et une longueur L de 10 cm.

Ce capillaire en verre (Figure 39a) est inséré à ses extrémités dans deux connecteurs en acide polylactique (PLA). L'ensemble est fixé à l'aide d'une colle acrylique photopolymérisable (Loctite 3921, polymérisation UV) sur une plaque support pour microscopie, évidée en son centre afin de permettre l'imagerie in situ par

microscopie. La plaque, ainsi que les connecteurs, ont été confectionnés sur mesure par le LEMTA. À partir de ces connecteurs, un circuit est monté, composé de tuyaux Tygon en élastomère thermoplastique (Ø interne 0,79 mm, réf. 228-1278) et d'un dispositif de pompage : soit une pompe péristaltique (MINIPULS 3 Gilson) préalablement calibrée, soit un pousse-seringue (NEMESYS Low pressure module, CETONI Base 120), selon les essais et les débits souhaités. L'entrée et la sortie du circuit sont reliées à un ou deux flacons stériles, en fonction du mode d'alimentation choisi : en boucle ouverte ou en boucle fermée (Figure 39b).

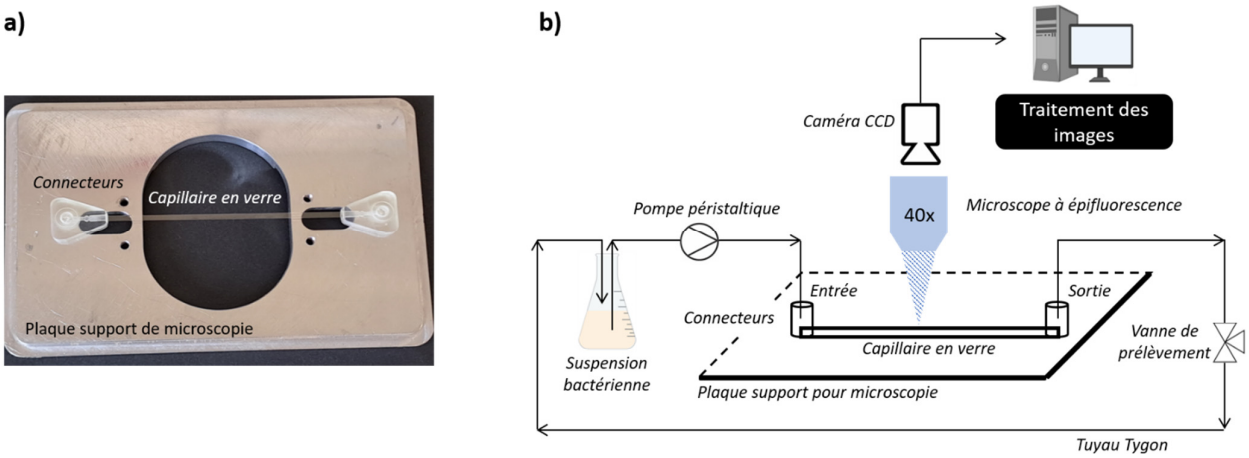


Figure 39. a) Photographie d'un capillaire en verre (L = 100 mm, w = 2 mm, h = 0,2 mm), inséré dans deux connecteurs fabriqués sur mesure et fixé à une plaque support de microscopie évidée en son centre. b) Exemple d'intégration du capillaire dans le système expérimental : la plaque support est montée sous un microscope à épifluorescence, utilisé pour l'acquisition d'images fluorescentes dans le cadre de l'étude présentée au chapitre 3.

4.2 Procédure de nettoyage du dispositif expérimental et sa validation

Pour chaque essai réalisé, un nouveau dispositif microfluidique (capillaire, tuyaux et connectiques) est utilisé, assemblé et nettoyé selon la procédure suivante. À un débit de 1 mL/min, le système est dans un premier temps nettoyé à l'aide d'une solution de SDS à 0,1 % pendant 30 minutes, puis rincé à l'eau distillée stérile apyrogène (Otec, réf. 069802A) pendant un temps équivalent. Une seconde étape de nettoyage est ensuite réalisée en injectant une solution d'acide chlorhydrique à 0,1 M, toujours à débit et durée identiques. Le système est finalement rincé pendant 30 minutes à l'eau distillée stérile apyrogène, avant d'être drainé et soumis à un traitement UV (254 nm) de 30 minutes sous un poste de sécurité microbiologique. À la suite de cette étape, les deux extrémités ouvertes du dispositif expérimental sont enveloppées dans une feuille de papier d'aluminium préalablement traitée aux UV jusqu'à son utilisation.

Afin de s'assurer de la propreté et de l'absence de contamination bactérienne à la surface interne du capillaire, une observation systématique de ses parois supérieure et inférieure est effectuée avant chaque expérience par microscopie à contraste de phase, objectif 40X (Zeiss Axioskop). Par ailleurs, des essais préliminaires ont été conduits au sein de ces dispositifs expérimentaux avant leur utilisation afin de valider l'efficacité du processus de nettoyage. De manière brève, une alimentation en milieu nutritif ($LB_{1/10}$) a été

réalisée au sein de ces dispositifs après nettoyage pendant 2 heures, après lesquelles des échantillons ont été prélevés en sortie du système. Les analyses réalisées sur ces échantillons, quantification de la cultivabilité et de la biomasse totale (paragraphe 2.1), étaient systématiquement inférieures aux limites de détection des méthodes utilisées (< 0,01 UFC/mL et < 100 cellules totales/mL), démontrant ainsi l'efficacité du nettoyage et sa validation.

4.3 Paramètres hydrodynamiques imposés

Afin d'étudier l'influence des conditions hydrodynamiques sur le transport et l'adhésion pionnière bactérienne, une gamme de débits (Q) allant de 0,1 à 1000 µL/min a été appliquée au sein des dispositifs microfluidiques (Tableau 8). Dans ces conditions, le nombre de Reynolds (*Re*) reste toujours inférieur à 15, garantissant un régime d'écoulement laminaire au sein du système. Ce nombre a été calculé selon la formule suivante : $Re = \rho \bar{V} D_h / \eta$. Avec ρ la densité du fluide (ρ = 1000 kg/m^3) et η sa viscosité dynamique (η = 10^{-3} Pa.s). $\bar{V}$ correspond à la vitesse moyenne du fluide et D_h au diamètre hydraulique du système ($D_h = 4wh/2(w+h)$).

Comme démontré au Chapitre 1 (paragraphe 1.3), en raison du fort rapport d'aspect des capillaires utilisés et de l'écoulement laminaire imposé, le profil de vitesse du fluide est parabolique (profil de Poiseuille). Le taux de cisaillement généré aux parois est exprimé par la formule suivante (Bruus, 2007) : $\dot{\gamma}_w = 6Q/wh^2$. Dans les conditions expérimentales testées, les taux de cisaillement vont de 1 à 1250 s^{-1}, ce qui correspond à des contraintes pariétales de cisaillement (σ_w) comprises entre 1×10^{-3} et 1,25 Pa. Ces valeurs se situent dans la plage typique des contraintes subies par les bactéries dans de nombreuses configurations d'écoulement (réelles ou à l'échelle du laboratoire) lors de la formation de biofilms (Mathieu *et al.*, 2014 ; Saur *et al.*, 2017 ; Chen *et al.*, 2019 ; Chang *et al.*, 2020 ; Fernandes *et al*., 2021 ; Simoes *et al*., 2022). Le Tableau 8 donne un aperçu des différentes conditions hydrodynamiques testées.

Tableau 8. Gamme [min, max] des débits (Q) appliqués au sein des capillaires (de dimension h, w, L, respectivement hauteur, largeur et longueur) et ses paramètres hydrodynamiques associés : taux de cisaillement à la paroi ($\dot{\gamma}_w$), contrainte de cisaillement à la paroi (σ_w), nombre de Reynolds (Re) et vitesse moyenne ($\bar{V}$).

	Capillaire 50 µm	**Capillaire 100 µm**	**Capillaire 200 µm**
Dimensions (mm)	h = 0,05 ; w = 0,5 ; L = 100	h = 0,1 ; w = 1 ; L = 100	h = 0,2 ; w = 2 ; L = 100
$\boldsymbol{Q}$ (µL/min)	[0 ; 0,3]	[0 ; 2]	[0 ; 1000]
$\boldsymbol{\dot{\gamma}_w}$ (s^{-1})	[0 ; 20]	[0 ; 20]	[0 ; 1250]
$\boldsymbol{\sigma_w}$ (Pa)	[0 ; 0,02]	[0 ; 0,02]	[0 ; 1,25]
$\boldsymbol{Re}$	[0 ; 0,02]	[0 ; 0,06]	[0 ; 15]
$\boldsymbol{\bar{V}}$ (µm.s^{-1})	[0 ; ~170]	[0 ; ~330]	[0 ; ~40 000]

5 Méthodologies mises en place lors du suivi de l'adhésion bactérienne pionnière par imagerie time-lapse

5.1 Définitions de « bactéries adhérées » et de « paroi »

Dans notre configuration expérimentale, la paroi correspond à la surface interne du capillaire, sur laquelle nous faisons la mise au point du microscope (plan focal). Une bactérie est considérée comme à la paroi ou adhérée si elle reste immobile dans le plan focal, qu'elle soit fixée partiellement ou totalement par un pôle. Bien que nous utilisions le terme « adhérée » pour caractériser ces bactéries, il est entendu que cette immobilisation reflète des interactions physico-chimiques avec la surface, et non d'une adhésion irréversible (en tout cas dans les premiers instants d'expérience).

5.2 Acquisition des images en microscopie à épifluorescence

Afin de caractériser l'adhésion pionnière de *S. oneidensis* taguée avec la gfp (gfp$^+$), le dispositif microfluidique a été monté sur la platine d'un microscope à épifluorescence (Zeiss Axioskop, Allemagne) dans une salle thermostatée à 22 ± 1°C. Le microscope est équipé d'un objectif (40x/0,6), d'un filtre d'excitation (450 - 490 nm) adéquat pour la fluorescence de la gfp et d'une caméra (P830C 8,3 MPixels). Cette dernière enregistre des images de 550 × 310 µm² à une fréquence d'acquisition de 0,5 Hz et un temps d'exposition de 800 ms. Les images ont été prises au niveau de la paroi inférieure ou supérieure du capillaire (en fonction de la question scientifique) et centrées suivant la longueur et la largeur du capillaire (Figure 40a), de manière à éviter les effets de bords latéraux. Deux exemples d'images de bactéries à la paroi du capillaire en verre représentatives de nos expériences sont présentés Figure 40 (b,c).

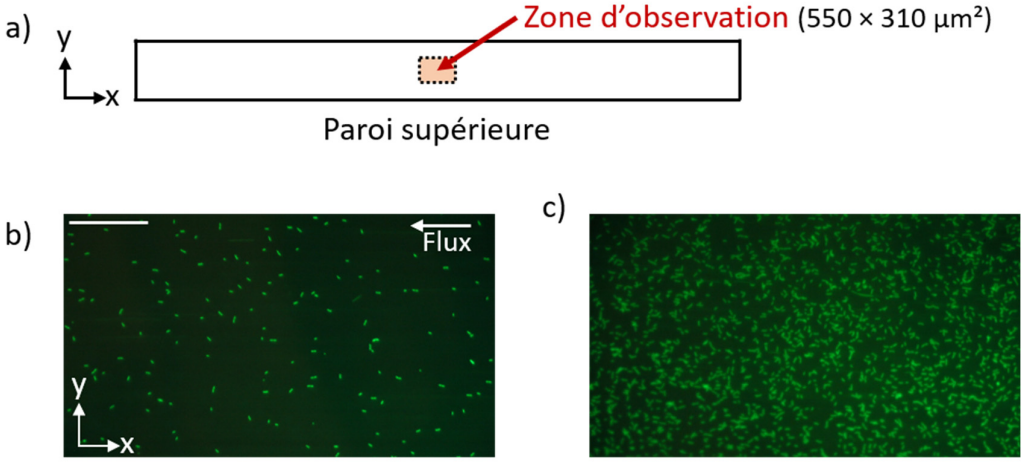


Figure 40. a) Localisation de la zone d'observation au sein du capillaire. Le focus du microscope à épifluorescence est ajusté sur la paroi supérieure. (b-c) Exemples d'images de cellules de *S. oneidensis* gfp$^+$ acquises à (b) 10 min et (c) 2 h, obtenues dans cette configuration. L'écoulement imposé correspond à un cisaillement à la paroi de 125 s^{-1}. Barre d'échelle : 100 µm.

Le suivi de l'adhésion à la paroi du capillaire a été réalisé pendant deux heures par approche time-lapse (0,5 Hz, soit 1 image toutes les 2 secondes). Néanmoins, afin de limiter le photoblanchiment de la gfp

produite par *S. oneidensis* lors d'une exposition prolongée à la lumière bleue, ce qui pourrait entraîner une sous-estimation du nombre de bactéries observées, la zone d'observation a été déplacée toutes les 14 minutes vers le champ d'observation suivant dans le sens de l'écoulement. Cela signifie que pendant les deux heures d'expérience, l'approche time-lapse consiste en des vidéos successives de 14 minutes chacune. Une caractérisation globale de la colonisation a néanmoins été réalisée en regroupant ces vidéos une à une afin d'accéder à un temps de colonisation plus important. Cette approximation est rendue possible par l'observation d'une colonisation bactérienne homogène sur toute la longueur du capillaire lors de tests préliminaires qui seront présentés au chapitre 3. Les images ainsi enregistrées ont ensuite été traitées selon des approches conventionnelles de comptage cellulaire ou par une approche automatisée de Deep Learning que nous avons implémentée au cours de ce travail. Les sections suivantes décrivent ces différentes approches.

5.3 Traitement des images par approche classique

5.3.1 Détermination de la biomasse à la paroi par comptage manuel

Les images capturées pendant 2 heures ont été traitées avec le logiciel ImageJ (ImageJ-win64) afin d'améliorer le contraste et la luminosité de la fluorescence de la protéine GFP produite par les bactéries. La biomasse observée à la paroi, ainsi que son évolution au cours du temps ont ensuite été quantifiées de manière manuelle par comptage du nombre de bactéries présentes sur un panel de 85 images représentatives, prises tout au long des 2 heures (85 images par essai). La concentration bactérienne à la paroi du capillaire a ensuite été déterminée en divisant le nombre de bactéries comptées par la surface de la zone d'observation ($1{,}77 \times 10^{-3}$ cm²). La limite de détection est de 1 bactérie par image, soit une concentration surfacique seuil proche de 6×10^{2} bactéries/cm².

5.3.2 Détermination de la surface recouverte par les bactéries par traitement Matlab

Pour quantifier la biomasse à la paroi et son évolution temporelle, une procédure automatisée de calcul du pourcentage de surface recouverte par les bactéries à la paroi sur les images de microscopie à épifluorescence a été développée (Figure 41). Dans un premier temps, elle permet de convertir l'image capturée, initialement en couleur RGB, en image en échelle de gris (256 niveaux). Ensuite, l'image est transformée en image en noir et blanc. On parle de binarisation car, à son terme, les pixels ne peuvent posséder que deux valeurs au lieu des 256 possibles initialement : 0 (noir) ou 1 (blanc). On obtient donc une matrice de l'image remplie de 0 ou de 1. Cette étape, réalisée afin d'augmenter le contraste, est permise par la détermination d'un seuil de binarisation compris entre 0 et 1, que l'on renseigne dans le code. Selon que le pixel possède une valeur supérieure ou inférieure à ce seuil, il devient blanc ou noir suite à cette étape. Afin de vérifier si la binarisation est correcte (bactéries en blanc et le reste en noir), l'image brute initiale est superposée à l'image binaire, qui le cas échéant est validée. En cas de réponse négative, un nouveau seuil de binarisation est défini pour être le plus fidèle possible à notre image.

Lorsque la binarisation est validée, le programme Matlab somme tous les pixels blancs, qu'il divise par la taille de l'image (totalité des pixels), permettant ainsi d'obtenir la fraction surfacique colonisée de l'image, que l'on exprime ensuite en pourcentage. Dans nos essais, le seuil généralement utilisé était de 0,1.

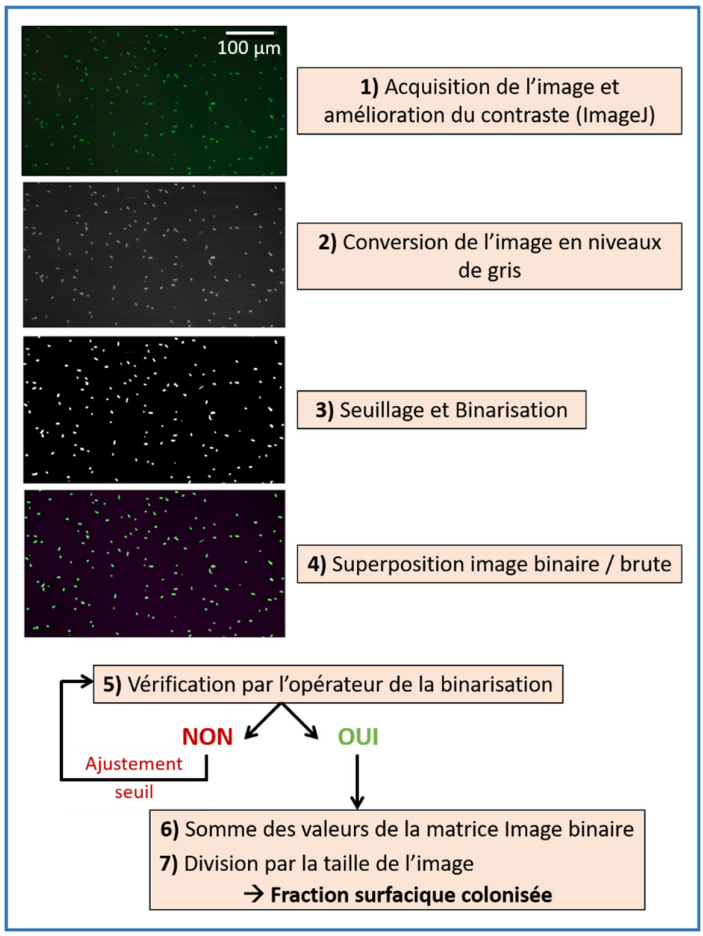


Figure 41. Principe de fonctionnement de la procédure automatisée sur Matlab pour déterminer le pourcentage de surface colonisée par les bactéries pionnières.

5.4 Traitement des images par Deep Learning

En collaboration avec Cédric Pradalier (GeorgiaTech Europe), Jérémy Fix (Centrale Supélec) et Simon Becker (Lemta), nous avons implémenté une méthode automatisée de traitement d'images basée sur le Deep Learning. L'un des objectifs était de pallier aux difficultés rencontrées lors du traitement classique des images avec ImageJ ou Matlab. En effet, la variabilité de l'intensité de la fluorescence émise par les bactéries, tant au cours du temps qu'entre différentes expériences, ainsi que les fluctuations de l'intensité lumineuse d'excitation rendaient l'automatisation difficile. De plus, nous souhaitions accéder à la nature dynamique et au comportement individuel de chaque bactérie observée dans les enregistrements vidéo.

L'implémentation de cette méthode repose sur une succession de traitements comprenant : l'étiquetage des objets « bactéries », l'entraînement du modèle choisi (YOLOv8) pour la détection de ces objets, la détection effective, le tracking spatio-temporel des objets détectés et enfin l'analyse des données générées. Cette séquence est présentée ci-dessous et illustrée dans la Figure 42.

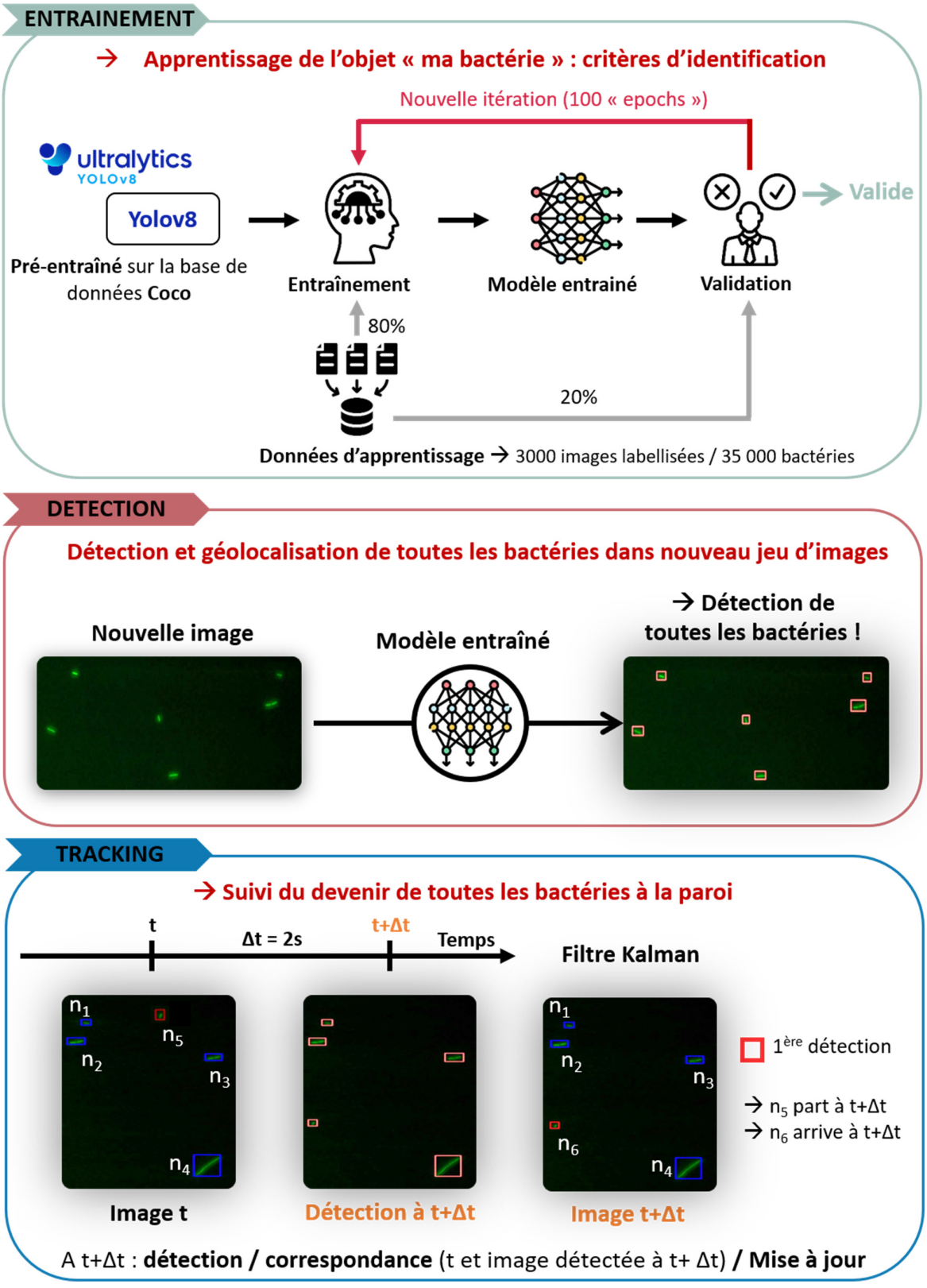


Figure 42. Schématisation des différentes étapes du traitement d'image mis en place : entraînement d'un système de neurones connectés à la détection de bactéries (*S. oneidensis* gfp+) à la paroi et tracking par application d'un filtre Kalman.

5.4.1 Présentation du modèle Yolov8

Nous avons utilisé le modèle de détection d'objets YOLOv8 (You Only Look Once version 8), et plus spécifiquement l'architecture allégée YoloV8n. Il s'agit d'une des versions les plus récentes (Janvier 2023) et performantes de la famille YOLO, connu pour sa rapidité et sa précision (Diwan *et al.*, 2023 ; Sohan *et al.*, 2024). C'est un modèle de vision par ordinateur qui repose sur une architecture de réseau de neurones convolutionnels (CNN), spécialement conçu pour la détection d'objets dans une image, ce qui signifie dans notre étude, prédire la localisation des différentes bactéries à la paroi à l'aide de boîtes rectangulaires englobantes *(bounding box*). Dans une toute première étape d'apprentissage, non spécifique de nos objets bactériens, le modèle YOLOv8 a été entrainé sur des objets génériques grâce à la base de données COCO (Lin *et al.*, 2015) ce qui a permis d'obtenir des poids initiaux pour les paramètres de l'algorithme.

5.4.2 Labellisation et entraînement du modèle YOLOv8 à la détection des bactéries

L'implémentation de ce système de neurones connectés a tout d'abord nécessité une étape d'entraînement du modèle. Le but étant de le spécialiser dans la reconnaissance et la prédiction fiable de la bactérie *S. oneidensis* sur les images enregistrées. Pour ce faire, nous avons tout d'abord étiqueté les bactéries présentes sur un jeu d'images issues de mes expériences. Cette étape d'étiquetage a été réalisée à l'aide du logiciel de labellisation Labelbox (disponible en ligne : https://labelbox.com). C'est une plateforme de gestion et d'annotation de données utilisée pour développer et entraîner des modèles d'apprentissage automatique. Les bactéries ont été encadrées (*bounding box*) de manière manuelle sur des images à pleine résolution (3 160 × 2 180 pixels). Pour garantir la représentativité de la classe « bactéries », les images ont été sélectionnées à différents temps de colonisation et pour différentes conditions hydrodynamiques. Un exemple d'image après étiquetage des bactéries sur Labelbox est présenté Figure 43. L'ensemble de données d'entraînement final comprend 300 images et plus de 30 000 bactéries étiquetées.

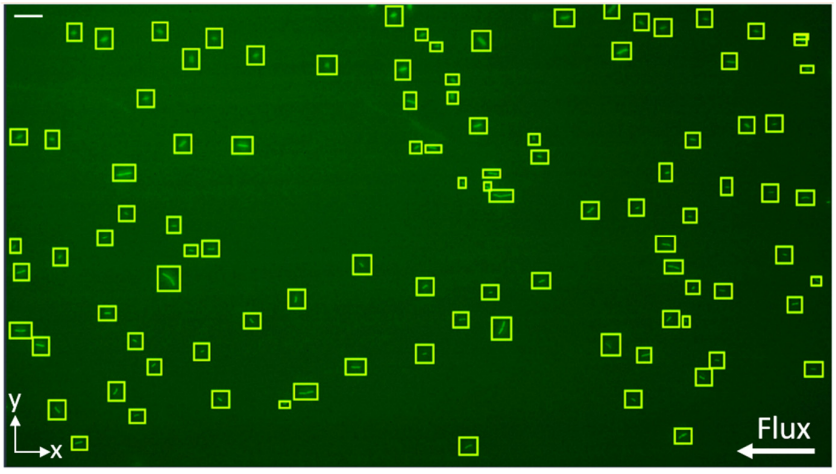


Figure 43. Exemple d'image présentant *S. oneidensis* à la paroi du capillaire après leur étiquetage sur Labelbox. La barre d'échelle représente 20 µm.

Puis, le modèle YOLOv8n préalablement pré-entrainé sur des objets génériques a été affiné sur nos propres données étiquetées pour le rendre spécifique à la détection de *S. oneidensis* gfp+. Pour cet entraînement, les données étiquetées ont été divisées en deux parties : un pli d'entraînement représentant 80 % des données et un pli de validation représentant 20 %. Le pli d'entraînement est utilisé pour l'apprentissage des paramètres du modèle, tandis que le pli de validation permet d'évaluer ses performances sur des données auxquelles l'algorithme n'a pas été confronté durant l'apprentissage.

Les images du pli d'entraînement ont été traitées en utilisant les paramètres par défaut définis par la bibliothèque Ultralytics pour YOLOv8. Après plusieurs essais, le choix a été de faire évoluer le modèle pendant 100 époques (itérations complètes sur l'ensemble des données). Les valeurs spécifiques des hyperparamètres ont été fixées à une confiance de 0,3 et une intersection d'union (IoU) de 0,7. La confiance définit le seuil de probabilité en dessous duquel une prédiction est ignorée. L'Intersection d'union mesure la superposition entre la boîte prédite et la boîte réelle, et permet de fusionner les boîtes qui se chevauchent, en conservant la plus pertinente. Le processus d'entraînement inclut également une stratégie d'arrêt précoce basée sur la perte de validation. Cette technique permet d'interrompre l'entraînement dès que les performances du modèle cessent de s'améliorer sur le pli de validation, garantissant ainsi de ne pas trop entraîner le modèle et d'éviter le sur-apprentissage (*overfitting*). Les images du pli de validation ont ensuite servi à évaluer les performances du modèle à l'aide de deux mesures de qualité : le rappel (R) et la précision (P). Le rappel mesure la capacité du modèle à détecter tous les objets pertinents, tandis que la précision évalue la proportion de prédictions correctes parmi toutes les détections effectuées. Ces deux paramètres ont atteint des valeurs de 0,78 pour le modèle final validé.

5.4.3 Détection des bactéries à la paroi

Une fois le modèle entraîné et validé, l'ensemble des images acquises a pu être analysé. Cette étape de détection (inférence) a été effectuée à l'aide de SAHI (*Slicing Aided Hyper Inference*) (Akyon *et al.*, 2022), un outil intégré à YOLOv8 conçu pour améliorer la détection des petits objets. À titre d'exemple, une image analysée par le modèle entraîné est illustrée dans la Figure 44.

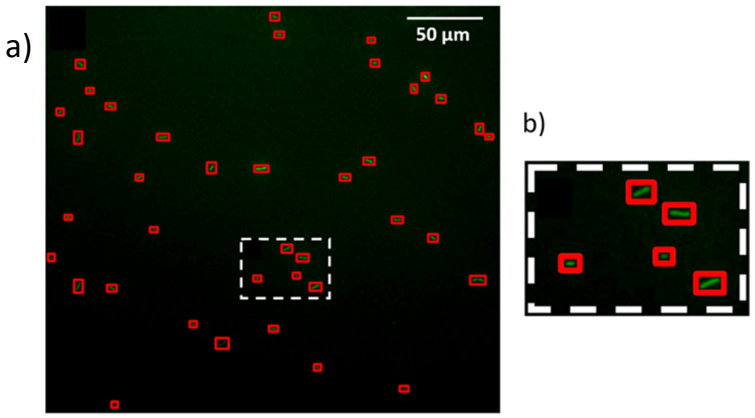


Figure 44. a) Exemple de résultat de détection obtenu après entraînement du modèle YOLOv8. Toutes les bactéries gfp+ de *S. oneidensis* présentes sur l'image ont été détectées et encadrées à l'aide d'une boîte englobante (*bounding box*). b) correspond à une section zoomée de l'image a.

5.4.4 Tracking des bactéries

La dynamique individuelle de chaque bactérie a été déterminée à l'aide d'un filtre de Kalman (Kim et Bang, 2019). L'objectif était d'identifier la même bactérie sur plusieurs images successives et de lui attribuer un label unique, permettant ainsi de suivre son évolution tout au long de la séquence d'images. Le filtre de Kalman repose sur un modèle d'état (transition + observation). Il fonctionne en deux étapes successives. La première de prédiction : le filtre estime la position future de la bactérie par projection de sa position précédente, en anticipant un éventuel mouvement, et en évaluant l'incertitude associée à cette prédiction. La seconde étape est une étape de mise à jour : lorsque la bactérie est détectée, le filtre confronte sa prédiction à cette nouvelle observation et ajuste sa position grâce au gain de Kalman, qui équilibre la confiance entre la prédiction et la mesure en fonction de leur précision et leur fiabilité respectives.

Cet algorithme a été appliqué à l'ensemble des séquences d'images à l'aide de Python, permettant ainsi un suivi précis et continu des bactéries tout au long des images. À l'issue de cette étape de *tracking*, un fichier Excel est généré pour chaque séquence d'images time-lapse enregistrée. Ce fichier contient, pour chaque bactérie détectée à la paroi, l'ensemble des moments *t* où elle a été identifiée, ainsi que les coordonnées de sa *bounding box*.

5.4.5 Calculs des paramètres orientation, temps de résidence et déplacement à la paroi

Suite à la détection des bactéries, une étape de post-traitement a été effectuée à l'aide de scripts d'analyse développés sous Python ou Matlab afin de déterminer, pour chaque bactérie :

1) **Son orientation à la paroi par rapport au sens de l'écoulement**. Une analyse de l'intensité des pixels au sein de chaque *bounding box* détectée est réalisée afin d'estimer la position la plus probable de la bactérie à l'intérieur de celle-ci. Chaque bactérie est assimilée à une ellipse caractérisée par un axe majeur (longueur) et un axe mineur (largeur). L'orientation est obtenue en mesurant l'angle entre l'axe majeur de cette ellipse et la direction de l'écoulement (axe x de l'écoulement).

2) **Son temps de résidence à la paroi.** Il correspond à la durée pendant laquelle la bactérie est restée à la paroi. Il est calculé en soustrayant le temps d'arrivée de la bactérie à la paroi de son départ. Les bactéries qui ne quittent pas la paroi durant la séquence (14 minutes) se voient attribuer un temps de résidence minimal en considérant le temps final de la vidéo comme leur temps de départ par défaut.

3) **Le déplacement total et la vitesse de déplacement à la paroi**. Pour chaque image, le centre de chaque bounding box est calculé pour obtenir les coordonnées (x, y) de la bactérie (x : direction de l'écoulement, y : perpendiculaire à l'écoulement). Les déplacements absolus successifs en x et y de la bactérie pendant son temps de résidence à la paroi sont cumulés pour obtenir son déplacement total à la paroi.
Les composantes de la vitesse instantanée de la bactérie suivant les axes x et y sont estimées par la méthode des différences finies centrées, selon les formules suivantes et avec Δt = 2s.

$$v_x(t) = \frac{x(t + \Delta t) - x(t - \Delta t)}{2\Delta t} \quad ; \quad v_y(t) = \frac{y(t + \Delta t) - y(t - \Delta t)}{2\Delta t} \tag{1}$$

La vitesse instantanée est ensuite définie comme la norme du vecteur vitesse :

$$v(t) = \sqrt{v_x^2(t) + v_y^2(t)} \tag{2}$$

6 Méthodologies mises en place pour l'étude du transport bactérien par microscopie holographique

Afin d'évaluer la dynamique de transport et de nage des bactéries dans notre système microfluidique, nous avons choisi la microscopie holographique. Pour rappel, cette technique permet d'accéder aux trajectoires en 3D avec une résolution spatiale et temporelle élevée, tout en suivant une suspension de bactéries, ce qui permet de collecter simultanément un nombre important de données.

Cette approche repose sur l'enregistrement d'interférences entre deux ondes optiques cohérentes : une onde de référence plane et une onde diffractée par des objets, dans notre cas les bactéries. L'enregistrement de l'intensité des interférences résultantes sur un support (une caméra numérique), donne une image que l'on appelle hologramme. Cet hologramme contient l'ensemble de l'information optique du volume observé, c'est-à-dire l'amplitude et la phase du champ lumineux. Il est ensuite traité numériquement pour reconstruire plusieurs plans focalisés au sein du volume d'étude, ce qui permet une imagerie 3D quantitative (Katz et Sheng, 2010 ; Kim et Lee, 2024 ; Kim, 2010). Le dispositif et les méthodes de traitement des hologrammes, réalisées au cours de l'étude sont détaillés dans les sections suivantes.

6.1 Dispositif expérimental et enregistrement des hologrammes

6.1.1 Dispositif expérimental et paramètres d'acquisition

Le dispositif microfluidique est disposé sur un microscope inversé (ZEISS Axio Observer) équipé d'un objectif (40X avec une ouverture numérique de 0,9) et d'une caméra (Dantex Dynamics, taille de pixel de 7 µm) contrôlée par le logiciel DynamicStudio (DANTEC) (Figure 45 a,b). Une diode laser fibrée monomode (λ = 660 nm, 50 mW, Thorlabs LP660-SF50) associée à un collimateur fibré (Thorlabs PAF2P-A10A) permet de générer une onde plane. Cette diode laser est positionnée au-dessus du microscope, pour éclairer la suspension bactérienne au sein du capillaire. Les hologrammes produits (Figure 45d) sont enregistrés par la caméra avec une résolution de 1024 × 1024 pixels ce qui correspond à un champ d'observation de dimension 180 × 180 µm². La fréquence d'acquisition de la caméra est ajustée en fonction des conditions hydrodynamiques imposées afin de limiter le déplacement maximal des bactéries à une fois leur taille, soit environ 2 µm. Ce critère est primordial pour que l'algorithme de tracking reconstruise des trajectoires exploitables (paragraphe 6.2.3 ci-dessous).

Pour la gamme de variation de nos conditions hydrodynamiques nous avons appliqué des fréquences allant de 50 à 600 Hz. Chaque enregistrement est composé d'une série de 3000 hologrammes ce qui nous assure un enregistrement de plusieurs centaines à quelques milliers de bactéries par expérience. Toutes les conditions sont à minima reproduites 3 fois afin d'assurer une bonne reproductibilité.

6.1.2 Principe de formation d'un hologramme dans une configuration en ligne de Gabor

Comme illustré à la Figure 45c, nous avons opté pour une configuration en ligne de Gabor (Picart *et al*., 2015). Cette configuration, opposée à l'holographie hors axe qui nécessite une séparation du faisceau laser en deux bras, est plus simple à mettre en œuvre et à l'avantage de ne pas être sensible aux vibrations (Wang *et al*., 2022a ; Kumar et Hong, 2025).

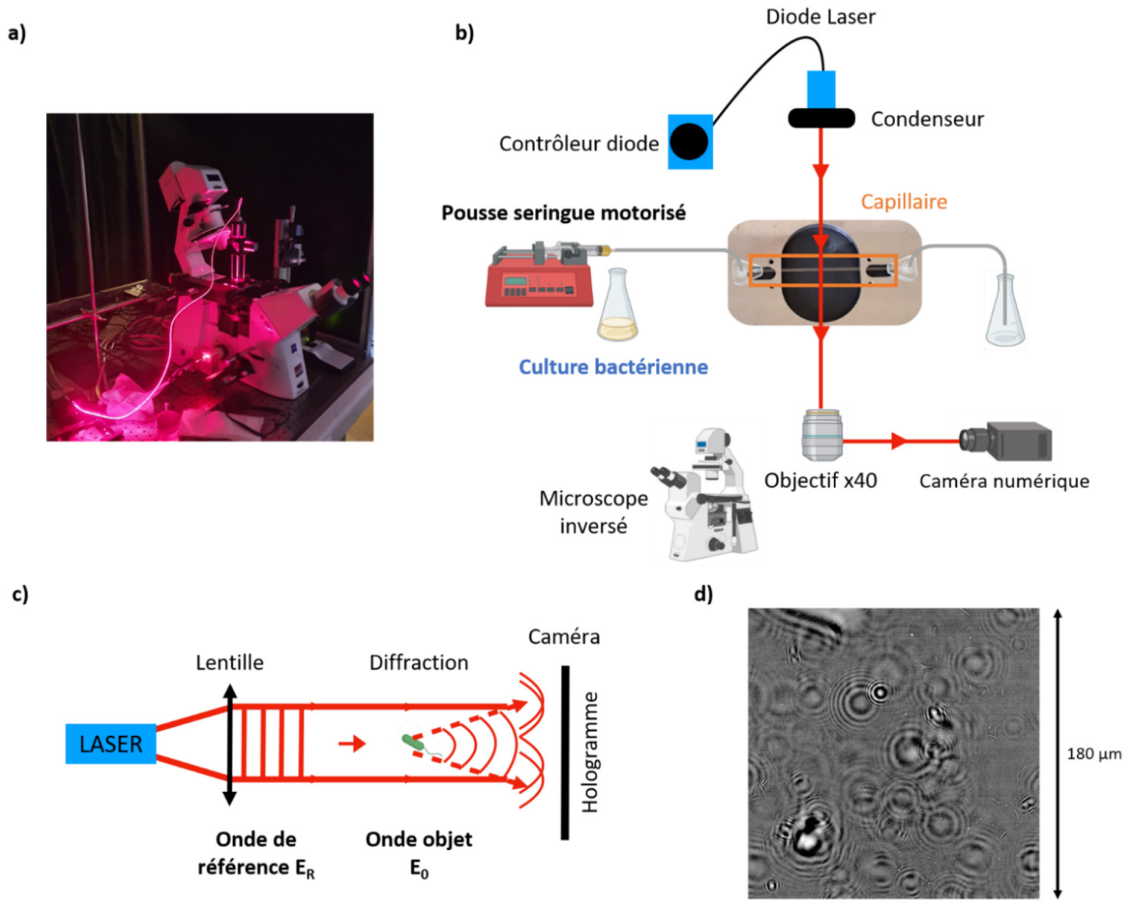


Figure 45. Photographie (a) et schéma (b) du dispositif expérimental de microscopie holographique. c) Représentation de la configuration holographique en ligne de Gabor. d) Exemple d'hologramme obtenu pour une culture de *S. oneidensis* dans un capillaire de 100 µm, en condition statique.

Le montage de Gabor repose sur le principe de formation des hologrammes suivant : l'onde électromagnétique issue de la diode forme une onde plane de référence E_R qui éclaire la suspension de bactéries. Chaque bactérie diffracte cette onde de référence et émet une onde dite onde objet E_O. Pour des suspensions diluées, l'onde de référence n'est que très peu perturbée et l'on peut considérer que le champ total après traversée de la suspension résulte de la superposition des ondes de référence et objet.

Dans nos expériences, une limite d'environ une centaine de bactéries dans le champ d'observation a été fixée afin de satisfaire à la condition de faible perturbation du champ de référence. Finalement, l'intensité résultante des interférences de ces deux ondes est enregistrée sur le capteur de la caméra pour donner une image que l'on appelle l'hologramme $H_0(x,y)$ dont l'expression est donnée par la relation suivante :

$$H_0(x,y) = H(x,y,z=0) \propto |E_R + E_O|^2 = E_R^2 + E_O^2 + E_R E_O^* + E_R^* E_O \qquad (3)$$

Dans cette expression, les coordonnées (x,y) correspondent aux coordonnées du plan du capteur tandis que la distance de propagation (de reconstruction de la troisième dimension) est représentée par la coordonnée z. La position z = 0 détermine la position du plan focal. Les termes E_R^2 et E_O^2 correspondent à l'ordre 0 de la diffraction et ne contiennent aucune information pertinente (composantes continues). Les deux termes suivants $E_R E_O^*$ et $E_R^* E_O$ sont respectivement les ordres -1 et +1 de la diffraction et contiennent l'information 3D de la position (x,y,z) des bactéries dans la zone du capillaire éclairé. Dans notre configuration en-ligne à un bras d'illumination, ces deux termes, complexes conjugués l'un de l'autre, ne sont pas séparables, entraînant une indétermination sur la position des bactéries dans les plans $z > 0$ ou $z < 0$ (on parle d'images jumelles). Pour remédier à ce problème, le plan focal est positionné sur la paroi interne inférieure du capillaire ce qui nous assure que toutes las bactéries sont situées dans le plan $z > 0$.

6.2 Traitement des hologrammes enregistrés

Une fois les hologrammes enregistrés, ces derniers sont post-traités de manière à récupérer les informations des positions (x, y et z) des bactéries sur chaque hologramme, puis de relier leur position entre les hologrammes successifs afin de reconstruire leur trajectoire dans le capillaire.

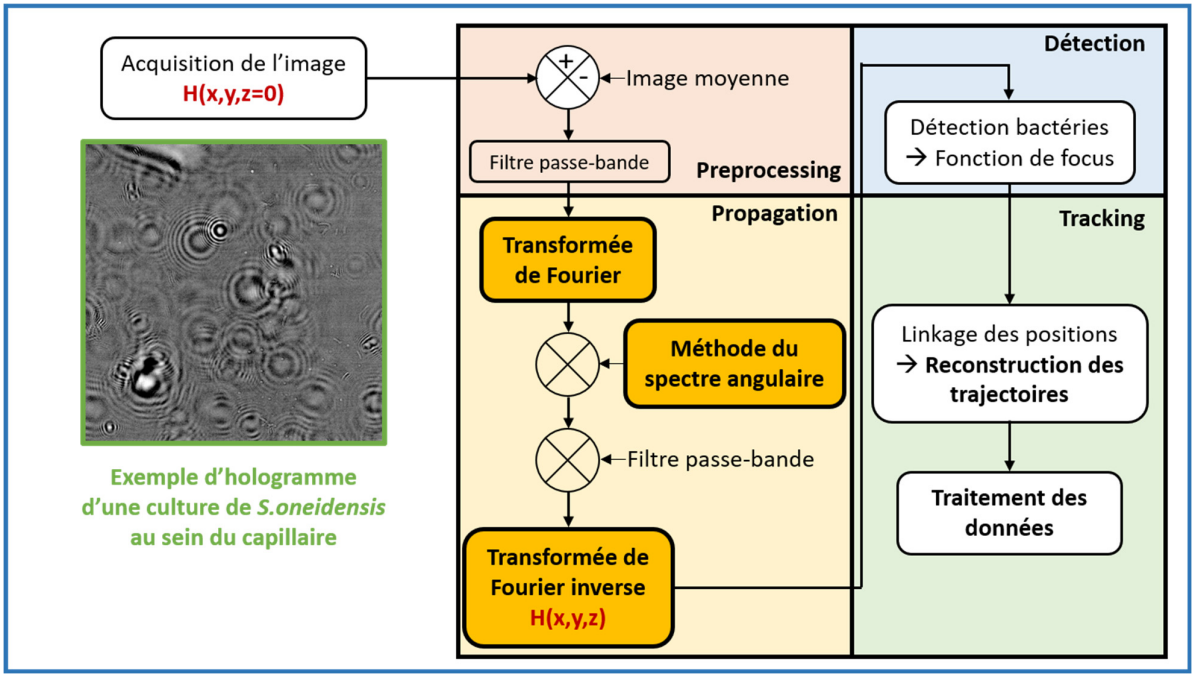


Figure 46. Logigramme du traitement des hologrammes enregistrés au sein du capillaire.

Les différentes étapes de ce traitement (Figure 46) ont été implémentées et optimisées par Simon Becker et Nicolas Louvet en amont de la réalisation de mes expériences (Becker *et al.*, 2024). Ces différentes étapes sont présentées dans les paragraphes ci-dessous.

6.2.1 Elimination du bruit

Pour commencer, en raison de la faible intensité de diffraction des bactéries devant l'intensité du bruit de fond ou encore la présence d'impuretés du verre du capillaire, les hologrammes sont nettoyés afin d'amplifier le signal des interférences. Cette amélioration d'image se fait en divisant les intensités de l'hologramme par celles de l'hologramme moyen, calculées pendant la durée d'acquisition des images, soit 3000 dans notre cas. Cela permet de retirer la composante continue du signal, c'est-à-dire l'ensemble des objets immobiles, du bruit de fond que l'on retrouve tout le long de l'enregistrement. Cette étape améliore grandement la qualité des images, comme nous pouvons le constater sur l'exemple présenté Figure 47, où l'on peut dorénavant clairement observer des figures d'interférences. Au centre de chacune d'entre elles se trouve une bactérie à détecter, et le diamètre des cercles concentriques nous renseigne sur l'éloignement de la bactérie à la paroi. Plus ces derniers sont étroits, et plus les bactéries sont proches de la paroi. Nous appliquons également un filtre passe-bande afin de retirer les basses fréquences proches de la composante continue et les hautes fréquences liées au bruit contenu dans l'image. Le choix de fréquence de coupure s'est fait par essais-erreurs afin d'obtenir une qualité d'image assurant un traitement convenable.

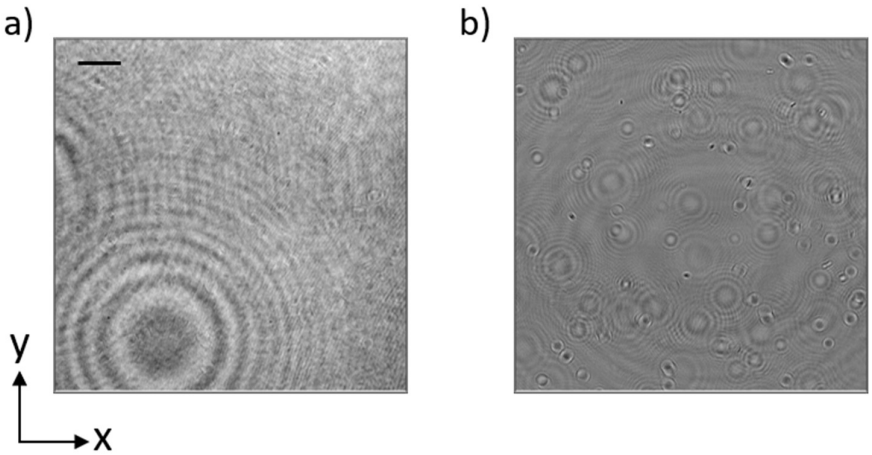


Figure 47. a) Hologramme brut enregistré au sein du capillaire et b) après division par l'image moyenne et filtrage. La barre d'échelle représente 20 µm.

6.2.2 Propagation de l'hologramme

Afin d'accéder aux positions des bactéries dans le volume du capillaire, les hologrammes enregistrés sont propagés numériquement. L'étape de propagation ou de reconstruction de l'hologramme permet de réaliser une « mise au point » numérique sur chaque bactérie et ainsi d'en déterminer ses coordonnées.

Il existe différents modèles de propagation, basés sur le principe de Huygens-Fresnel, dont les domaines de validité sont principalement fixés par la distance de propagation voulue (Picart et Li, 2013). Pour des faibles distances de propagation, typiquement inférieures à la centaine de micromètres, la méthode de décomposition du champ optique en ondes planes (dite du spectre angulaire) est privilégiée. Le champ optique reconstruit à la distance z, $H(x,y;z)$, est calculé selon la relation suivante (Fournier et Haeberlé, 2023) :

$$H(x,y;z) = TF^{-1}\left[e^{\frac{-2i\pi nz}{\lambda}\sqrt{1-(\lambda u_x)^2-(\lambda u_y)^2}}\, TF[H_0(x,y)]\right] \quad (4)$$

Où n est l'indice optique du liquide contenu dans le capillaire, λ la longueur d'onde de la diode laser, u_x et u_y les fréquences spatiales associées aux coordonnées x et y. Les opérateurs TF et TF^{-1} correspondent respectivement à la transformée de Fourier et son inverse.

Le volume reconstruit numériquement est en réalité une succession de plans espacés par un pas de propagation Δz. Un schéma de cette reconstruction numérique du volume du capillaire à partir de l'image 2D est présenté Figure 48. Le choix du pas de propagation Δz est critique : en effet plus ce dernier est faible, et plus la finesse de la détection sera bonne. Ce dernier ne doit pas être supérieur à la taille de l'objet d'étude par risque de perdre de l'information. Dans notre application, connaissant la taille d'une bactérie (1-2 µm) et sur la base d'essais préliminaires (Δz testé de 1, 0,5 et 0,25 µm), le pas de balayage a été fixé à 0,5 µm. Cela signifie que pour un capillaire de hauteur $h = 100$ µm, le volume est reconstruit par la superposition de 200 plans.

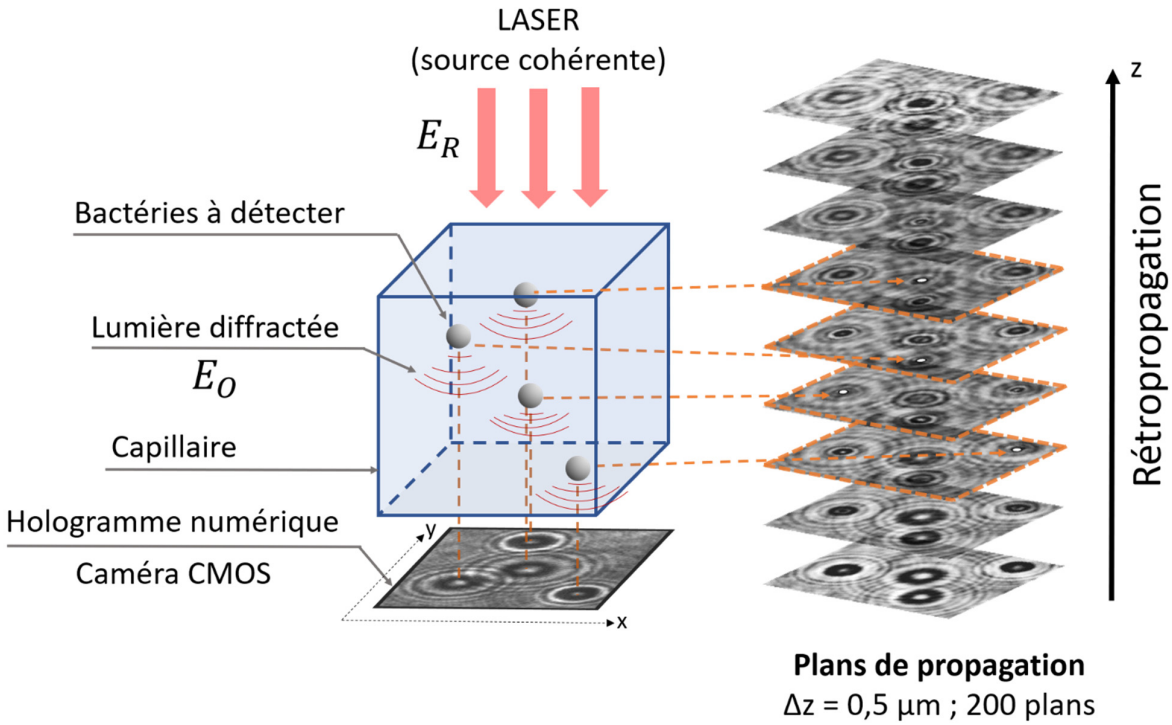


Figure 48. Reconstruction de plans fixes au sein du capillaire par propagation numérique du champ optique.

6.2.3 Détection des bactéries et reconstruction de leurs trajectoires

L'étape suivante consiste à déterminer précisément sur quel plan z se situe chaque bactérie. Pour un instant t donné, la position en x, y, z d'une bactérie correspond à la zone où l'intensité est maximale (Figure 49). Dans notre cas, cette détection est complexifiée en raison de 2 facteurs : 1) la forme des bactéries (forme allongée) qui génère des variations d'intensité selon leur orientation, et 2) le fait que l'indice optique des bactéries est proche de celui de l'eau, ce qui entraîne un faible contraste de signal.

Afin d'augmenter ce contraste, une fonction de focus a été appliquée. Elle consiste à appliquer des filtres pour augmenter les gradients d'intensité de l'image et donc améliorer les contrastes. Plusieurs fonctions de focus existent et ont été testées, avant de retenir celle de TENENGRAD (Fonseca *et al.*, 2016) :

$$F_{TEN}(x,y) = \sum_x \sum_y [H(x,y;z) * S(x,y)]^2 + [H(x,y;z) * S'(x,y)]^2 \quad (5)$$

Les fonctions S et S' sont respectivement un filtre de Sobel et sa transposée et $*$ l'opérateur de convolution.

La Figure 49 illustre un exemple d'application de la fonction de TENENGRAD pour le traitement d'une bactérie reconstruite dans différents plans de coupe.

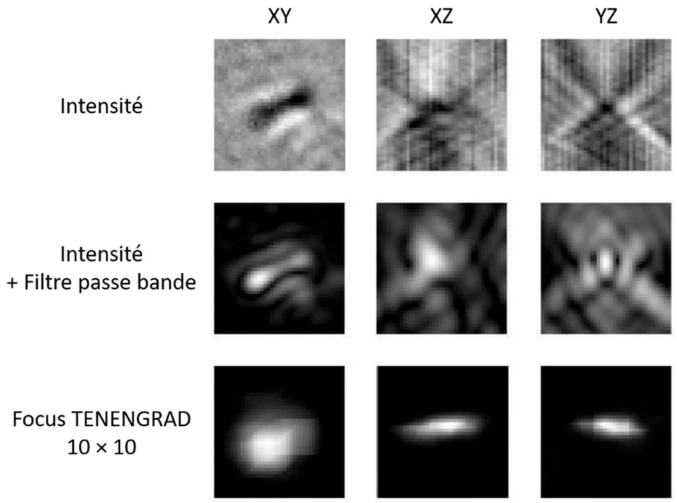


Figure 49. Séquence de traitement d'une bactérie dans différents plans de coupe à l'aide de la fonction de TENENGRAD. (Données issues de ce travail.)

La dernière étape de traitement consiste à binariser l'image puis à regrouper les voxels d'intérêts par la méthode du CCL3D (*connected component labelling*) (Figure 50) pour former un amas représentatif du volume de la bactérie. Nous calculons le barycentre de chaque amas pour obtenir les coordonnées (x, y, z) des bactéries.

Cette dernière étape permet d'obtenir une liste des différentes bactéries avec leurs coordonnées au fil du temps, puis d'établir un lien en regroupant les bactéries similaires détectées au cours du temps afin de reconstituer leurs trajectoires. Cette reconstruction se fait en utilisant les fonctions de la librairie "*trackpy*" de Python (https://github.com/soft-matter/trackpy?tab=readme-ov-file#readme).

Les paramètres importants à fixer sont la zone de recherche ; on définit une distance maximale au-delà de laquelle l'algorithme arrête de rechercher des candidats pour le processus de liaison. Le second paramètre est la mémoire : du fait des fortes variations d'intensité du signal, on peut entre les hologrammes perdre des bactéries puis les détecter de nouveau sur l'image suivante. La mémoire fixe la durée maximale pendant laquelle une bactérie peut disparaître avant que sa trajectoire ne soit reconstruite, si elle est détectée à nouveau. Dans notre configuration, la zone de recherche a été fixée à 5 µm ($\sim 2 \times$ la taille d'une bactérie) et la mémoire à 2, ce qui signifie qu'une bactérie peut disparaître pendant deux images avant que sa trajectoire ne soit rétablie. Ces paramètres ont été conservés pour tous les débits testés, la fréquence d'acquisition étant réglée pour chaque débit de manière à ce qu'entre deux images, le déplacement maximal d'une bactérie reste inférieur à deux fois sa taille.

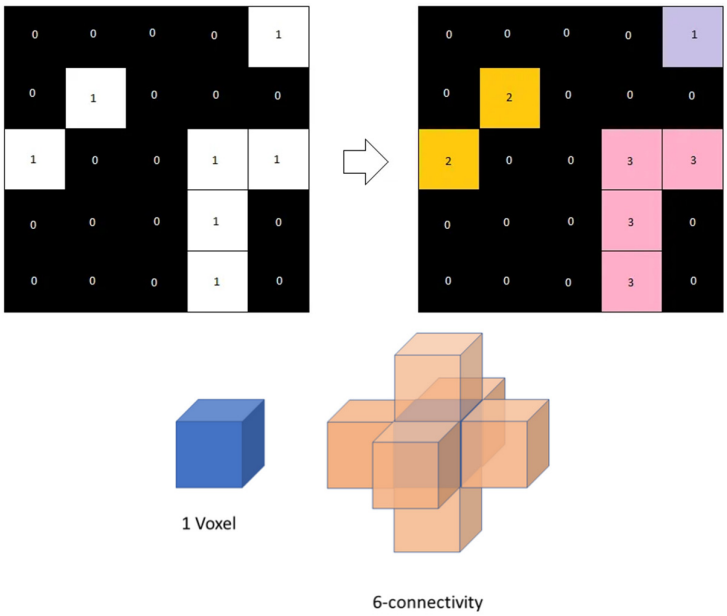


Figure 50. Schématisation du CCL3D (*connected component labelling*) en 3D. Après binarisation du volume, les voxels correspondant aux objets sont identifiés. L'algorithme regroupe ensuite les voxels adjacents, ici selon une connectivité de 6, ce qui permet de localiser chaque bactérie dans le volume.

Afin d'effectuer les étapes de détection et de reconstruction, j'ai utilisé deux logiciels : HoloTrackerLocate et HoloTrackerLink. Ces deux logiciels, librement téléchargeables sur le net (https://github.com/DigitalHolography/HoloTracker), ont été développés sous Labview par Simon Becker (LEMTA) et appellent des codes Python. Le premier permet de localiser les bactéries sur une séquence d'hologrammes. Le second permet d'attribuer un identifiant aux bactéries localisées afin de déterminer leurs trajectoires. L'interface de ces 2 logiciels est présentée ci-dessous (Figure 51).

À titre indicatif, pour un capillaire de 100 µm, avec un pas de reconstruction Δz = 0,5 µm, il faut environ 1 seconde pour propager 1 hologramme et reconstruire ces 200 plans ; soit dans nos expériences (3000 hologrammes enregistrés) environ 50 minutes pour traiter la totalité de l'enregistrement.

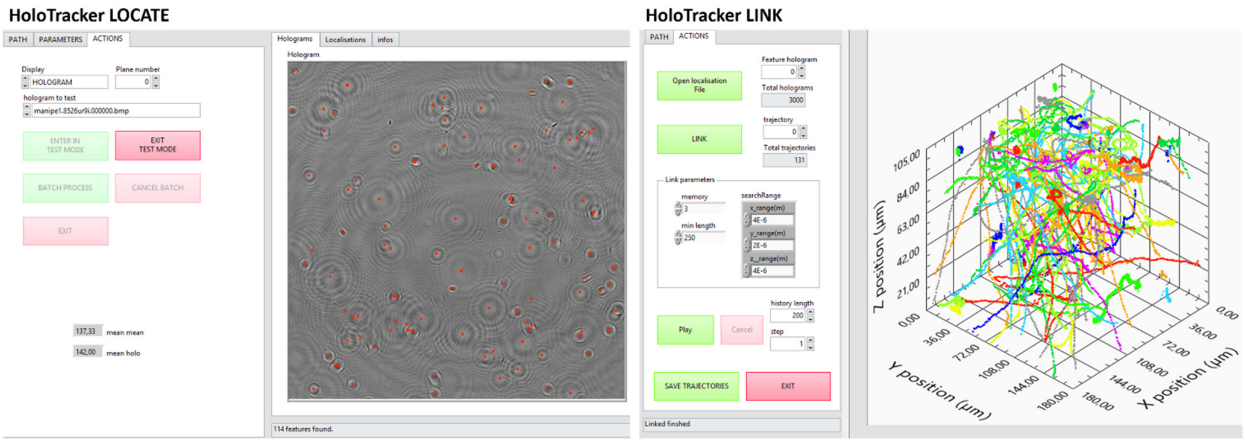


Figure 51. Interface HoloTracker Locate et HoloTracker Link pour la reconstruction des trajectoires des bactéries au sein du capillaire.

6.2.4 Analyse des trajectoires reconstruites

Pour analyser individuellement les trajectoires des bactéries et caractériser leur dynamique de nage et de transfert au sein du capillaire, j'ai développé plusieurs programmes en Matlab. Ces programmes permettent notamment de calculer les vitesses de déplacement des bactéries, de déterminer les fractions de bactéries motiles et non motiles, ainsi que de caractériser leurs trajectoires. La logique et les critères utilisés pour extraire et quantifier ces paramètres sont détaillés dans la section des résultats du chapitre 4. À titre d'exemple, la Figure 52 présente une reconstruction des trajectoires de *S. oneidensis* obtenue au sein du capillaire au cours d'une de mes expériences. La reconstruction graphique a été réalisée sur Matlab.

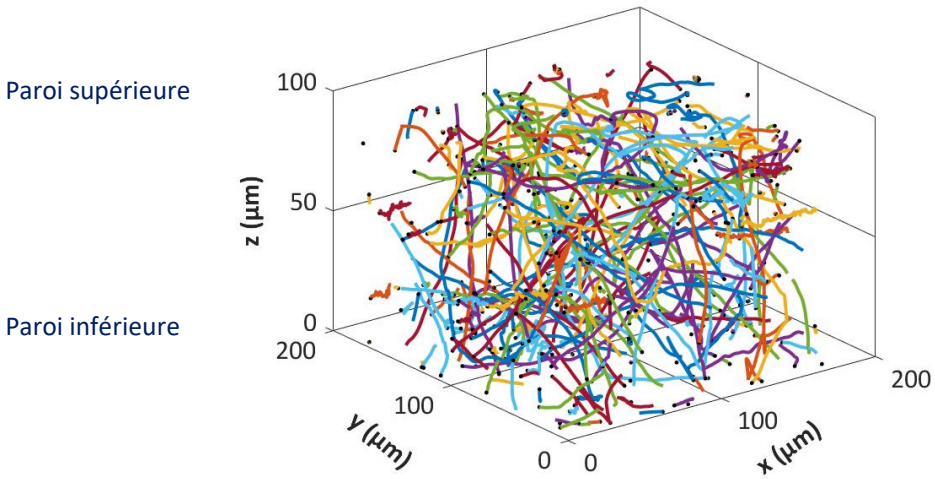


Figure 52. Exemple de trajectoires de *S. oneidensis* reconstruites au sein d'un capillaire de 100 µm en condition statique d'écoulement et dans les 3 dimensions. La reconstruction graphique est codée par Matlab.

7 Caractérisation du transcriptome des bactéries

Afin d'évaluer la réponse biologique des cellules bactériennes soumises au cisaillement, une analyse transcriptomique globale a été réalisée. Cette approche consiste à étudier à un instant t donné, les gènes exprimés par les cellules, c'est-à-dire l'information portée par leurs ARN messagers. L'obtention de ces données nécessite l'extraction des ARN des cellules bactériennes, puis leur séquençage (Blackburn *et al*., 2022 ; Croucher et Thomson, 2010 ; Wang *et al*., 2009). Cette section présente les différents protocoles d'extraction d'ARN testés en amont de l'étude transcriptomique, ainsi que les ajustements réalisés pour sélectionner la méthode la plus appropriée. Elle décrit également les analyses réalisées pour évaluer la quantité et la qualité des ARN extraits. Enfin, les étapes de séquençage et de traitement bio-informatique des données brutes sont détaillées.

7.1 Extraction des ARN bactériens

7.1.1 Méthode du kit « Quick-RNA™ Miniprep »

7.1.1.1 Protocole

Selon les essais, l'extraction des ARN a été réalisée à l'aide du kit « Quick-RNA™ Miniprep » (Zymo Research) en suivant les instructions du fabricant. Les culots bactériens des échantillons à extraire (qu'ils aient été congelés ou frais) ont été remis en suspension dans 600 µL de tampon de lyse, homogénéisés à l'aide d'un vortex (Scientific Industries SI™ Vortex-Genie™ 2) puis transférés et centrifugés (Centrifuge 5424 R, Eppendorf) pendant 30 secondes à 13 000 × g sur une colonne de silice (Spin-Away™ Filter) afin de fixer l'ADN génomique. Les éluats récupérés ont ensuite été mélangés à 600 µL d'éthanol 95 %, puis centrifugés 30 secondes à 13 000 × g sur une seconde colonne de silice (Zymo-Spin™ IIICG), adaptée à la fixation des ARN. Après un traitement DNase I (1 U/µL) pendant 15 minutes à 30°C, les ARN retenus dans la colonne ont été purifiés par trois lavages successifs ; le premier avec 400 µL de RNA *Prep Buffer*, le second et dernier avec 400 µL de *RNA Wash Buffer*. Ces solutions sont incluses dans le kit et leurs compositions restent inconnues. Enfin, la colonne a été transférée dans un Eppendorf certifié biopur et les ARN ont été élués dans 100 µL d'eau exempte d'activité DNase/RNase (Nuclease Free Water, Promega), suite à une centrifugation de 30 secondes à 13 000 × g.

7.1.1.2 Ajout au protocole

La lyse chimique réalisée au moyen du tampon RNA Lysis Buffer du kit « Quick-RNA™ Miniprep » a été parfois accompagnée d'un traitement en amont, soit enzymatique (protéinase K ou lysozyme), soit mécanique (billes de verres) pour renforcer l'efficacité de la lyse. Les conditions d'applications sont présentées Tableau 9.

Tableau 9. Conditions de traitement appliquées en amont du tampon de lyse du kit « Quick-RNA™ Miniprep ».

	Traitement	**Concentration**	**Conditions d'applications** (temps, agitation, température)
Lyse enzymatique	Protéinase K	1 mg/mL	1h30, 350 rpm, 30°C
Lyse enzymatique	Lysozyme	20 mg/mL	30 min, 350 rpm, 37°C
Lyse enzymatique et mécanique	Lysozyme (1) puis billes de verres (2)	(1) 20 mg/mL (2) 500 mg/mL	(1) 30 min, 350 rpm, 37°C (2) 1 min, Agitation forte, $T_{ambient}$

7.1.2 Méthode au phénol acide à chaud (*hot acid phenol*)

Ce protocole, utilisé dans certaines études transcriptomiques impliquant *S. oneidensis* (Barchinger *et al.*, 2016 ; Binnenkade *et al*., 2014 ; Gödeke *et al.*, 2012, 2011) est décrit Figure 53 et présenté ci-dessous. Précisons ici que l'ensemble des étapes impliquant l'utilisation de solvants organiques a été réalisé sous hotte chimique, avec le port approprié des équipements de protection individuelle (gants, lunettes et blouse), par souci de sécurité et conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

Les culots bactériens des échantillons à extraire (conservés congelés ou frais) ont été remis en suspension dans 400 µL de tampon AE (acétate de sodium 50 mM (pH = 5,2), EDTA 10 mM (pH=8,0)) et dans 40 µL de SDS 10 % (dodécylsulfate de sodium). Le mélange a été homogénéisé à l'aide d'un vortex (Scientific Industries SI™ Vortex-Genie™ 2), puis 440 µL d'acide phénolique (Sigma-Aldrich, pH = 4,3 ± 0.2) ont été ajoutés à l'échantillon. Le tout est homogénéisé vigoureusement à l'aide du vortex (3200 tr/min), puis incubé pendant 4 min à 65°C dans un bloc chauffant (Thermomixer comfort eppendorf). L'échantillon est ensuite transféré rapidement dans de la carboglace pendant 3 minutes, puis les phases aqueuse et organique sont séparées par centrifugation (Jouan BR4i) à 14 000 × g pendant 10 minutes à température ambiante. Un volume équivalent de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (Sigma-Aldrich, Phenol : Chloroform : Isoamyl Alcohol 25 :24 :1, pH = 8,0) est ensuite ajouté à la phase aqueuse récupérée, suivi d'une homogénéisation vigoureuse à l'aide du vortex et d'une centrifugation à 14 000 × g pendant 10 minutes à température ambiante. Après séparation et récupération de la phase aqueuse, un volume équivalent de chloroforme (Sigma-Aldrich, Chloroforme) y est ajouté, puis le tout est homogénéisé et centrifugé à 14 000 × g pendant 10 minutes à température ambiante. Afin de faire précipiter les acides ribonucléiques, 40 µL d'acétate de sodium 3M et 1 mL d'éthanol 95 % ont été ajoutés à la phase aqueuse récupérée, ainsi que 1 µL de glycoblue (AM9515, Invitrogen), co-précipitant utilisé pour augmenter la visibilité du futur culot d'acides nucléiques (coloration bleu). Le mélange est homogénéisé par retournements successifs, puis placé à -80°C pendant 30 minutes. Le précipité obtenu est ensuite culoté par centrifugation à 14 000 × g pendant 30 minutes à 4°C. Après retrait du surnageant, ce culot est lavé par ajout de 500 µL d'éthanol 80 %, puis centrifugé et séché pendant 5 minutes à 37°C après élimination du surnageant.

Le culot d'ARN est enfin re-suspendu dans 40 µL d'eau exempte d'activité DNase/RNase (Nuclease Free Water, Promega). La quantité des ARN extraits et leur qualité sont évaluées selon les méthodes décrites aux paragraphes suivants. Les extraits d'ARN sont finalement conservés à -80°C en attendant leur séquençage.

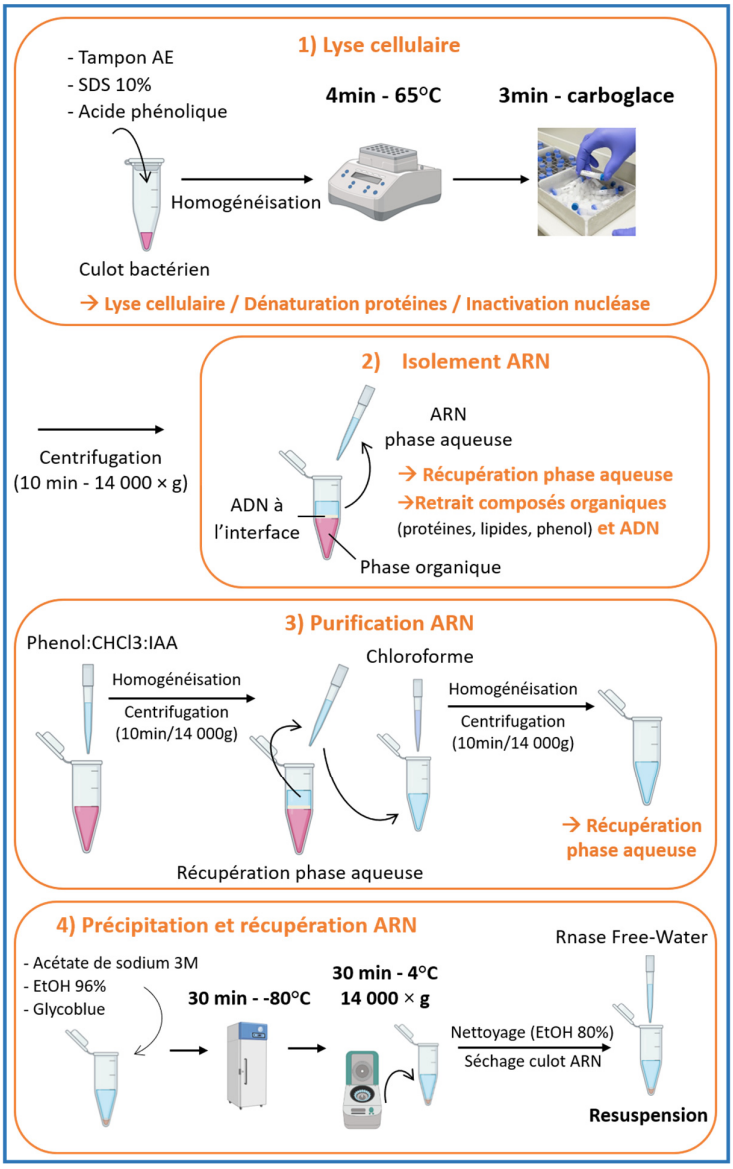


Figure 53. Extraction d'ARN bactérien par la méthode *hot acid phenol*

7.2 Analyse des ARN extraits

7.2.1 Évaluation de la concentration et de la pureté des ARN extraits

La concentration en ARN des extraits, ainsi que leur pureté ont été déterminées par spectrophotométrie UV (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, ThermoScientific). Pour chaque échantillon, un volume de 1,5 µL a été déposé sur le socle de mesure ; ce volume est éclairé à l'aide d'une lampe au xénon et la lumière traversant l'échantillon est analysée à l'aide d'un spectromètre à spectre complet (190-840 nm).

La concentration en ARN (limite de détection de l'appareil : 2 ng/µL) est estimée grâce à la loi de Beer-Lambert par mesure à 260 nm, où une unité d'absorbance en UV correspond à 40 µg/mL.

La pureté des extraits a quant à elle été évaluée par des mesures d'absorbance aux longueurs d'onde de 230 nm et 280 nm. L'absorbance à 230 nm permet d'estimer la présence de contaminants tels que des produits de dégradation des protéines, des hydrates de carbone, des substances humiques, des composés aromatiques ou encore la persistance de résidus de réactifs d'extraction. L'absorbance à 280 nm, quant à elle, renseigne sur une éventuelle contamination protéique des échantillons. Un rapport A_{260} / A_{230} supérieur ou égal à 2 est associé à un bon niveau de pureté. Un rapport A_{260} / A_{280} inférieur à 1,8 est indicatif de la présence de protéines dans l'échantillon. Si ce dernier est compris entre 2 et 2,2, la pureté de l'échantillon d'ARN est considérée comme acceptable.

7.2.2 Évaluation de l'intégrité des ARN extraits sur gel d'agarose

Le niveau de dégradation des ARN extraits a été évalué par électrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %) en tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1mM EDTA) avec le marqueur de poids moléculaire Quick-Load 1kb Plus DNA Ladder (Biolabs) utilisé comme standard pour estimer la taille des fragments. Après migration (50 Volts pendant ~ 50 minutes), les ARN ont été colorés dans un bain de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL) pendant 15 minutes, puis visualisés et photographiés sous rayonnement UV à l'aide de l'appareil Gel Doc XR+ System (Bio-Rad). L'analyse du gel repose sur l'observation de deux bandes nettes correspondant aux ARN ribosomiques bactériens 23S et 16S, signe d'un bon état d'intégrité. En revanche, la présence de *smear* diffus ou de bandes floues indique une dégradation partielle ou totale des ARN.

7.2.3 Évaluation de l'intégrité des ARN extraits par électrophorèse Agilent

Dans un second temps, la qualité des extractions a été déterminée de manière plus quantitative à l'aide du système d'électrophorèse automatisé : Agilent TapeStation 4150 (Agilent Technologies), en utilisant une ScreenTape ARN à haute sensibilité (High Sensitivity RNA ScreenTape®), capable d'analyser des échantillons même faiblement concentrés (jusqu'à 100 pg/µL). Le procédé consiste à mélanger 2 µL d'échantillon avec le tampon de migration (1 µL). La migration est ensuite réalisée sur des gels miniaturisés prêts à l'emploi (« *ScreenTape* ») et le profil de migration des acides nucléiques, ainsi que leurs concentrations sont obtenus et analysés sur le logiciel TapeStation Analysis Software 4.1.1. De même que leur indice d'intégrité (« RIN », *Integrity Number*), introduit pour évaluer le niveau de dégradation des ARN extraits et ainsi juger de la fiabilité de leur utilisation pour des analyses en aval (séquençage par exemple). Déterminé à l'aide d'un algorithme basé sur l'électrophorèse capillaire de l'ARN, il prend en compte la présence et l'intensité des pics caractéristiques de l'ARN ribosomique (ARN 16S et 23S chez les procaryotes), la forme générale du profil de migration, ainsi que la quantité relative de fragments d'ARN courts (synonyme de dégradation). Ce score est compris entre 1 et 10 ; une valeur plus élevée étant indicatrice d'une meilleure intégrité de

l'ARN. Pour illustration, la Figure 54 présente un résultat d'électrophorèse sur ScreenTape® dans le cas de 2 échantillons, le premier dégradé et le second d'intégrité acceptable.

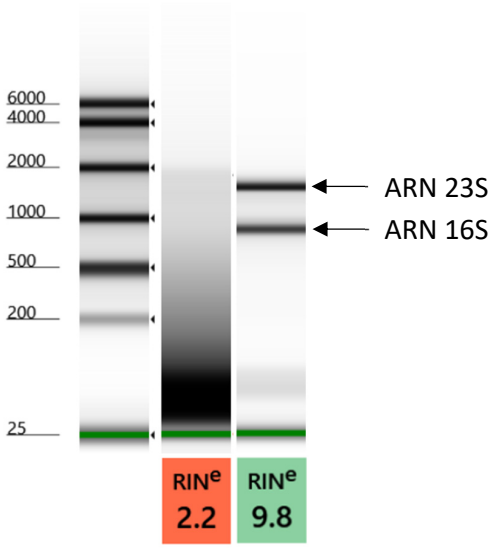


Figure 54. Analyse de 2 échantillons d'ARN par électrophorèse sur ScreenTape® High Sensitivity RNA après extraction d'un culot bactérien de *S. oneidensis* (1 mL à 10^9 cellules/mL). L'électrophérogramme montre la distribution des différents fragments d'ARN après séparation sur le système ScreenTape®, notamment les ARN ribosomique 16S et 23S, ainsi que leur qualité. Le premier échantillon (à gauche) est fortement dégradé (RIN=2,2), les fragments sont peu distincts et on observe une quantité importante de fragments de faible taille. À la différence de l'échantillon n°2, à droite, qui présente des bandes très distinctes au niveau des pics caractéristiques des ARN 16S et 23S.

7.2.4 Traitements enzymatiques post-extraction

7.2.4.1 Traitement DNAse I

Lorsque cela s'est avéré nécessaire, c'est-à-dire en présence d'ADN génomique contaminant, les extraits d'ARN obtenus ont été traités à l'aide d'une DNase (DNase I (RNase-free), Biolabs), une enzyme de type endonucléase qui dégrade spécifiquement l'ADN. La réaction a été réalisée selon le protocole recommandé par le fabricant ; en mélangeant (volume réactionnel final = 100 µL) 1 µL d'enzyme, 10 µL de son tampon de réaction, un volume d'extrait d'ARN correspondant à environ 10 µg et de l'eau exempte d'activité nucléase (Nuclease Free Water, Promega) pour compléter. Le tout est incubé à 37°C pendant 10 minutes, puis l'enzyme est désactivée par un traitement thermique (75°C pendant 10 minutes) après l'ajout de 1 µL d'EDTA (0,5 M) pour protéger les ARN de la dégradation.

7.2.4.2 Traitement RNase

Afin d'évaluer la nature exacte des produits issus de l'extraction, du point de vue des acides nucléiques, un traitement enzymatique à la RNase a été appliqué après extraction (Ce chapitre, paragraphe 7.1). L'enzyme, fournie par Biolabs a été utilisée conformément aux recommandations du fabricant. Les produits de cette digestion ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et comparés à l'extrait initial.

7.3 Séquençage des ARN extraits

Après extraction des ARN et vérification de leur qualité et de leur concentration, les échantillons ont été envoyés sous carboglace à Novogene Europe (Novogene GmbH) pour le séquençage. Le prestataire a réalisé un contrôle qualité initial, puis une étape de ribodéplétion visant à éliminer les ARN ribosomiques majoritaires mais non codants. Des librairies directionnelles d'ARN messager ont ensuite été construites (fragmentation de l'ARN, synthèse de l'ADNc, ajout des adaptateurs). Le séquençage a finalement été réalisé sur la plateforme Illumina NovaSeq X Plus, générant des lectures appariées de 150 pb (PE150).

7.4 Analyses bio-informatique des données de séquençage

Les séquences brutes envoyées par Novogène ont été traitées sur Galaxy Europe (https://usegalaxy.eu). Le contrôle qualité des données a été effectué à l'aide de l'outil FastQC (version 0.74), puis les séquences ont été traitées pour retirer les adaptateurs et séquences parasites avec Trimmomatic (version 0.39). Ces dernières ont ensuite été alignées sur le génome de référence de *S. oneidensis* (GCA_003241225) à l'aide de HiSat2 (version 2.2.1) en utilisant les paramètres par défaut. Les fichiers SAM générés ont permis la quantification des lectures par gène à l'aide de htseq-count (version 2.0.5) (Tutoriels sur Galaxy Training!). La matrice finale des 1971 gènes exprimés lors des expériences (Chapitre 5 partie 2) a ensuite été utilisée pour toutes les analyses statistiques à l'aide du logiciel R (version 2025.05.1, R Core Team 2025). Ces analyses comprennent : 1) une analyse en composantes principales (ACP) couplée à une PERMANOVA basée sur la dissimilarité de Bray-Curtis. 2) L'identification des gènes différentiellement exprimés (DEGs) en utilisant l'outil DESeq2 (Love *et al*., 2014). 3) L'analyse d'enrichissement fonctionnel des catégories COG (Galperin *et al.,* 2025 ; Tatusov, 2000) via le test exact de Fisher. Et enfin 4) l'analyse d'enrichissement des voies métaboliques KEGG (Chen *et al*., 2017 ; Kanehisa *et al*., 2016) avec le package clusterProfiler (Xu *et al*., 2024 ; Yu *et al*., 2012). L'ensemble des critères appliqués pour ces analyses est présenté au chapitre 5.

CHAPITRE 3 :

INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE SUR L'ADHÉSION PIONNIÈRE DE *S. oneidensis* PAR APPROCHE DEEP LEARNING

Introduction

La compréhension de l'adhésion bactérienne pionnière, qui est le prélude fondamental à la formation du biofilm (Hori et Matsumoto, 2010 ; Kreve et Reis, 2021 ; Santore, 2022), est essentiel pour appréhender les mécanismes de colonisation des surfaces et envisager des stratégies de contrôle appropriées. Ce phénomène de piégeage des bactéries à la paroi résulte d'une interaction complexe entre des facteurs physiques, chimiques et biologiques, parmi lesquels les conditions hydrodynamiques jouent un rôle déterminant (Berne *et al*., 2018 ; Busscher et Van Der Mei, 2012 ; Carniello *et al*., 2018).

Cependant, en raison de la nature intrinsèquement éphémère et dynamique de cette phase d'adhésion (Alves *et al*., 2020 ; Lecuyer *et al*., 2011), ainsi que du faible niveau de biomasse impliqué, son étude reste particulièrement limitée et constitue un véritable défi, tant sur le plan instrumental que méthodologique (Dubay *et al*., 2023 ; Haas *et al*., 2014 ; Kimkes et Heinemann, 2020 ; Van Teeffelen *et al*., 2012). Dans l'idéal, compte tenu du faible nombre de bactéries impliquées, et afin de tenir compte de la variabilité intrinsèque de leur comportement, ces investigations devraient être menées à l'échelle individuelle et sur de larges effectifs bactériens, afin d'assurer une robustesse statistique suffisante et de garantir la représentativité de l'ensemble de la population bactérienne pionnière colonisatrice.

Dans ce contexte, notre étude poursuit un double objectif :

(1) Implémenter et valider une méthode automatisée de traitement d'images, **basée sur le deep learning,** permettant la détection et le suivi spatio-temporel à l'échelle individuelle de chaque bactérie pionnière interagissant avec la paroi. La preuve de concept de cette approche, reposant sur l'utilisation d'un réseau neuronal (YOLOv8) préalablement entraîné et validé, a été réalisée sur une bactérie modèle, *Shewanella oneidensis MR-1* gfp^+, au sein d'un système microfluidique couplé à un microscope à épifluorescence. À notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle approche basée sur le deep learning est introduite pour étudier le comportement des bactéries pionnières à la paroi.

(2) Évaluer l'influence du taux de cisaillement à la paroi sur la dynamique d'adhésion bactérienne pionnière, à la fois à l'échelle individuelle et populationnelle. Pour ce faire, la même configuration expérimentale qu'au point (1) a été utilisée, en faisant varier le cisaillement entre 0 à 1250 s^{-1}, afin d'évaluer son impact sur le processus d'adhésion bactérien.

Cette investigation s'articule autour de plusieurs questionnements scientifiques. Nous avons notamment cherché à déterminer dans quelle mesure les conditions hydrodynamiques influencent la cinétique de colonisation bactérienne (échelle populationnelle), mais aussi, à l'échelle individuelle, comment elles modulent la capacité des bactéries à rester à la paroi une fois le contact établi, leur déplacement à la paroi, ainsi que leur orientation spatiale sous flux.

Nous avons également examiné l'évolution du temps de résidence et de la distribution spatiale des bactéries à la paroi, sur une surface se colonisant progressivement, en lien avec le phénomène de blocage hydrodynamique (*hydrodynamic blocking*) décrit par certains auteurs (Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Camesano et Logan, 1998 ; Ko et Elimelech, 2000 ; Lu *et al.*, 2013).

Les résultats obtenus sont détaillés dans ce chapitre, articulé en trois sections :

- La première est consacrée aux essais préliminaires indispensables à la justification de nos choix expérimentaux. Elle présente notamment le protocole expérimental mis en place pour étudier la dynamique d'adhésion bactérienne à la paroi, les résultats en découlant et fait la démonstration de l'implémentation du modèle de détection par *deep learning* en mettant l'accent sur la phase critique d'apprentissage du modèle.
- La seconde étudie l'effet du taux de cisaillement sur la dynamique d'adhésion des bactéries pionnières à la paroi. Cette partie est présentée sous la forme d'un article scientifique publié le 16 novembre 2024 dans la revue *Biofilm*.
- Enfin, la dernière vient compléter les résultats de la publication en explorant trois aspects spécifiques :
    - La capacité de déplacement des bactéries le long de la paroi et sa dynamique, en fonction des conditions hydrodynamiques.
    - L'évolution temporelle de la dynamique bactérienne mise en évidence dans la section 2, et plus précisément celle du temps de résidence des bactéries à la paroi est analysée afin de déterminer si ce comportement se maintient ou se modifie au cours du temps.
    - Le rôle potentiel du blocage hydrodynamique dans la structuration spatiale de la colonisation bactérienne à la paroi, en proposant une modélisation de ce phénomène.

1 Mise en place expérimentale et implémentation du modèle de détection

Les paragraphes suivants exposent le protocole expérimental mis en œuvre pour étudier l'influence de l'hydrodynamique sur l'adhésion bactérienne à la paroi. Cette partie inclut également certains résultats expérimentaux justifiant nos choix méthodologiques, notamment la validation du modèle de détection par *deep learning*, avec un focus particulier sur sa phase critique d'apprentissage.

1.1 Protocole expérimental

Le système microfluidique, connecté à une pompe et à une alimentation (chapitre 2 paragraphe 4), a été positionné sur la platine d'observation d'un microscope à épifluorescence dans une salle à température contrôlée (22,4 ± 0,3°C). Après la préparation de l'inoculum bactérien (souche *S. oneidensis* gfp+) (chapitre 2 paragraphe 1.4) à une concentration de 5×10^7 ($\pm 3 \times 10^6$) cellules/mL, le système a été ensemencé

pendant deux heures en boucle fermée et à débit constant (de 0 à 1000 µL/min selon la condition hydrodynamique testée). Des prélèvements ont été réalisés toutes les heures au sein de la phase liquide, suivis d'une analyse par cytométrie en flux de la biomasse totale et des cellules à membranes endommagées (PI+), ainsi que d'une analyse de la cultivabilité par dénombrement sur milieu gélosé. Pour étudier la biomasse adhérée à la paroi, le plan focal du microscope a été ajusté au niveau de la paroi supérieure en verre du capillaire afin de s'affranchir des effets de sédimentation. L'illumination est assurée par une lumière bleue (longueur d'onde 450 - 490 nm) et une caméra enregistre la dynamique de colonisation bactérienne à une fréquence fixée d'une image toutes les deux secondes et avec un temps d'exposition de 800 ms. Le champ d'observation est de 550 × 310 µm². Ces images ont ensuite été analysées. Dans un premier temps par comptage manuel du nombre de bactéries adhérées à la paroi, ce qui permet d'établir la cinétique de la colonisation bactérienne. Dans un second temps par apprentissage profond (*deep learning*), à l'aide du réseau neuronal YOLOv8 que nous avons entraîné pour détecter spécifiquement notre modèle bactérien, à savoir des bacilles verts (souche gfp+) après excitation par une lumière bleue.

1.2 Démonstration de l'absence de croissance au sein du système

1.2.1 Choix du milieu de culture

La volonté d'étudier l'évolution temporelle de la colonisation bactérienne sous hydrodynamique, et non de mesurer une résultante adhésion / croissance bactérienne, a motivé plusieurs de nos choix expérimentaux : le fait de travailler à température ambiante par exemple, mais aussi le choix du milieu de culture ; l'objectif étant de maintenir les cellules en bonne condition de viabilité (PI-) tout en limitant leur croissance durant l'expérience. Cinq milieux de culture ont été testés en amont (Tableau 10) : deux milieux nutritifs riches (LB, TSB), une version diluée ($LB_{1/10}$), un milieu minimal (Fouad), et un milieu à base de lactate (5 mM) fréquemment utilisé pour l'étude de biofilm de *S. oneidensis (*Binnenkade *et al.,* 2018 *;* Gödeke *et al*., 2011 ; Paulick *et al*., 2009 ; Saville *et al*., 2010 ; Thormann *et al*., 2005, 2004). La composition détaillée de ces milieux est présentée dans le chapitre 2, paragraphe 1.3.

Nous avons retenu celui qui, après pré-culture et dilution, permettait d'atteindre une concentration compatible avec nos exigences d'ensemencement voisines de 5×10^7 cellules/mL, tout en garantissant l'absence de prolifération bactérienne mesurable durant les deux heures suivant sa préparation. Des essais préliminaires (non présentés ici) ont permis d'établir une corrélation linéaire entre la concentration cellulaire déterminée par cytométrie en flux et la densité optique à 600 nm (concentration cellulaire ≈ $5{,}5 \times 10^8 \times DO_{600}$), et qui établit qu'une DO_{600nm} minimale de 0,1 est nécessaire pour respecter notre seuil de concentration d'ensemencement. Sur cette base, il est clairement apparu que le milieu minimal et le milieu lactate ne nous permettaient pas d'atteindre le seuil de concentration d'ensemencement nécessaire (Tableau 10) et ces deux milieux ont donc été exclus. Par ailleurs, pour garantir l'absence de prolifération bactérienne, seuls les milieux pour lesquels le cumul du temps de latence

et du temps de doublement bactérien dépassait deux heures ont été retenus, ce qui a permis d'éliminer les milieux nutritifs riches LB et TSB. Notre choix s'est ainsi porté sur le milieu LB dilué au dixième ($LB_{1/10}$), dont les paramètres cinétiques de croissance pour *S. oneidensis* sont présentés dans le Tableau 10.

Tableau 10. Paramètres cinétiques de croissance (DO_{600nm} max, temps de latence, temps de doublement et taux de croissance μ) de *S. oneidensis* gfp+ obtenus à 30°C, sous agitation orbitale (160 rpm) dans différents milieux de culture. N correspond au nombre de réplicats biologiques.

Milieux	**DO_{600nm} max**	**Temps de latence** (min)	**μ** (h^{-1})	**Temps de doublement** (min)
LB (N=10)	2,1 ±0,05	58,8 ± 2,7	0,89 ± 0,02	47,9 ± 0,89
$LB_{1/10}$ (N=6)	0,3 ± 0,004	142,8 ± 4,3	0,46 ± 0,004	91,2 ± 0,82
TSB (N=2)	2,0 ± 0,1	52,2 ± 2,7	0,70 ± 0,007	59,0 ± 0,41
Milieu lactate (5 mM) (N=3)	0,1 ± 0,003	305,8 ± 6,4	0,28 ± 0,02	148,7 ± 7,7
Fouad (N=2)	0,09 ± 0,005	286,1 ± 2,7	0,20 ± 0,00009	207,9 ± 2,0

1.2.2 Validation de l'absence de croissance durant l'expérience

L'absence de croissance bactérienne dans le milieu sélectionné a été confirmée au sein de notre système et dans nos conditions expérimentales (22,4°C ± 0,3°C pendant 2 heures). La Figure 55a présente l'évolution temporelle de la biomasse planctonique totale (bactéries gfp+), cultivable et de celle dont les membranes sont altérées (PI+). L'inoculum bactérien présentait une concentration initiale moyenne de 4,6 × 10^7 cellules/mL, dont environ 98 % étaient non perméables à l'iodure de propidium (PI-), témoignant d'une bonne intégrité membranaire, et environ 8 % étaient cultivables en 24h. Aucune différence significative (p = 0,296) n'a été observée au sein de la biomasse totale pendant les deux heures d'expérience, et on note, même si ce n'est pas statistiquement significatif (p = 0,060), une légère amélioration de la cultivabilité et du pourcentage de bactéries PI-.

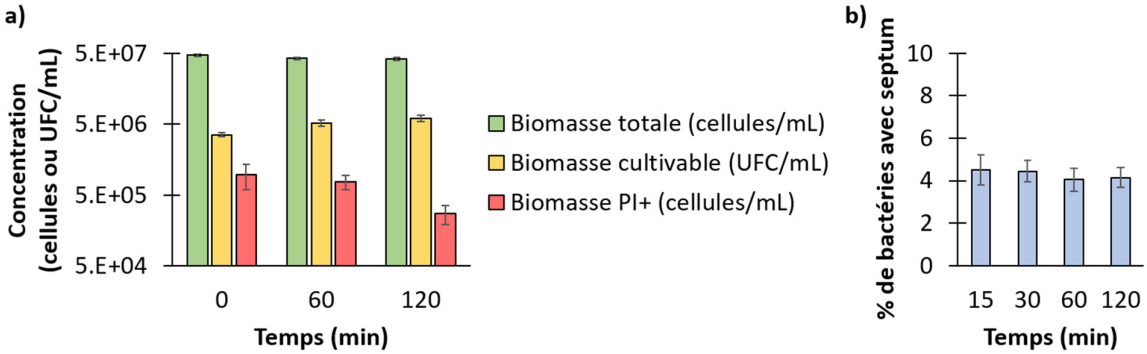


Figure 55. a) Évolution temporelle de la biomasse totale (gfp+), cultivable et PI+ (membranes endommagées). b) Nombre de bactéries à septum visible au sein de notre système expérimental. Les valeurs représentent les moyennes et écarts-types pour 17 valeurs ; excepté pour la biomasse PI^+ (N=5).

L'absence de prolifération bactérienne au niveau de la paroi a également été évaluée en comptant le nombre de bactéries présentant un septum visible (Figure 55b) sur les images prises à différents instants (15, 30, 60 et 120 minutes). Au premier point de mesure (15 minutes), considéré comme représentatif de l'inoculum initial, environ 4 % des bactéries présentaient un septum visible ; ce pourcentage est resté stable (4,3 % ± 1 %) tout le long de l'expérience, suggérant que les évènements de division cellulaire à la paroi sont relativement rares dans ces conditions expérimentales.

Cette absence de prolifération, tant au sein de la biomasse planctonique que de celle adhérée, met en évidence que l'augmentation de la concentration surfacique observée au cours du temps (Fig. 4 paragraphe 2 Chapitre 3) est majoritairement due à des phénomènes d'adhésion bactérienne, plutôt qu'à une croissance à la paroi (qui si elle se produit restera minoritaire).

1.3 Stabilité de la fluorescence de la protéine gfp

Une attention particulière a été accordée à la stabilité temporelle du signal fluorescent de la protéine gfp, exprimée de manière constitutive par notre souche bactérienne, l'objectif étant de s'assurer sur la durée d'expérimentation d'une détection fidèle et représentative de l'ensemble des bactéries gfp+ à la paroi ou dans le volume (*bulk*).

1.3.1 Quantification des bactéries gfp+ et sybr+ dans le bulk

En complément de la quantification de *S. oneidensis* gfp+ et de leur fluorescence par cytométrie en flux, un marquage au fluorochrome SYBR Green I, ciblant une macromolécule stable de la bactérie, ses acides nucléiques, a été effectué conjointement. La Figure 56 présente les résultats obtenus. Aucune différence significative entre les concentrations gfp+ et sybr+ n'a été observée aux différents temps de mesure (p-values = 0,899 ; 0,926 ; 0,963), indiquant que la fluorescence de la gfp/cellule reste suffisamment stable tout au long de l'expérience. On peut donc conclure que les bactéries détectées à la paroi correspondent bien à l'ensemble des bactéries qui y transfèrent, sans biais de détection lié à une éventuelle perte de fluorescence.

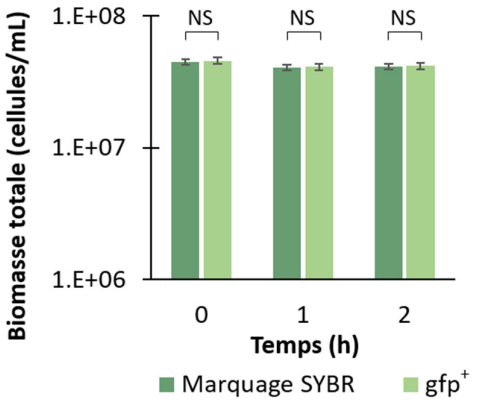


Figure 56. Évolution temporelle de la biomasse totale (N=17 par temps) par cytométrie en flux : équivalence des signaux gfp+ et SYBR green I.

1.3.2 Prise en compte du photoblanchiment des bactéries à la paroi

Des essais préliminaires ont également été réalisés afin d'éviter le phénomène de photoblanchiment au niveau de la paroi exposée à la source lumineuse. Ces essais consistaient à observer, sur une zone fixe contenant des bactéries adhérées et soumise à une exposition prolongée, la dynamique de photoblanchiment, en suivant la diminution progressive de leur fluorescence jusqu'à ce qu'elles ne soient plus détectables, ni à l'œil nu à travers les objectifs, ni par la caméra. Ces observations ont permis de définir les conditions d'imagerie suivantes : chaque zone observée a été exposée au maximum pendant 16 ± 2 minutes à une intensité lumineuse de 35 %. Ces paramètres assurent un bon compromis entre la qualité de l'intensité du signal (nécessaire au traitement d'image) et la préservation de la fluorescence (pour limiter la perte de signal à la paroi).

1.4 Démonstration de l'homogénéité de colonisation longitudinale du capillaire

Compte tenu de l'importance du choix de la zone d'observation, la colonisation bactérienne selon l'axe longitudinal du capillaire a été étudiée afin de s'assurer que ce choix n'influait pas sur la concentration surfacique obtenue.

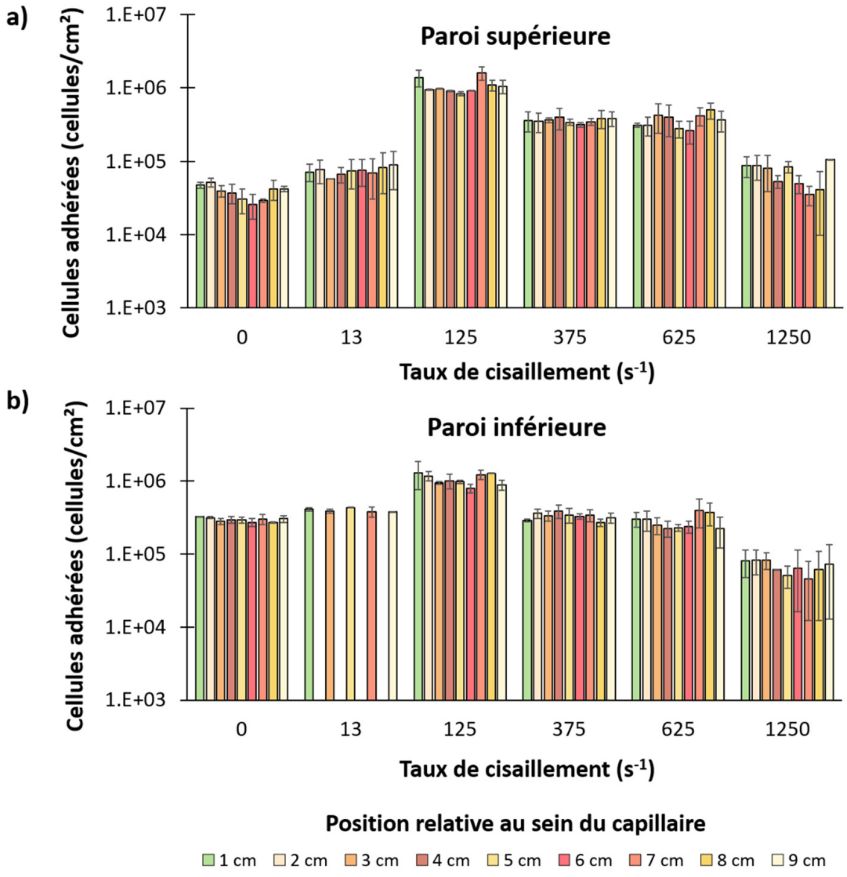


Figure 57. Concentration bactérienne surfacique obtenue après 2 heures de colonisation à la paroi supérieure (a) et inférieure (b) du capillaire, pour différentes distances de l'entrée et pour différents taux de cisaillement. Les histogrammes représentent la moyenne ± erreur standard de 3 expériences indépendantes (sauf pour $\dot{\gamma}_w = 13$ s^{-1} N=2).

Comme on peut le constater sur la Figure 57, pour chaque taux de cisaillement étudié, les niveaux de concentration surfacique obtenus ne présentent pas de différence significative entre les zones, ce qui indique une colonisation homogène sur toute la longueur du capillaire. Il est donc possible d'étudier la colonisation bactérienne à n'importe quel endroit du capillaire. La décision a été prise de positionner la zone d'observation initiale au centre du capillaire, puis de la déplacer vers l'amont du champ d'observation dès que nécessaire, c'est-à-dire toutes les 14 minutes afin d'éviter le photoblanchiment.

Les niveaux de colonisation obtenus en fonction du taux de cisaillement ne seront pas discutés ici, car ils feront l'objet d'une discussion ultérieure (paragraphe 2 ci-dessous). Néanmoins, l'absence de variation longitudinale de la colonisation dès l'entrée du capillaire indique que le régime d'écoulement est directement établi et uniforme, sans aucune perturbation initiale. En ce qui concerne la sédimentation bactérienne, bien qu'un effet soit observé à faible cisaillement entre les parois inférieure et supérieure, nous y reviendrons également ; cette dernière ne semble pas se manifester de manière longitudinale. Nous émettons l'hypothèse que les bactéries, bien qu'elles aient tendance à sédimenter sous l'effet de la gravité, ont un temps de séjour hydrodynamique (temps de passage des bactéries à travers le capillaire) insuffisant pour qu'une accumulation progressive vers l'aval soit mesurable.

1.5 Implémentation d'une méthodologie de traitement d'images automatisé par Deep Learning

En collaboration avec Cédric Pradalier (GeorgiaTech Europe), Jérémy Fix (Centrale Supélec) et Simon Becker (Lemta), nous avons développé une méthode de traitement des images acquises lors de ces expériences d'adhésion. Cette méthode permet de détecter automatiquement chaque bactérie présente sur une image, d'assurer leur suivi spatio-temporel, et ainsi d'évaluer leur temps de résidence à la paroi, leur orientation et leurs déplacements, résultats qui seront détaillés dans les paragraphes suivants. Le chapitre 2 (paragraphe 5.4) détaille les étapes de traitement ayant conduit à ces analyses. Nous proposons ici de mettre l'accent sur la phase d'apprentissage du modèle, étape cruciale ayant fait l'objet de nombreuses optimisations avant d'aboutir à un modèle valide et à des résultats fiables, publiés dans la revue *Biofilm*. Pour rappel, durant cette phase, les bactéries ont été annotées manuellement sur un ensemble d'images, utilisé comme base d'apprentissage. Le modèle a ainsi appris par l'exemple à reconnaître ce qu'est une bactérie et s'est spécialisé progressivement dans sa détection. Les performances du modèle ont ensuite été validées de deux manières complémentaires : d'une part par une validation interne au système, à l'aide des métriques de précision (P) et rappel (R) et d'autre part par comparaison du nombre de bactéries estimé automatiquement par le modèle avec celui issu du comptage manuel.

Initialement entraîné sur un jeu de données comptant environ 10 000 bactéries issues d'expériences variées, le modèle a montré de bonnes performances pour certaines images mais faibles pour d'autres.

Ce constat a mis en évidence la nécessité d'intégrer dès la conception du jeu d'apprentissage les différentes sources de variabilité rencontrées au cours de nos expériences ; un point que nous allons détailler juste après. Pour renforcer la robustesse du modèle, nous avons ainsi procédé à six cycles d'entraînement successifs, en enrichissant ou modifiant à chaque fois le jeu labellisé. La Figure 58a illustre, à titre comparatif, une cinétique de colonisation obtenue avec quatre versions d'entraînement différentes, avec le comptage manuel comme référence. On constate une nette amélioration avec le modèle issu du dernier cycle entraînement (n°6), comparativement aux précédents. Cette progression se reflète clairement dans l'analyse des corrélations entre les comptages manuels et automatiques (Figure 58 b-d), avec pour le dernier entraînement, un meilleur alignement des points le long de la ligne d'égalité y = x, indiquant une convergence entre les deux méthodes de quantification.

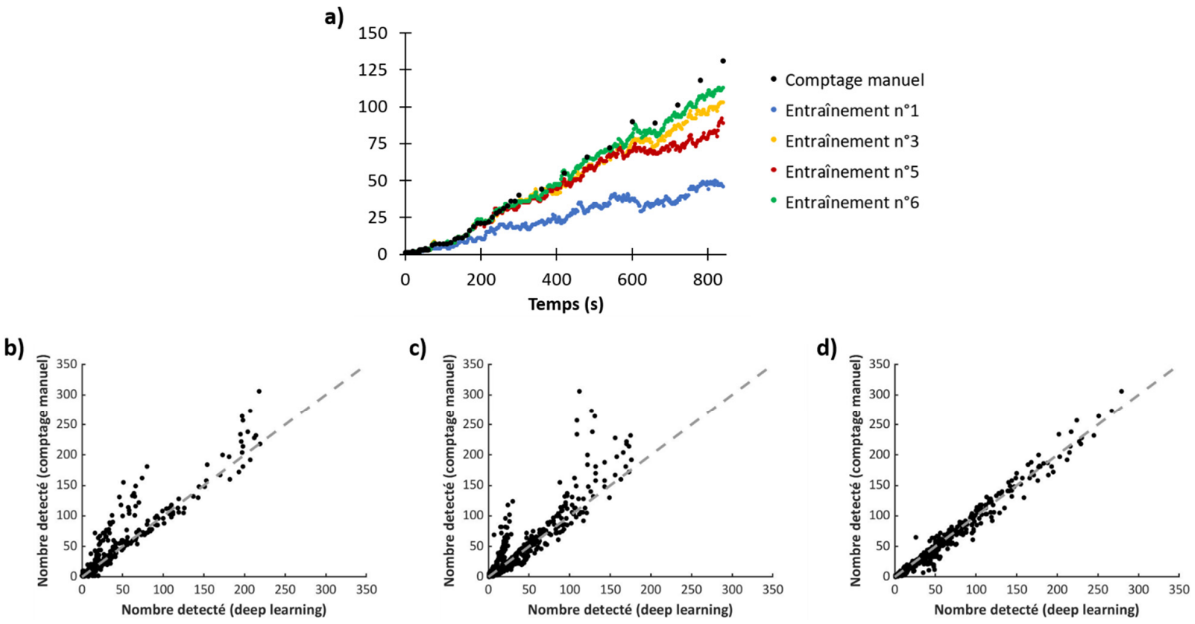


Figure 58. Comparaison des modèles de détection au fil des entraînements. a) Exemple représentatif d'une cinétique de colonisation obtenue par comptage manuel (points noirs) et à l'aide du modèle pour différents entraînements réalisés (courbes en couleur). b), c) et d) Corrélations entre le nombre de bactéries détectées manuellement et à l'aide du modèle de système de neurones entrainé, respectivement pour (b) l'entraînement initial, (c) le 3ème entraînement et (d) l'entraînement final. L'ensemble des données utilisées pour ces évaluations comprend 706 images avec environ 28 000 bactéries détectées.

Cette amélioration repose sur une intégration progressive et réfléchie des diverses sources de variabilité rencontrées au sein de nos images. Une analyse visuelle approfondie de nos données a en effet révélé une variabilité importante de la fluorescence (Figure 59 a-c), aussi bien concernant l'intensité de fluorescence des bactéries (inoculum dépendent), le bruit de fond ou encore le contraste entre bactérie et bruit de fond. Par ailleurs, la morphologie bactérienne au sein de l'inoculum présente des hétérogénéités de taille. Nous soulignons également des variations dans le positionnement des bactéries à la paroi : de manière qualitative la majorité des bactéries sont positionnées longitudinalement sur la paroi, tandis que certaines, plus minoritaires, sont fixées sur un seul pôle, avec des tailles et des formes distinctes.

De manière plus anecdotique, quelques bactéries apparaissent floues (Figure 59e) en raison d'une légère inclinaison du capillaire sur la platine provoquant des zones hors focus, tandis que d'autres présentent un halo lumineux (Figure 59d).

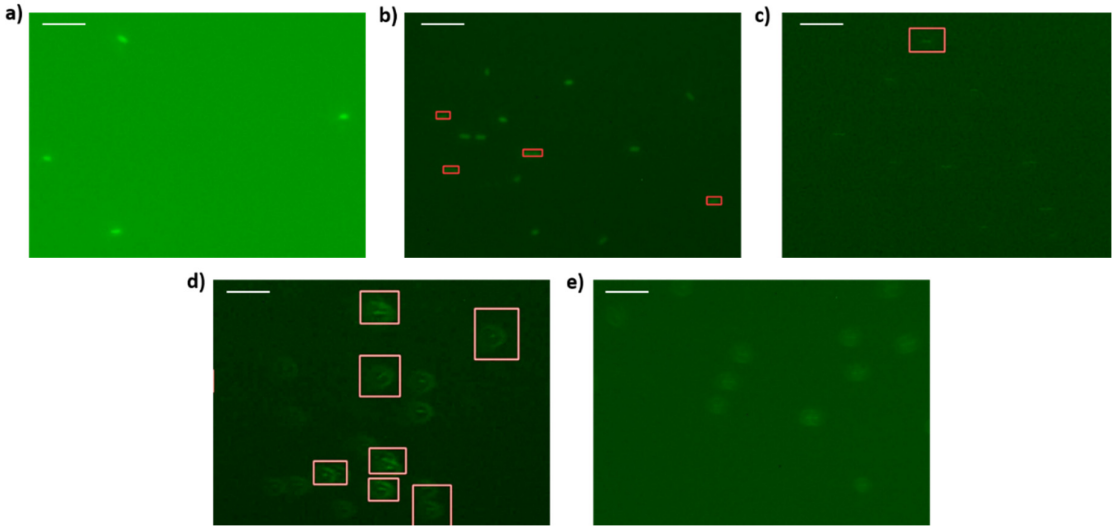


Figure 59. Exemples illustrant les différentes sources de variabilité observées au sein de nos images. a) Bactéries présentant une fluorescence très intense sur un fond également très lumineux. b) Image avec fond sombre mais contraste bactérie / fond marqué. c) Très faible contraste de fluorescence entre la bactérie et le fond. d) Présence de halos lumineux autour des bactéries. e) Bactéries floues. La barre d'échelle représente 20 µm.

Pour garantir une solide représentativité de la classe « bactérie » dans le modèle, nous avons reconstruit soigneusement le jeu d'apprentissage afin d'y intégrer l'ensemble des variabilités observées. Le jeu d'apprentissage a également été enrichi par des techniques d'albumentation, consistant à générer artificiellement des variations dans les images (défocalisation, contrastes, luminosité, brut), afin d'augmenter virtuellement la diversité des bactéries rencontrées par le modèle.

Ces ajustements ont permis d'aboutir à un modèle final satisfaisant (n°6), avec des performances équilibrées (R = 0,78 et P = 0,78) et une très bonne corrélation entre le nombre de bactéries compté manuellement et celui détecté par le modèle final ; ce qui nous permet de valider le modèle. Le jeu d'entraînement final comprend 300 images annotées, totalisant plus de 30 000 bactéries étiquetées.
À titre d'exemple, la Figure 60 illustre la bonne détection par le modèle de deep learning des bactéries présentes à la paroi du capillaire pour différentes conditions temporelles.

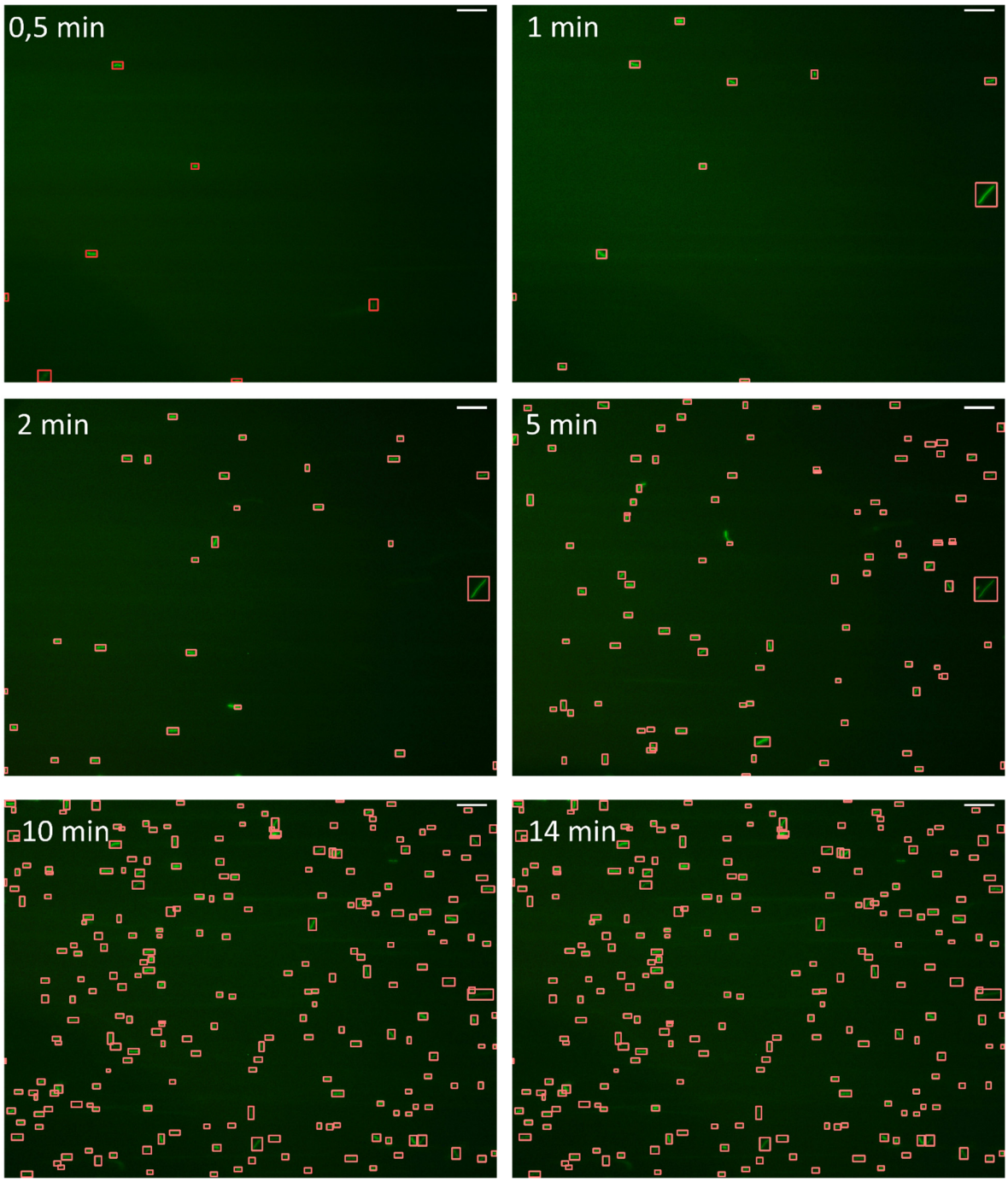


Figure 60. Exemple de détection par le modèle des bactéries présentes sur la paroi supérieure du capillaire au cours d'une cinétique de colonisation, sous un cisaillement à la paroi de 125 s^{-1}. La barre d'échelle correspond à 25 µm.

2 Influence du taux de cisaillement sur la dynamique d'adhésion précoce de *Shewanella oneidensis* par analyse deep learning

Cette section est présentée sous la forme d'un article scientifique, en anglais, publié le 16 novembre 2024 dans le journal *Biofilm*.

Effect of shear rate on early *Shewanella oneidensis* adhesion dynamics monitored by Deep Learning

Lucie Klopffer[a,b], Nicolas Louvet[b*], Simon Becker[b], Jérémy Fix[c], Cédric Pradalier[d], Laurence Mathieu[e*]

[a] Université de Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000 Nancy, France ; [b] Université de Lorraine, CNRS, LEMTA, F-54000 Nancy, France ; [c] Unviversité de Lorraine, CNRS, Centrale Supélec, F-57070 Metz, France ; [d] GeorgiaTech Europe, IRL 2958, F-57070 Metz, France; [e] EPHE, PSL, UMR CNRS 7564, LCPME, F-54000 Nancy, France

*Corresponding authors :

Laurence Mathieu ; LCPME, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 20199, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France ; laurence.mathieu@univ-lorraine.fr
Nicolas Louvet ; LEMTA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, BP 90161, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France **;** nicolas.louvet@univ-lorraine.fr

https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100240

Received 26 July 2024; Received in revised form 30 October 2024; Accepted 15 November 2024

Biofilm 8 (2024)

Abstract

Understanding pioneer bacterial adhesion is essential to appreciate bacterial colonization and consider appropriate control strategies. This bacterial entrapment at the wall is known to be controlled by many physical, chemical or biological factors, including hydrodynamic conditions. However, due to the nature of early bacterial adhesion, i.e. a short and dynamic process with low biomass involved, such investigations are challenging. In this context, our study aimed to evaluate the effect of wall shear rate on the early bacterial adhesion dynamics. Firstly, at the population scale by assessing bacterial colonization kinetics and the mechanisms responsible for wall transfer under shear rates using a time-lapse approach. Secondly, at the individual scale, by implementing an automated image processing method based on deep learning to track each individual pioneer bacterium on the wall. Bacterial adhesion experiments are performed on a model bacterium (*Shewanella oneidensis* MR-1) at different shear rates (0 to 1,250 s^{-1}) in a microfluidic system mounted under a microscope equipped with a CCD camera. Image processing was performed using a trained neural network (YOLOv8), which allowed information extraction, i.e. bacterial wall residence time and orientation for each adhered bacterium during pioneer colonization (14 min). Collected from over 20,000 bacteria, our results showed that adhered bacteria had a very short residence time at the wall, with over 70 % remaining less than 1 minute. Shear rates had a non-proportional effect on pioneer colonization with a bell-shape profile suggesting that intermediate shear rates improved both bacterial wall residence time as well as colonization rate and level. This lack of proportionality highlights the dual effect of wall shear rate on early bacterial colonization; initially increasing it improves bacterial colonization up to a threshold, beyond which it leads to higher bacterial wall detachment. The present study provides

quantitative data on the individual dynamics of just adhered bacteria within a population when exposed to different rates of wall shear.

Keywords: early bacterial adhesion dynamics; wall shear rate; deep learning; microfluidic system; *Shewanella oneidensis*

Highlights

- A rise in shear rate initially facilitated bacterial pioneer colonization until a threshold level was reached, beyond which increasing shear resulted in a reduction in colonization.
- Deep learning analysis of the initial contact and adhesion of a population of *S. oneidensis* provides quantitative evidence of the dynamic process of nascent biofilms.
- Deep learning revealed two bacterial lifetimes at the wall: a dynamic one with a very short residence time and a sedentary one with longer adhered times. Prolonged bacterial contact with the wall surface was promoted at the intermediate shear rates tested.
- The majority of wall pioneer bacteria adhering were aligned similar or very close to the direction of flow.

Introduction

The transition of bacteria from a planktonic to a surface-attached state, followed by their adhesion to surfaces, is the fundamental prelude to biofilm formation. Regardless of how one views biofilm (Santore 2022; Hori and Matsumoto 2010; Kreve and Reis 2021), i.e. (i) as a way of life for collections of individual microbial cells (ii) as main microbial communities with the characteristics of a multicellular organism, or (iii) as structures serving as diversity incubators for microbes, biofilms nevertheless always begin with the initial contact of a planktonic cell with a surface that evolves into structured communities of bacterial cells and embedded into a self-produced extracellular matrix (Hall-Stoodley *et al*., 2004; Flemming and Wingender 2010; Penesyan *et al*., 2021; Sentenac *et al*., 2022). This bacterial entrapment is known to be governed by both molecular and physicochemical interactions as near-wall approaching bacteria experience surface specific interactions, such as hydrodynamic forces, adhesive forces, steric interactions, etc., which govern the adsorption process and their surface dynamics (Busscher and Van Der Mei 2006; Berne *et al*., 2018).

In particular it is well-known that the flow strength plays a predominant role as it determines both the transfer and attachment of planktonic bacterial cells to the surface (Bakker *et al*., 2002; Park *et al.*, 2011; Santore, 2022). Moreover, hydrodynamic conditions also shape and control mature biofilms as it contributes to the supply of nutrients and oxygen to the biofilm (Pereira *et al*., 2002; Stoodley *et al.*, 1999; Thomen *et al.*, 2017), the thickness, compactness and 3D-struturation of the biofilm (Mathieu *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022b), the amount and composition of its EPS matrix (Hou *et al.*, 2018; Kumar

et al., 2012; Lemos *et al.*, 2015) or its erosion (Chambless and Stewart, 2007; Wang *et al*., 2022b). Most studies in literature attempt to characterize the influence of hydrodynamics at the biofilm scale, i.e. on a biofilm already established on the surface and defined by a high adherent biomass, surface bacterial growth and EPS production. However, the processes of bacterial adhesion at the very early stages of adhesion under hydrodynamic constraints are less well understood.

Although few data are available, colonization kinetics in the early steps of biofilm formation show that bacterial adhesion is a fast and dynamic process (Alves *et al.*, 2020; Lecuyer *et al.*, 2011), making such investigations challenging. Moreover, due to the small number of bacterial events involved at this stage, effective study of early bacterial adhesion requires working with large sample sizes to be statistically robust and at the individual bacterial scale to account for behavioral variability and be representative of the entire pioneering bacterial colonizers.

Microfluidic devices coupled with conventional microscopy techniques (optical, fluorescence or confocal microscopy) benefited to the study of pioneering biofilms in situ, in real time and under controlled flow conditions and are currently the methods of choice for such investigations (Karimi *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2023). Numerous strategies, based on both imaging, optical and computational image processing algorithms techniques' improvement, have been developed to track individual bacteria (Chenouard *et al*., 2009; Jeckel and Drescher 2021; Cheng *et al*., 2022; Zhang *et al*., 2022). However, such approaches are facing many technical challenges with respect to instrumental limitations (sensitivity, spatio-temporal resolution, signal to noise ratio), big data processing and analyzing (time-consuming, powerful computational resources and technical expertise needed) or bacteria intrinsic properties (size, motility, bacteria interactions, physiological changes…) (Van Teeffelen *et al*., 2012; Haas *et al*., 2014; Kimkes and Heinemann 2020; Dubay *et al*., 2023).

To address such challenges, amongst others, deep learning has gained increasing interest in image processing of data collected using various microscopy techniques to detect, segment, track or classify biological objects (Cheng *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2021; Melanthota *et al.*, 2022). Although this methodology is more established in the case of eukaryotic cells, it is gradually being introduced into the field of microbiology for the study of bacterial cells, as reported in some recent studies. Such applications may include, for instance, the automatic counting and classification of bacterial colonies on Petri dishes (Ferrari *et al.*, 2017; Tamiev *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022), the tracking of bacterial division (Lugagne *et al.*, 2020) or the segmentation of bacterial biofilm images (Abeyrathna *et al.*, 2022; Ragi *et al.*, 2021). However, to our knowledge, this innovative approach has never been introduced to study the behavior of pioneer bacteria in the early stages of biofilm formation.

In this context, our study aimed to evaluate the effect of wall shear rate on the early bacterial adhesion dynamics within a capillary system. Beyond the standard time-lapse approach for assessing bacterial colonization kinetics, we decided to work at the individual scale, by implementing an automated image processing method based on deep learning to track each individual pioneer bacterium at the wall.

To achieve this goal, the first two hours of colonization kinetics of a model bacterium *Shewanella oneidensis* was performed under controlled hydrodynamic strength conditions. We aimed to assess (i) the contribution of each of the transfer mechanisms (convection, sedimentation or diffusion) to the bacterial adhesion, (ii) the influence of the shear rate on the behavior of the pioneer adhered bacteria in terms of residence time and orientation at the wall and (iii) the performance of deep learning approach on early adhered bacteria tracking. We have demonstrated such an original approach applied for the first time to early events colonizing a surface that holds great promise for analyzing massive data.

Materials and Methods

Shewanella oneidensis strain and inoculum preparation

Experiments were performed using *Shewanella oneidensis* MR-1 as a model strain that constitutively expressed the green fluorescent protein (gfp). This strain was constructed by Teal *et al*. (2006) using gfpmut3* gene insertion in the *S. oneidensis MR-1* genome using a modified Tn7 delivery system. This strain, stored at -80°C, was used for all the experiments.

Microfluidic system and hydrodynamic conditions

Early bacterial dynamic adhesion experiments were studied in a microfluidic flow cell (Fig. 1). A high aspect ratio rectangular glass capillary (Vitrocom, height h = 0.2 mm, width w = 2 mm, length L = 100 mm), was connected to a peristaltic pump or syringe pump depending on the imposed flow rate Q. For each assay, a new entire microfluidic device (capillary and tubing) was used and cleaned with the following protocol: SDS (0.1 % - 30 min - 1 mL/min), ultrapure water (30 min at 1 mL/min), HCL (0.1M - 30 min at 1 mL/min) and ultrapure water (30 min - 1 mL/min).

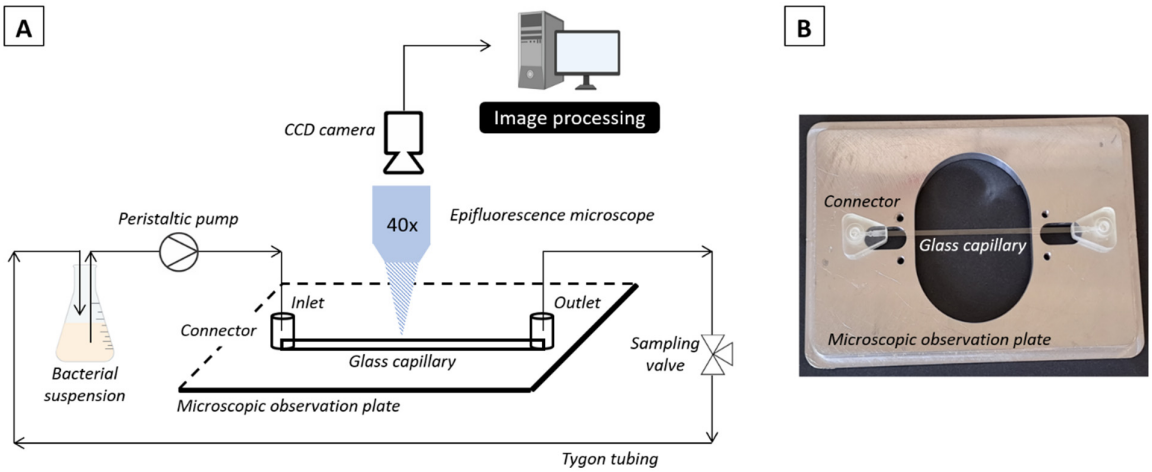


Fig. 1. A) Schematic diagram of the closed-loop experimental setup. B) Focus of the microfluidic glass capillary (0.2 × 2 × 100 mm^3).

In order to evaluate the hydrodynamic conditions on the bacterial adhesion the flow rate *Q* was varied from 10 to 1,000 µL/min. The shear rate generated at the walls is well approached by the formula (Bruus, 2007):

$$\dot{\gamma}_w = \frac{6Q}{wh^2} \quad (1)$$

In the range of applied flow rates, this led to wall shear rates ranging between 13 and 1,250 s^{-1}, which correspond to wall shear stresses of 0.013 and 1.25 Pa (Table 1). These values are within the range of typical wall shear stress experienced by bacteria in many flow configurations (real or lab-scale) for biofilm formation (Chang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2019; Fernandes *et al.*, 2021; Mathieu *et al.*, 2014; Saur *et al.*, 2017; Simões *et al.*, 2022)**.** Static condition was also tested as a control. The Reynolds number was calculated for each condition as follows: $Re = \rho u D_h / \eta$ where ρ the fluid density (ρ = 1,000 kg/m^3) and η its dynamic viscosity (η = 10^{-3} Pa.s). *u* corresponds to the average fluid velocity and D_h to the device hydraulic diameter with $D_h = 2wh/(w+h)$. The Reynolds number was always lower than 15 ensuring laminar flow condition.

Table 1. Values of flow rate (*Q*) and associated hydrodynamic parameters of the capillary device: wall shear rate ($\dot{\gamma}_w$), wall shear stress (σ_w), Reynolds number (*Re*), average fluid velocity (*u*) and estimated and ratio of characteristic times of mass transfer: hydrodynamic residence time (T_r), sedimentation time (T_s) and diffusion time (T_d).

***Q* (µL/min)**	**10**	**100**	**300**	**500**	**1,000**
$\dot{\gamma}_w$ **(s^{-1})**	13	125	375	625	1,250
σ_w **(Pa)**	0.013	0.125	0.375	0.625	1.25
Re	1.5 10^{-1}	1.5	4.5	7.6	15.2
***u* (mm.s^{-1})**	4.2 10^{-1}	4.2	12.5	20.8	42.0
T_r **(s)**	240	24	8	4.8	2.4
T_s **(s)**	500	500	500	500	500
T_d **(s)**	8,300	8,300	8,300	8,300	8,300
T_d / T_r	35	346	1,038	1,729	3,458
T_d / T_s	17	17	17	17	17
T_s / T_r	2	21	63	104	208

Early bacterial adhesion experimental setup

Prior to assay, *S. oneidensis* from the glycerol stock at -80°C was recovered onto Lysogeny Broth Lennox (LB, Sigma-Aldrich L3022) agar plates. After 2 days incubation at 30°C, several isolated colonies of *S. oneidensis* were used to inoculate a 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of sterile 10-fold diluted LB medium ($LB_{1/10}$). After this overnight preculture (30°C, 160 rpm) the bacterial suspension on stationary growth phase was centrifuged (4,375 g for 4 min) and resuspended in fresh $LB_{1/10}$ medium to reach a final concentration close to 5 × 10^7 ± 3 × 10^6 cells/mL. Prior to inoculation, a conditioning step (Bhagwat *et al.*,

2021; Haas *et al.*, 2015; Hakim *et al.*, 2020; Tuck *et al.*, 2022) with $LB_{1/10}$ medium was performed for 2 hours at 100 µL/min. The microfluidic system (Fig. 1), was then inoculated with the bacterial suspension in a closed loop for 2 hours at a constant flow rate depending on the experimental conditions (Table 1). The time T_0 of the test corresponds to the moment when the entire system was filled with the suspension and indicates the start of the 2h test. A minimum of 3 independent experiments per shears were conducted and averaged.

Quantification of planktonic S. oneidensis planktonic by culture and flow cytometry

To study the evolution of *S. oneidensis* concentration during the adhesion experiments, regular samples were taken directly from the flask containing the inoculum. On each of them, measurements of culturability by plating and total gfp bacteria by flow cytometry (FCM) were done. For culturability, 10 µL from multiple 10-fold dilutions of the bacterial suspension were plated on $LB_{1/10}$ agar media and after incubation of 2 days at 30°C, the number of colonies were counted and results expressed as CFU per milliliter. For total bacteria counting, analysis was performed with the BD Accuri™ C6 Plus flow cytometer (BD Biosciences, USA) equipped with a blue laser at 488 nm. Ultrapure water (OTEC Aguettant, France) was used as sheath fluid. GFP-bacteria were detected using the FL1 detector (533 nm ± 30). Events were triggered on the forward scatter (FSC) parameter with a threshold 2500 and on the FL1 detector with a threshold of 700. Flow cytometer data were acquired on diluted sample (1:10 in ultrapure water, OTEC Aguettant, France) over 2 min at a flow rate of 35 µL/min and were analyzed using BD Accuri™ C6 software (BD Biosciences).

Quantification of adhered S. oneidensis by microscopy and time-lapse processing

Pioneer adhesion was studied using video microscopy. The microfluidic system was mounted under an epifluorescence microscope (Zeiss Axioskop, Germany, 40x/0.6 objective) in a temperature-controlled chamber where an average temperature of 22.4°C ± 0.3°C was maintained. The system was equipped with a CCD camera (P830C 8.3 MPixels) recording at 0.5 frames per second and time exposure of 800 ms. Images were taken at the center of the channel on the upper or lower capillary wall with an observation field of approximately 550 x 310 µm² (previous assays evidenced a homogeneous bacterial colonization throughout the capillary length as shown in Fig. S1). Bacteria were considered adhered if they were immobilized at the capillary wall defined by the focal plane of the microscope.

For the time-lapse processing, due to a GFP photo-bleaching of *S. oneidensis* for times exceeding 15 - 20 minutes, the observation zone was moved every 14 minutes to the next microscopic field in the direction of flow. This means that the time-lapse process consisted of successive videos of 14 minutes each, over a continuous period of 2 hours. Two types of image analysis were then carried out: one for the entire 2-hour period, using conventional manual counting of adhered bacteria, and the other for the first 14 minutes of the experiment, using deep learning. The following sections describe these approaches.

Image analysis by manual counting

Images captured over 2-hours were processed with ImageJ to enhance image contrast and brightness of the gfp-bacteria fluorescence. Adhered bacteria were manually counted on a panel of 85 representative images taken all along the 2 hours. The concentration at the capillary surface was determined by dividing the number of bacteria counted by the observation zone area ($1.7\ 10^{-3}$ cm²).

Deep learning detection and tracking algorithms and parameterisations

The detection of bacteria over the initial 14 minutes of experiments was achieved using YOLOv8, a state-of-the-art object detection neural network (Diwan *et al.*, 2023; Sohan *et al.*, 2024). YOLOv8 is a convolutional neural network that is specifically designed for object detection which means, in our study, predicting the bounding boxes around every individual bacterium. The following 3-steps process was used to finally obtained the position of each bacterium: label bacteria to build the training dataset, train the neural network model on the dataset and run the model for bacteria detection (inference).

The labelling step was done with the labelbox web-plateform software (Labelbox. Available online. https://labelbox.com). Labelbox is a data management and annotation platform used for developing and training machine learning models. Bacteria were framed on full resolution images (3,160 × 2,180 pixels) to build the dataset. To ensure that the "bacteria" class was representative, images were selected from different hydrodynamic conditions and at different colonization times. Due to the inherent variability in bacterial size, fluorescence intensity and noise level, we applied an iterative approach to enhance model detection performance by incorporating new image samples in the dataset. This iterative improvement was done by training YOLO on the new expand dataset starting from the previous weight configuration file and then detecting bacteria on the whole film database. This operation was repeated until that most of bacteria were detected and satisfactory metrics were obtained (see below). The final dataset was composed of 300 images and more than 30,000 labelled bacteria.

The second step was to train the model by using the smaller architecture size YOLOv8n (which define the number of trainable parameters). For memory management purposes (see below for the detection step) full resolution images were divided on 256 × 256 pixels crops associated with labels. The model has been pre-trained on the COCO database (Lin *et al.*, 2015), that fix the initial weights, and then finetuned on our labelled dataset. The training fold accounts for 80 % of the total dataset and 20 % for the validation fold. The training of YOLOv8 used the default parameter values as defined by ultralytics. It involves various data augmentation techniques to improve generalization of the trained network such as vertical flip, random translation, rotation, zoom, mixup…After some trials, the model was finetuned over 100 epochs with confidence c = 0.3 and an Intersection of Union IoU = 0.7. The confidence is the threshold on the predicted objectness and decides which predicted bounding boxes are kept for the final prediction. The IoU is used to merge overlapping bounding boxes in the Non-Maximum Suppression step of YOLOv8. The

implementation of ultralytics involves early stopping the validation loss to select the best model. The recall and precision metrics for the best model were respectively R = 0.78 and P = 0.78.

The detection (inference) step was performed using SAHI (Slicing Aided Hyper Inference) a tool devoted to improve small object detection and integrated with YOLOv8 (Akyon et al., 2022). Indeed, a medium GPU (Nvidia RTX 3000 with 6 GB memory) has not enough memory to process 1 full frame image (3,160 × 2,180 pixels) even with the smaller architecture YOLOv8n. YOLOv8 gives the possibility to downscale images before processing to reduce memory consumption which works fine for detecting quite large objects. However, in our experimental configuration, bacteria was too small to be downscale and lead to poor detection level. To overcome this problem, SAHI slices the trained objet detector over the full-sized images, performing inference on crops (256 × 256 sub-images) and then merges the predictions to obtain full-frame predictions. Bacterial detection using the trained model is illustrated in Fig. 2.

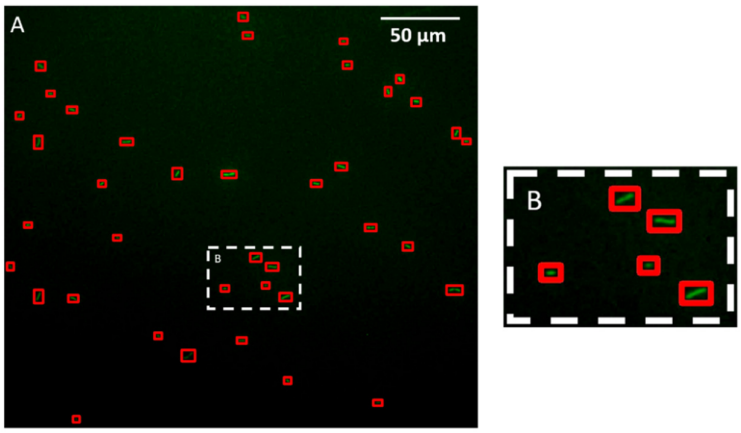


Fig. 2. A) Detection result obtained with the trained model used. It detects all adhered *S. oneidensis* gfp cells at the wall and frames them with a bounding box. B) corresponds to a zoomed section of image A.

Eventually, the individual dynamic of each bacterium was deduced from a tracking step which was performed by a Kalman filter. Such filter tracks bacteria along consecutives frames (Kim and Bang 2019) as shown in Movie 1 which is a representative example of bacteria tracking obtained at the wall.

Quantification of bacterial residence time and orientation at the wall

Detection and tracking obtained from the deep learning model and Kalman filter analysis enabled us to measure the wall residence time of each recorded bacterium that adhered to the wall during the acquisition period (14 min), i.e. the time that the bacterium remained at the wall, by subtracting the bacteria's arrival time at the wall from its departure time. Bacteria that did not leave the wall during the analysis period (less than 9 % of the total population), were assigned with a residence time equal to the final video time minus the bacteria arrival time. In addition, each bounding box detected during the acquisition period was post-processed to calculate the most likely wall orientation of the bacteria. An average wall angle, relative to the flow direction, was assigned to each tracked bacterium by averaging all the angle it took during its wall residence time. These two parameters were automatically determined using a MATLAB program for all bacteria detected at the wall in this study, over 20,300 bacteria.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using XLSTAT 2023-1.5 software (https://www.xlstat.com/fr). The Spearman correlation test was performed to assess the agreement between what the implemented neural network detects and conventional microscopic counting. The data sets between the upper and lower bacterial wall colonization levels for each shear rate tested were compared using the Mann-Whitney test, a non-parametric test of the null hypothesis that two independent samples came from the same population. The Kruskal-Wallis test, a non-parametric test of the null hypothesis that all samples were from the same population, was performed to assess whether shear rates had an effect on both the upper bacterial wall colonization and bacterial wall residence time. Data sets were considered significantly different if the p-value was below 0.05.

Results

S. oneidensis inoculum characteristics in the microfluidic system

The bacterial inoculum at the beginning of the adhesion experiment contained an average of 4.6×10^7 bacterial cells/mL (Table 2), among which approximately 98% are non-permeable to propidium iodide (Table S1) and 8 % were culturable. Despite a slight non-significant (p = 0.060) improvement in culturability at T_{2h}, no significant increase (p = 0.296) of the total bacterial biomass quantified by flow cytometry is observed, indicating no measurable planktonic bacterial growth in the experimental system along the 2 hours of adhesion-step. This also suggests that the bacterial colonization of the capillary wall, is driven primarily by bacterial attachment and not by *S. oneidensis* growth in the planktonic phase.

Table 2. Bacterial inoculum characteristics: number of total bacteria (cells/mL) and culturable bacteria (CFU/mL, 48h à 30°C) in the feeding medium (planktonic form) at the beginning (t = 0h) and the end of the bacterial adhesion's phase (t = 2h). All the data represent mean and standard error from 18 independent experiments.

Time (h)	Total bacterial cell (cells/mL)	Culturable bacterial cell (CFU/mL)
0	$4.6 \times 10^7 \pm 2.5 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
2	$4.2 \times 10^7 \pm 2.5 \times 10^6$	$5.5 \times 10^6 \pm 6.0 \times 10^5$

Bacterial wall transfer mechanisms relative to shear rates

Values of flow rates and associated hydrodynamic parameters are presented in Table 1. Three passive mechanisms can be considered to explain bacteria mass transfer from the bulk liquid environment to the wall (Berne *et al.*, 2018; Carniello *et al.*, 2018): convection (governed by liquid flow velocity), sedimentation (governed by gravity) or diffusion (governed by thermal motion).

Characteristic times associated with these mechanisms were estimated for each of them. The hydrodynamic residence time $T_r = L/u$, linked to convection, is the time it takes for bacteria to cross the

length of the capillary *L* at the average velocity *u*. The bacteria sedimentation time $T_S = h/(2V_S)$, with V_s the bacterial sedimentation velocity, is the time it takes for bacteria to reach the wall due to gravity considering a characteristic distance to travel equal to half the capillary height *h/2.* The sedimentation velocity was estimated through the stokes law $V_S = 2R^2 g\Delta\rho/9\eta \approx 2.10^{-7}$ m/s considering bacteria density close to 1088 kg/m^3 and a size $R \approx 1$ µm (Wan *et al.*, 1995). In the same way, the diffusion time is defined as $T_d = (h/2)^2/6D$, the characteristic time needed for bacteria to reach a wall by Brownian motion with *D* the bacterial diffusion coefficient in water estimated as 2.10^{-13} m²/s by the Stokes-Einstein law $D = kT/6\pi\eta R$ (Berg, 1993; Busscher and Van Der Mei, 2006).

The ratios between these different times provide a means of comparing the relative contribution of each of these transfer mechanisms, depending on hydrodynamics. Except for static condition, for all shear rate tested, diffusion could be neglected as the diffusion time was at least 17 times greater than hydrodynamic residence or sedimentation times. A comparison of hydrodynamic residence time and the sedimentation time revealed that for high shear rate (as soon as $\dot{\gamma}_w \geq 125$ s^{-1}) convection was the main mechanism responsible of bacterial wall transfer as sedimentation time was at least 21 times greater than hydrodynamic residence time. One the contrary, at low shear rate, sedimentation time and convection time were of the same order of magnitude (the difference is less than a factor 2 for shear rates below 13 s^{-1}). Therefore, for weak hydrodynamics, gravitational sedimentation has to be considered in such confined system. To experimentally evaluate the contribution of such a mechanism to bacterial transport and wall deposition under shear rates, we compared the top and bottom colonization obtained after 2 hours in our experimental device obtained (Fig. 3).

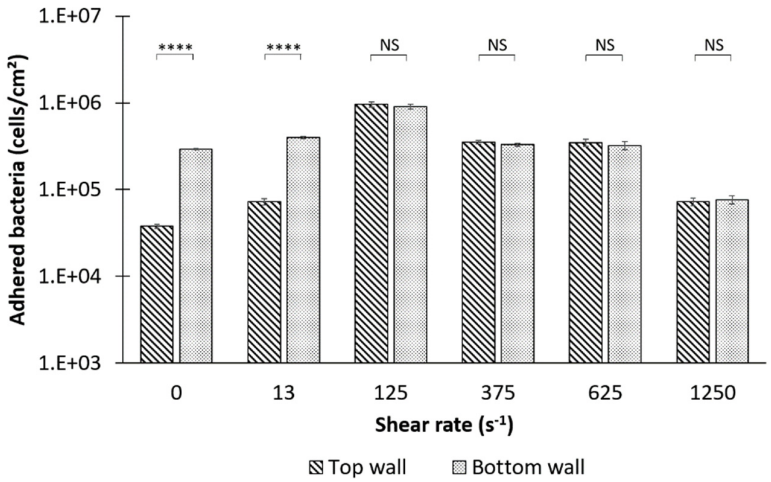


Fig. 3. Concentration of adhered *S. oneidensis* at the top and bottom wall of the capillary according to shear rates after 2h colonization. For each shear rate, histograms represent mean and standard error for 30 independent values per shear rate and per wall condition. (NS = not statistically significant, **** = p value < 0.0001).

Once it was confirmed that the capillary surface was uniformly colonized throughout its entire length (Fig. S1), the results demonstrated that there was no significant difference in the top and bottom colonization for shear rates greater than 125 s^{-1} (respective p-values of 0.406 for $\dot{\gamma}_w = 125$ s^{-1}, 0.398 for $\dot{\gamma}_w = 375$ s^{-1}, 0.449 for $\dot{\gamma}_w = 625$ s^{-1} and 0.767 for $\dot{\gamma}_w = 1{,}250$ s^{-1}). This indicate that the colonization observed was independent of sedimentation. However, in the absence of shear forces and for the lowest shear rate (13 s^{-1}), the concentration of adhered bacteria was significantly impacted by sedimentation, with over 87 % of the bottom wall colonization attributable to this wall transfer mechanism (Fig. 3). As observed experimentally and subsequently confirmed in more theoretical terms, the wall transfer of bacteria in our one-pore confined system is dependent on the shear rates and can be attributed to either convection or sedimentation. Bacterial motility may also be involved, as observed previously (McClaine and Ford 2002; Secchi *et al*., 2020; Zheng *et al*., 2021). *Shewanella oneidensis MR-1* is known to carry a set of genes for the expression of a single unsheathed polar flagellum (Paulick *et al*., 2009; Yang and Chen 2020), giving it the ability to move in its environment when it is expressed. Such expression is highly regulated (Wu *et al.*, 2011) and environmental factor dependent (Stricker *et al*., 2020; Paksanont *et al*., 2018; Arora *et al*., 2007; Mitchell and Kogure 2006; Nishiyama and Sowa 2012; Armitano *et al.,* 2013). In our case, motility measurements done in static condition (data not shown) indicate that approximately 10 % of the bacterial inoculum was motile at the beginning of the experiment. However, under shear rates, motility transfer at the wall is evidenced to be low or even negligible compared to convection transfer. Indeed, the swimming speed of *Shewanella oneidensis*, between 25 and 60 µm/s (Stricker *et al*., 2020; Sun *et al.*, 2013), is 1 to 3 orders of magnitude less important than the capillary average fluid velocity, which is between 42×10^1 and 42×10^3 µm/s depending on the experiments (Table 1). A deeper analysis of the balance between motility and the shear flow can be found in supplementary data S1 and confirmed that motility was not predominant in this study.

The remainder of this study will exclusively focus on the top wall bacterial colonization, where solely convection occurred. Fig. 3 also illustrates that shear rate influences the level of bacterial colonization, a finding that will be analyzed and discussed in greater detail in the subsequent section.

Effect of shear rate on the early colonization kinetics of S. oneidensis

Bacterial colonization kinetics are obtained using time-lapse images and manual counting (Fig. 4). A two-phase colonization is observed with a first phase of fast bacterial deposition, followed by a slowdown phase suggesting that bacteria absorption and desorption events balance each other (Busscher and Van Der Mei, 2006; Carniello *et al*., 2018). Indeed, in all conditions tested, the concentration of bacteria adhering increased with time and their pseudo-plateau values were significantly dependent on the shear rates ($p < 0.0001$). In particular, a higher level of colonization was obtained at a shear rate of 125 s^{-1} (10^6 cells/cm² after 2 hours), corresponding to 9 % of wall coverage (Fig. S2). In contrast, the lowest levels of colonization are obtained at the lowest (0 and 13 s^{-1}) and highest (1,250 s^{-1}) shear rates tested, where the concentration

of adhered bacteria is about 13 times lower and represents less than 2 % of top wall coverage (Fig. S2). Representative images of the colonization evolution of the upper surface over 2 hours for $\dot{\gamma}_w = 125$ s^{-1} and $\dot{\gamma}_w = 1{,}250$ s^{-1} are shown in Fig. S3.

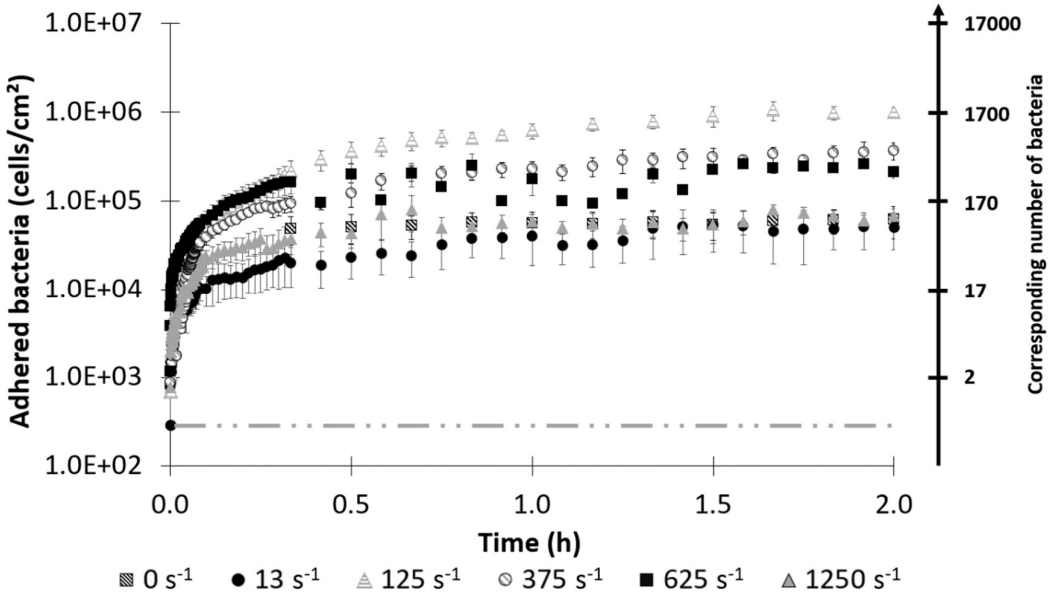


Fig. 4. Temporal evolution of pioneer adhered *S. oneidensis* (cells/cm²) at the capillary upper wall for different shear rate as a function of time. Left axis: adhered bacteria surface concentration. Right axis: equivalent number of bacteria detected within the microscopic observation zone. Each point is the mean of three independent experiments. Error bars represent the standard error. The dotted line indicates the detection limit (1 bacterium in the observation zone).

In addition, initial colonization rates varied non-linearly with the applied shear rate, i.e. the rate and the level of colonization are not associated with greater hydrodynamic stress (Fig. S4). To our knowledge, few studies have measured initial colonization rates over such short adhesion times (Alves *et al*., 2020; Korber *et al*., 1989; Nejadnik *et al*., 2008). They obtained similar findings, although the strains, hydrodynamic conditions and surfaces to colonize were different. Besides, except for $\dot{\gamma}_w = 125$ s^{-1}, a higher colonization rate is observed during the 20 - 30 first minutes of colonization, between 10^3 and 10^4 cells.cm^{-2}.min^{-1}, followed by a slowing down of the colonization rates (reduction factor from 2 to 13 depending on the shear rates), leading to a pseudo-plateau. Several hypotheses could explain such a slowdown rate. Firstly, as the colonizable surface that bacteria encounter evolved over time, from a “blank” surface at the beginning to a progressively colonized surface, the interaction sites available at our pre-conditioned glass surface became saturated gradually as bacteria deposited. However, this possible explanation is not consistent with our data showing a low level of coverage (10 % at best; Fig. S2). Besides, when bacteria reached the wall, they may have collided with bacteria already adhered, which may have helped or prevented them from attaching to the wall and led to the detachment of initially attached bacteria (Meinders *et al*., 1995; Kim and Klapperich 2010). Second, one bacterium already attached could also interfered with the adhesion of another due to hydrodynamic blocking (Rijnaarts *et al*. 1996; Ko and Elimelech 2000). This phenomenon

considers that adhered bacteria exhibited a “blocking area”, corresponding to a “shadow zone” around them that may prevent further bacteria from arriving and attaching in this area. Ko and Elimelech (2000) proposed that this area was determined by the combined effect of hydrodynamic interaction: the shear component of the fluid flow around adhered particles, and electrostatic repulsion between the adhered and incoming bacteria. Already studied in the case of colloidal particles (Ko and Elimelech 2000; Adamczyk *et al.*, 1994) and bacteria cells (Camesano and Logan 1998; Ko and Elimelech 2000; Busscher and Van Der Mei 2006; Lu *et al.*, 2013), it has been demonstrated that the size of this blocking area depends on the ionic strength of the media, the surface (charge, hydrophobicity) and cell properties (size, surface appendages), but also and more interesting in our case, to increase with the shear rate. This phenomenon has been described as contributing to the limitation of bacterial colonization and the establishment of a pseudo-plateau, leading to very low coverage rates (close to 10%) (Carniello *et al.*, 2018).

Most importantly, our results indicate the absence of a linear relationship between shear rate and pioneer colonization, as we obtained a notably bell-shaped profile between shear rates and the bacterial concentrations at 2 hours (Fig. 3). Thus, increasing shear initially improved bacterial colonization and its rate (Fig. 4 and S4) until an optimum shear was reached (in our case close to $\dot{\gamma}_w = 125\ s^{-1}$), beyond which increasing shear had the opposite effect. Such bell-shaped profile has already been observed (Bakker *et al.*, 2002; Boks *et al.*, 2008a; Chang *et al.*, 2020; Lecuyer *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2011). Indeed, Busscher and Van Der Mei (2006) and Park *et al.* (2011) showed that increasing shear rate improved bacterial transport, leading to an increased probability of collision of bacteria with the wall. Above an optimal threshold, the shear rate led to an increased probability of bacteria detachment from the wall, because shear became stronger than the interaction forces that bacteria could have developed with the wall.

Validation of the deep learning analysis

Prior to implementation, a validation step to ascertain the effectiveness of what is detected by the neural system compared to conventional microscopic counting was conducted. Fig. 5 (a, b, c, d, e, f) illustrates the representative colonization kinetics at the capillary wall obtained through both manual counting and deep learning detection under varying different shear rate conditions.

There is a strong correlation between the results obtained from these two enumeration methods, irrespective of the shear rate under consideration or the level of colonization attained. Therefore, both manual counting and deep learning model detection of bacteria yielded comparable outcomes as observed in Fig. 5(g) ($R^2 = 0.969$; Spearman correlation test p-value < 0.0001). The discrepancy between these two methods, regardless of colonization time, assay and shear rate, exhibited a total error percentage of 6% and an average absolute difference of 5 bacteria (with a standard deviation of ± 0.3). This validates the use of the YOLO model for the detection of the initial stages of bacterial adhesion to the capillary wall.

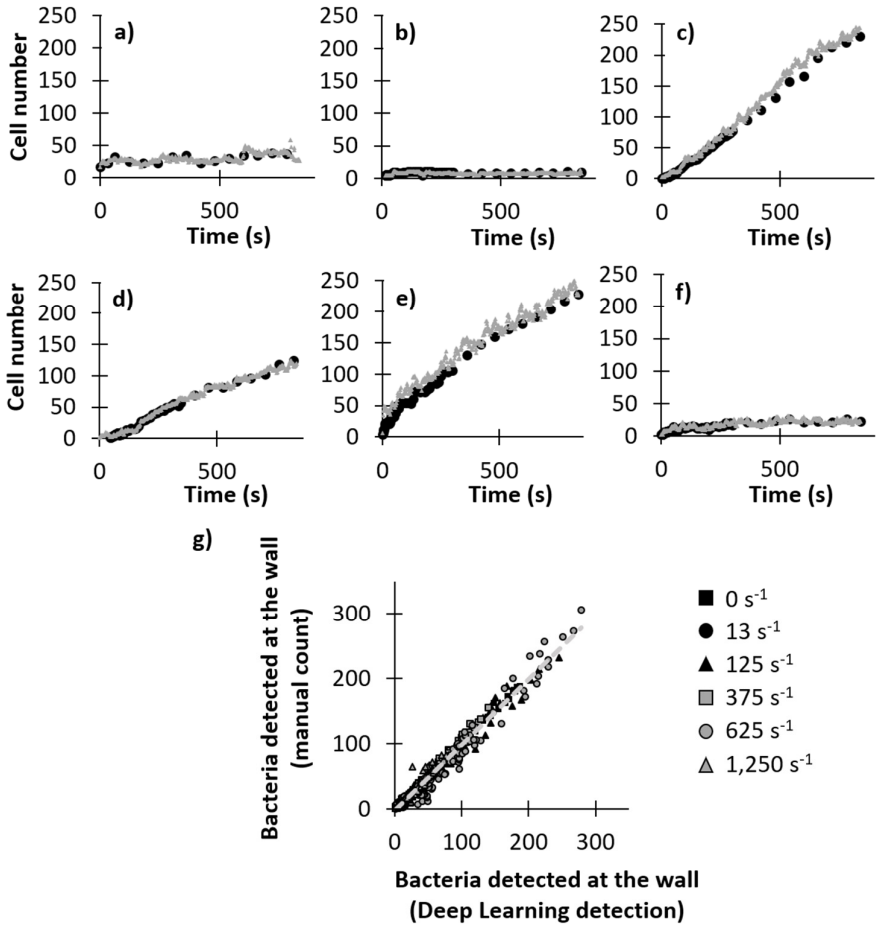


Fig. 5. Graph (a), (b), (c), (d), (e) and (f) are representative examples of wall colonization kinetics by GFP-tagged *Shewanella oneidensis* MR-1 for the different shear rates tested (a = 0 s^{-1}, b = 13 s^{-1} , c = 125 s^{-1}, d = 375 s^{-1}, e = 625 s^{-1}, f = 1250 s^{-1}): bacteria detected by manual counting (black circle) and bacteria detected by deep-learning detection (grey triangle). (g) Correlation between the number of bacteria detected either by manual counting or by the deep learning model for all the tests and shear rates tested. The data set comprises 706 images with nearly 28,000 detected bacteria.

Bacterial residence time at the wall

Among the criteria accessible by deep learning approach, the dynamic of each adhered bacterium, particularly their residence times at the wall were determined (Fig. 6). Two distinct bacterial wall behaviors are identified, a dynamic behavior with a very short residence time and a sedentary behavior with longer adhered times. Approximately 9 % of the total adhered bacteria remained at the wall for the entirety of the 14 initial minutes. Such sedentary was predominantly observed at shear rates of 125 s^{-1} and 375 s^{-1} (Fig. 6) with over 10 % of the bacteria exhibiting a residence time on the wall exceeding 5 minutes. This is in line with the colonization kinetics as presented in Fig. 4. This approach represents a significant advancement in the quantification of bacteria adhesion dynamics, particularly at the early stages of biofilm formation, and highlights the pivotal role of fluid mechanics in this process. Indeed, in contrast to previous shear rates, the lowest and highest shear rates tested (i.e. 0. 13 s^{-1} and 1,250 s^{-1}) presented a 10-fold reduction in the concentration of sedentary bacteria (> 5 min) on the wall.

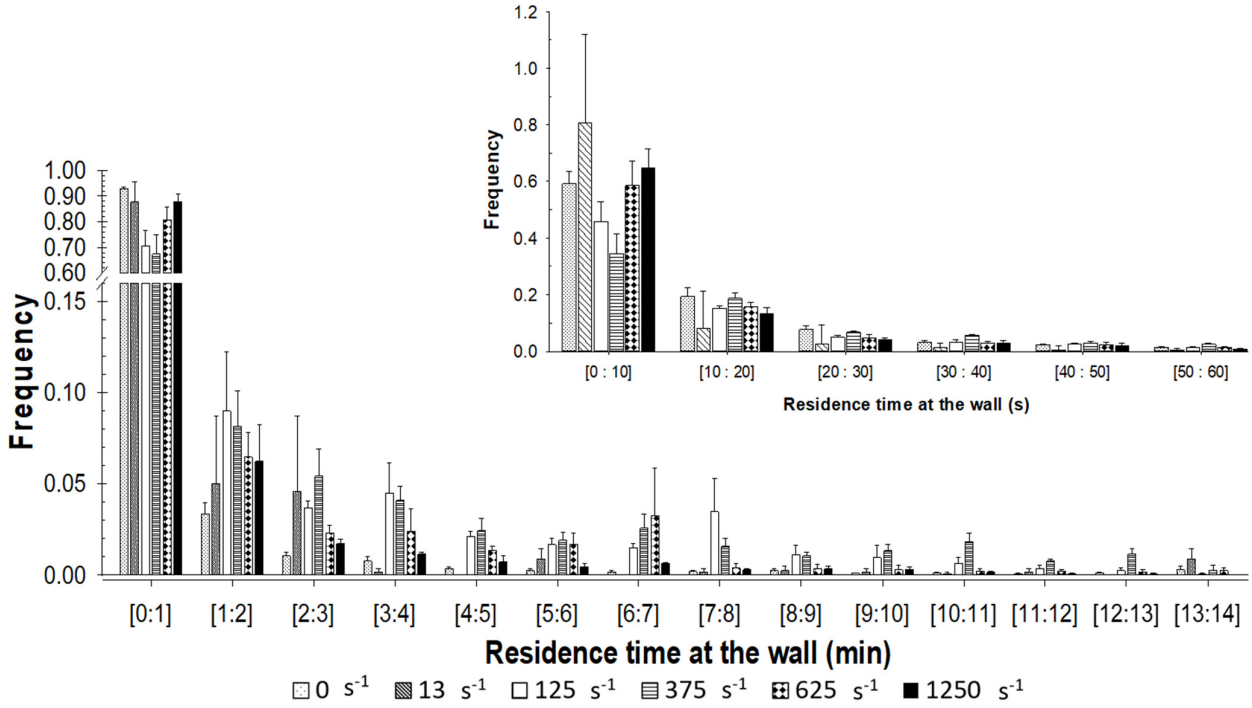


Fig. 6. Distribution of the residence times of *S. oneidensis* at the top wall as a function of shear rate during the initial 14 min of experiment. The number of total bacteria analyzed was n_{total} = 20,344 (with n = 6,053 for $\dot{\gamma}_w$ = 0 s^{-1}; n = 674 for $\dot{\gamma}_w$ = 13 s^{-1}; n = 3,182 for $\dot{\gamma}_w$ = 125 s^{-1}; n = 1,801 for $\dot{\gamma}_w$ = 375 s^{-1}; n = 6,151 for $\dot{\gamma}_w$ = 625 s^{-1}; n = 2,483 for $\dot{\gamma}_w$ = 1,250 s^{-1}). Insert zoom on the residence time distribution of adhered bacteria remaining less than 60 seconds at the wall. Data were obtained from 3 independent experiments per shear rate (except for 13 s^{-1}; N = 2).

In contrast, a dynamic exchange of bacteria at the wall was also observed, irrespective of the shear rate applied. Indeed, over 70 % of the pioneering bacterial population remained on the wall for less than a minute, with 72 % (± 5 %) of them remaining for less than 20 seconds (Fig. 6 insert). However colonization ultimately occurred (Fig. 4), thereby confirming that the equilibrium between transfer-induced adhesion and detachment consistently favored successful attachment.

The probability of bacterial collision efficiency is known to be controlled by on one hand the bacteria-surface interactions, i.e. the force-sensitive adhesion/detachment mechanisms (Meinders *et al*., 1992; 1995; Vadillo-Rodríguez *et al*., 2004; Busscher and Van Der Mei 2006; Boks *et al*., 2008a) and on the other hand the blocking of available adhesion sites due to the amount of previously adhered bacteria (Carniello *et al*., 2018; Rijnaarts *et al*., 1996). The physicochemical basis of adhesion mechanisms demonstrates that the strength of interactions between bacteria and a substratum was increased with bacteria wall residence time. Consequently, longer residence time of bacteria led to stronger interaction forces, making it more challenging for them to dislodge from the surface (Boks *et al*., 2008a; Vadillo-Rodríguez *et al*., 2004; Xu *et al*., 2005). The process of "bond aging maturation" occurred rapidly, in an exponential manner over time within seconds to minutes after initial contact, as previously shown. For example, the interaction forces between bacteria and the wall were observed to increase by a factor of two on average after 200 seconds

of contact (Vadillo-Rodríguez *et al.*, 2004). Alternatively, the probability of bacterial detachment was found to be decreased by a factor of 100 to 1000 after one minute of contact with the wall (Boks *et al*., 2008a). The hypothesis that the strengthening of bond adhesion after initial contact can be governed by the rearrangement of bacterial cell surfaces (such as the unfolding of cell surface structures) has been proposed by Olsson *et al*. (2010) and Berne *et al*. (2018). Additionally, the removal of bacteria and surface interfacial water facilitating the increase in the number of contact points and enhancing hydrophobic interactions, as well as the repositioning of the bacterial cell body, and the production of adhesins have been identified as potential mechanisms for this strengthening of bond adhesion (Berne *et al*., 2018; Carniello *et al*., 2018; Cooley *et al.*, 2013; DeBenedictis *et al.*, 2016).

Average residence times of pioneer bacteria on the capillary wall are comprised between a range of 25 to 95 seconds, depending on the shear rates (with significant difference between shears: p value < 0.001) and show a bell curve profile (Fig. 7) with a wall residence time from 2 to 4 longer for 375 s^{-1} and the 125 s^{-1} compared to the other shears.

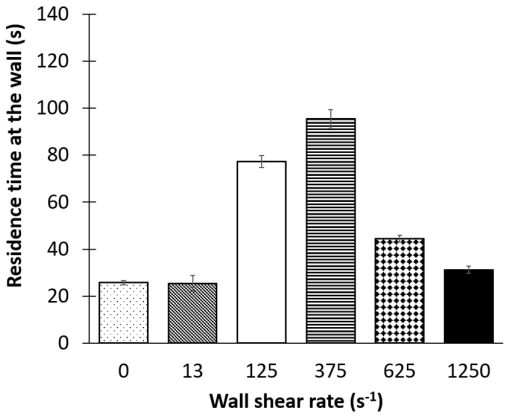


Fig. 7. Mean residence times of adhered *S. oneidensis* at the capillary top wall during the very first 14 min of experiment as a function of shear rate applied. Histograms represent the mean of 3 independent experiments by shear rate and error bars correspond to the standard error (except for 13 s^{-1}; N = 2). The total bacteria number analyzed was n_{total} = 20,344 (with n = 6,053 for $\dot{\gamma}_w$ = 0 s^{-1}; n = 674 for $\dot{\gamma}_w$ = 13 s^{-1}; n = 3,182 for $\dot{\gamma}_w$ = 125 s^{-1}; n = 1,801 for $\dot{\gamma}_w$ = 375 s^{-1}; n = 6,151 for $\dot{\gamma}_w$ = 625 s^{-1}; n = 2,483 for $\dot{\gamma}_w$ = 1,250 s^{-1}).

To our knowledge, only one study has investigated the influence of shear rate on the wall residence time of pioneer bacteria (Lecuyer *et al*., 2011). Although working with different experimental conditions (system, strain), their study yielded comparable insights to ours, namely a relatively low average wall residence time (between 2 and 40 seconds) and a bell curve profile with an intermediate shear wall existence (close to 3,000 s^{-1}) that maximized the bacterial residence time at the wall. Several hypotheses can be proposed to explain these observations. For shear rates between 0 and 375 s^{-1}, where bacterial residence time is enhanced with increasing shear rate, it can be postulated that the interaction forces developed between bacteria and the wall were similarly improved with increasing shear rate, allowing for better anchoring to the surface, resulting in longer residence times. Such strategy suggests that bacteria are capable of sensing

mechanical stress and modulating their cellular activity in response, thereby allowing them to adhere more strongly and to remain at the wall (Dufrêne and Persat 2020). This shear adaptation mechanism has been described for several bacterial strains, including *E. coli* (Thomas *et al*., 2002), *S. aureus* (Procopio Evagrio George *et al*., 2006), *P. aeruginosa* (Rodesney *et al*., 2017) where the regulatory mechanisms involved included the production of di-GMPc (Rodesney *et al*., 2017) and adhesines (Berne *et al*., 2018) or even the "fro" ("flow-responsive") operon recently discovered by Sanfilippo *et al*. (2019). Beyond this shear optimum, we observed that further increases in shear rates have the opposite effect on bacterial colonization (Fig. 7) revealing that the shear is too high for the bacteria to withstand and adapt to, leading to high bacterial detachment (Bakker *et al.*, 2002; Boks *et al*., 2008a; Chang *et al*., 2020; Lecuyer *et al*., 2011; Park *et al*., 2011). Moreover, given that wall transfer is enhanced at high shear rates (i.e. 1250 s^{-1}), we can hypothesize that the number of collisions between newly transferred bacteria and those already adhered could also be greater, which could explain the stronger exchange dynamics observed at the wall, with a large number of bacteria reaching the wall, but rapidly dislodged by the following ones arriving at the wall.

Bacterial orientation at the wall

Given that flow is ubiquitous and that the spatial distribution of adhered bacteria is a crucial factor in the structuration of nascent biofilms (Santore, 2022; Secchi *et al*., 2020), we are interested in the orientation adopted by bacteria at the wall in the presence of hydrodynamic constraints (Fig. 8). To achieve this, a mean wall angle was assigned to each bacterium by averaging all the angles taken by the bacteria at the wall during its entire residence time. Most pioneer adhered bacteria were aligned similar or very close to the direction of flow [0°; 20°]: 45 % under static condition and more than 61 % when flows were applied, with a maximum (79 %) reached at the highest shear rate. As the shear rate is increased, frequencies dropped drastically, so that the [80°; 90°] class was weakly represented (3.1 % ± 0.5 under flow flux and 9.5 % under static condition) (Fig. 8). We also noted that the fractions of bacteria with an average angle greater than 40° decreased as the shear rate increased in such a way that only 7.9 % of the bacteria oriented themselves at an angle greater than 40° to the flow at $\dot{\gamma}_w = 1{,}250\ s^{-1}$ shear rates, whereas for the other shear rates tested (excluding the static condition), this fraction represents 18.4 % (± 2.3).

Already observed, but in a qualitative way (Li *et al.*, 2011b; Saur *et al*., 2017; Young, 2006), our study provides a robust quantification (more than 20,344 bacteria analyzed) of the orientation of adhered bacteria, revealing in particular that under flow, bacteria tend to orient themselves mainly in the same direction as the flow. An earlier study (Korber *et al*., 1990) on a sample of around 1,000 bacteria showed the same trend. They hypothesized that the orientation of the bacteria at the wall could limit their surface area in contact with flow, thereby minimizing the mechanical stress to which the bacteria are exposed. Whether this orientation at the wall is the result of the bacteria maintaining the orientation they took in the flow (for the same reasons as above), or a reorientation of the bacteria after adhesion, remains an open

question. This could be achievable by 3D imaging as for instance holographic microscopy, an emerging imaging technique (Kim and Lee 2024) that allows instantaneous sampling of 3D volume and has already proven its worth for bulk bacterial tracking, motility and trajectories characterization (Vater *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2020a). To gain a more detailed understanding of what is happening at the wall, the distribution of mean angles is compared with the distribution of initial and final angles for each shear rate (Fig. S5). Results show no statistically significant differences between the distribution of initial and final angles. On the other hand, except for $\dot{\gamma}_w$ = 13 s^{-1}, the distribution of the mean angle is statistically weaker (on average 4° less) than that of the initial and final angles. This may mean a slight reorientation of the bacteria at the wall during their wall residence time, and perhaps the existence of a slight imbalance that occurs just before bacterial detachment, which reorients the bacteria at an angle (similar to that of attachment), leading to their detachment. But this is very speculative.

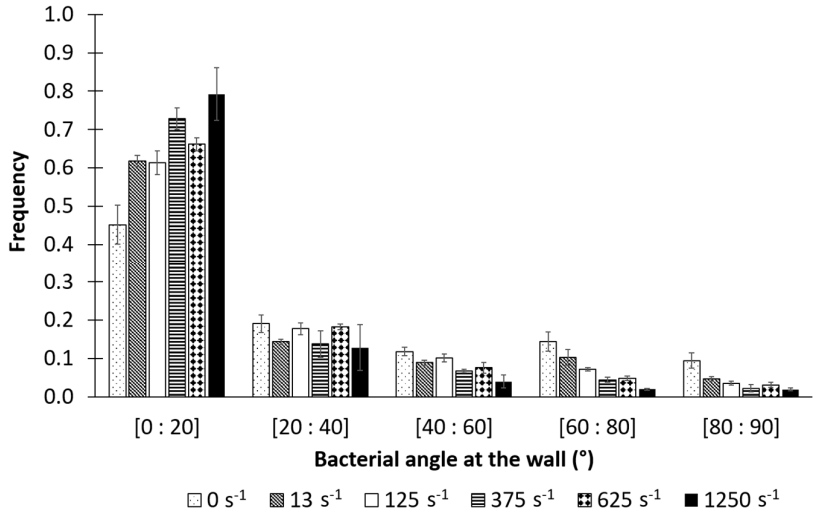


Fig. 8. Orientation of adhered *S. oneidensis* relative to the flow direction (i.e. 0° when bacteria aligned to the flow) during the first 14 min of experiment and according to shear rate. The number of bacteria analysed according to shear were n = 6,053 for $\dot{\gamma}_w$ = 0 s^{-1}; n = 674 for $\dot{\gamma}_w$ = 13 s^{-1}; n = 3,182 for $\dot{\gamma}_w$ = 125 s^{-1} ; n = 1,801 for $\dot{\gamma}_w$ = 375 s^{-1}; n = 6,151 for $\dot{\gamma}_w$ = 625 s^{-1}; n = 2,483 for $\dot{\gamma}_w$ = 1,250 s^{-1} (n_{total} = 20,344 bacteria. Data were obtained from 3 independent experiments per shear rate (except for 13 s^{-1}; N = 2).

Conclusion

The influence of shear rate on the dynamic of pioneer bacteria was studied through standard and deep learning approaches. A global analysis of the population based on time-lapse imaging and manual counting revealed the existence of two distinct phases in the colonization kinetics of pioneering *S. oneidensis* bacteria. Our findings suggest that the level and the rate of colonization were not inherently correlated with increases in hydrodynamic stress. Moreover, in our experimental capillary model, the mechanical mechanisms governing the bacterial wall transfer were dependent on the shear rates. Convection was identified as the primary mechanism at high shear rates. In contrast at low shear rates, sedimentation can occur in such confined system and balance convection, leading to a more heterogeneous colonization.

At the individual scale, the innovative implementation of a deep-learning method offers a significant added value, as it enables the detection and tracking at the wall of each individual pioneer bacterium (>20,300 bacteria), thus enabling the determination of each adhered bacteria's fate. This approach facilitated a comprehensive evaluation of the dynamics of just adhered bacteria, as well as the quantification of associate parameters such as the residence time of bacteria at the wall and their orientation as a function of shear rates. Our findings demonstrated that the adhered bacteria exhibited both dynamic and sedentary behaviors at the wall. Notably, over 70 % of the bacteria remained at the wall for less than a minute. The mean bacterial residence time ranged from 25 to 95 seconds, depending on the shears. Furthermore, the impact of shear rates on bacterial residence time yielded a bell-shaped curve, indicating the existence of a critical shear rate that enhances bacterial residence time. This finding highlights the dual impact of wall shear rates on bacterial colonization. Furthermore, our findings revealed that over 60 % of the bacteria subjected to hydrodynamic forces exhibited a parallel orientation to the flow. Such deep learning approach also provides a means of more robustly characterizing the bacterial absorption/desorption dynamics at the wall, which can be valuable for developing quantitative models of bacterial adhesion and testing transfer mechanisms.

CRediT authorship contribution statement

Lucie Klopffer: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing
Nicolas Louvet: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Software, Supervision, Validation, Writing – review and editing
Simon Becker: Data curation, Software, Writing – review and editing
Jérémy Fix: Data curation, Software, Writing – review and editing
Cédric Pradalier: Data curation, Methodology, Software, Writing – review and editing
Laurence Mathieu: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency through the 'BIOCIDES' project (ANR-21-CE50-0027). Nicolas Louvet would like to thank the EMPP research department, Energy, Mechanics, Processes & Products of the University of Lorraine for its funding.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100240.

Data availability: Data will be made available on request.

References: The references used in this article are included in the reference list for the entire document.

Appendix A. Supplementary data

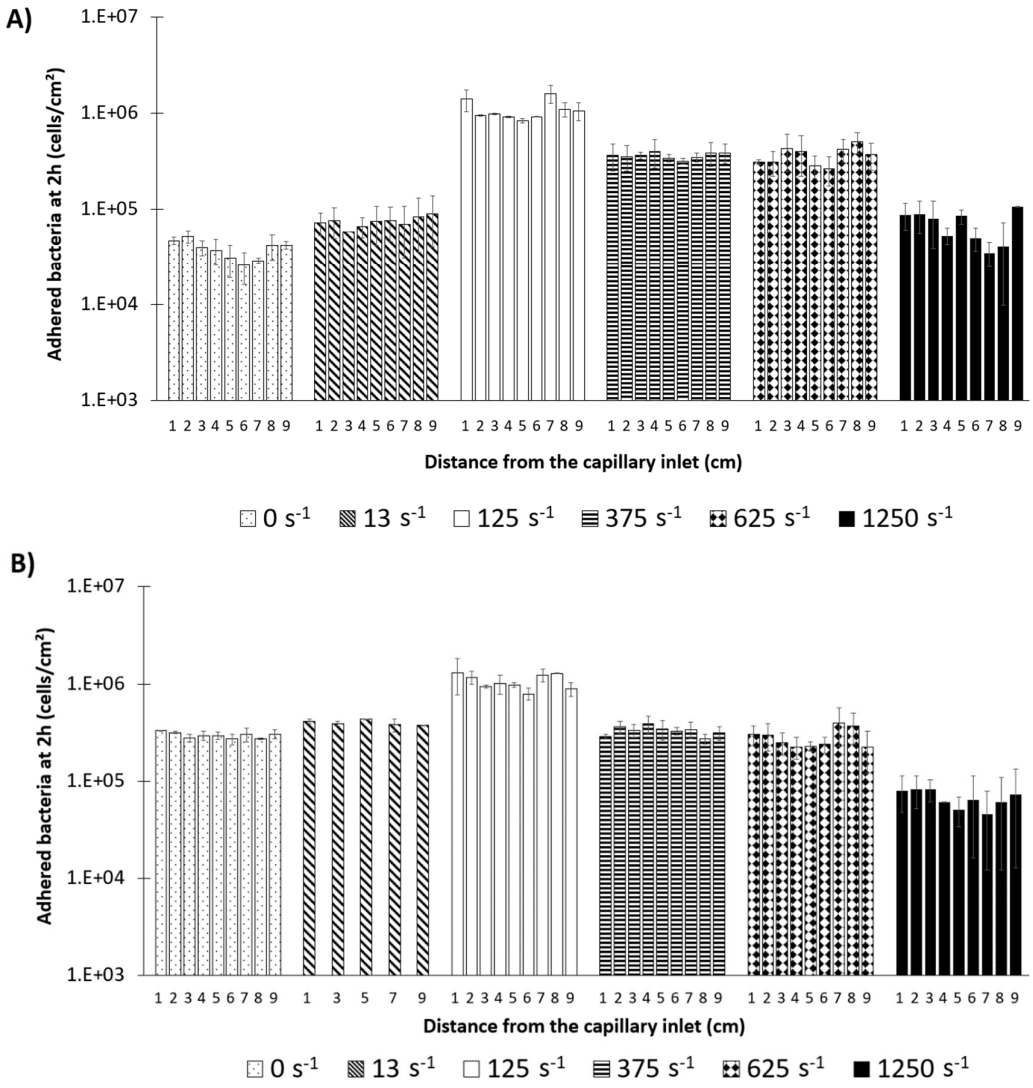


Fig. S1. Adhered bacterial cells at the upper (A) and lower (B) capillary wall at different distances (9 distances 1 cm apart) from the capillary inlet after 2 h of colonization and for different shear rates. For each shear rate, histograms represent mean and standard error for 3 independent experiments.

Table S1. Bacterial inoculum characteristics: number of total, damaged membrane and culturable bacterial cells in the feeding medium (planktonic form) at the beginning (t = 0h) and at the end of the bacterial adhesion's phase (t = 2h). All the data represent mean and standard error from 5 independent experiments.

Time(h)	Total biomass (cells/mL)	Membrane damaged bacteria (PI^+) (cells/mL)	Percentage of bacteria PI^+ (%)	Culturable bacterial cell (CFU/mL)	Percentage of culturable bacteria (%)
0	$4.8 \times 10^7 \pm 4.5 \times 10^6$	$9.7 \times 10^5 \pm 3.8 \times 10^5$	2.0 ± 0.6	$3.3 \times 10^6 \pm 7.3 \times 10^5$	9.0 ± 0.7
2	$3.4 \times 10^7 \pm 5.2 \times 10^6$	$2.8 \times 10^5 \pm 8.2 \times 10^4$	1.0 ± 0.3	$3.4 \times 10^6 \pm 9.5 \times 10^5$	7.1 ± 1.8

For culturability, 10 µL from multiple 10-fold dilutions of the bacterial suspension were plated on $LB_{1/10}$ agar media and after incubation of 2 days at 30°C, the number of colonies were counted and results expressed as CFU per milliliter.

For total bacteria and damaged membrane bacteria counting, the GFP-Shewanella strain was stained with a propidium iodide solution (PI, B34954, Invitrogen, 20 µM final concentration) for 15 minutes in the dark. The quantification of both total and damaged biomass was conducted using the BD Accuri C6 Plus flow cytometer (BD Biosciences, USA), which was equipped with a blue laser at 488 nm. Ultrapure water (OTEC Aguettant, France) was utilized as the sheath fluid, and all data were acquired over a two-minute period at a flow rate of 35 µL/min. The total biomass, which corresponded to the GFP-tagged bacteria, was detected using the FL1 detector, with a wavelength of 533 nm ± 30. The damaged-membrane bacteria were determined using the FL2 detector (585 nm ± 40). The events were triggered on the forward scatter (FSC) parameter with a threshold of 2500 and on the FL1 detector with a threshold of 700 for total biomass. The data were analyzed using the BD Accuri™ C6 software (BD Biosciences).

In average, the cultivable fraction represented approximately 10 % of the total biomass, while the proportion of damaged membranes fell below 2 %.

Supplementary data S1

In order to differentiate motility effect from the fluid convection as a mechanism to reach the wall, we compare the characteristic time-scale for a bacterium to be align by the shear ('t_{shear}') with the characteristic time for a bacterium to swim across the channel height ('t_{swim}').

The time-scale t_{shear} is evaluated as the inverse of the wall shear rate : $t_{shear} \approx 1/\dot{\gamma}_w$. Assuming that a bacterium swims at a constant velocity V_0, the time t_{swim} is evaluated as $t_{swim} \approx h/(2 * V_0)$ with h the channel height.

The ratio between these two time-scales leads to $\frac{t_{swim}}{t_{shear}} = \frac{\dot{\gamma}_w * h}{2 * V_0} \approx 30$ with $\dot{\gamma}_w$ = 13s^{-1} for the lower flow rate, and assuming an average bacterium velocity $V_0 \approx$ 40 µm/s and h = 200 µm. It means that a bacterium aligns with the flow much faster than it can cross the streamlines.

In this analysis we have neglected the rotational diffusion coefficient of the bacterium that models the tumble dynamic. From visual inspection of our *Shewanella oneidensis* strain we assume that it behaves like a smooth swimmer and is able to swim with a persistent length much larger than ten times its body size. This is coherent with a value of the rotational diffusion coefficient $Dr \approx$ 0.5 - 1 rad²/s. We can also compare the rotational diffusion time with t_{shear} which is nothing less than the Peclet number $Pe = \dot{\gamma}_w / Dr$. Again for the lower shear rate we evaluate the Peclet number around 10 meaning that rotational diffusion can be neglected. In fact, for low ratio t_{swim}/t_{shear}, bacterial motility does indeed improve the transfer of bacteria to the wall and consequently the efficiency of bacterial adhesion, as shown in several studies that investigated bacterial motility as a means of accessing the wall (Korber *et al*., 1989; Kaya and Koser 2012; McClaine and Ford 2002; Secchi *et al*., 2022; Zheng *et al*., 2021; Ezhilan and Saintillan 2015).

However, with increasing flow and shear rate, these studies also showed that the resulting colonization becomes similar in the presence of motile and non-motile populations, suggesting that transfer to the wall by motility becomes insignificant. Some studies go even further (Molaei and Sheng 2016; Yang *et al*., 2023) and hypothesize that bacterial motility is inhibited at high shear rates due to the shear forces that would cause deterioration, blockage or even breakage of the bacterial flagellum.

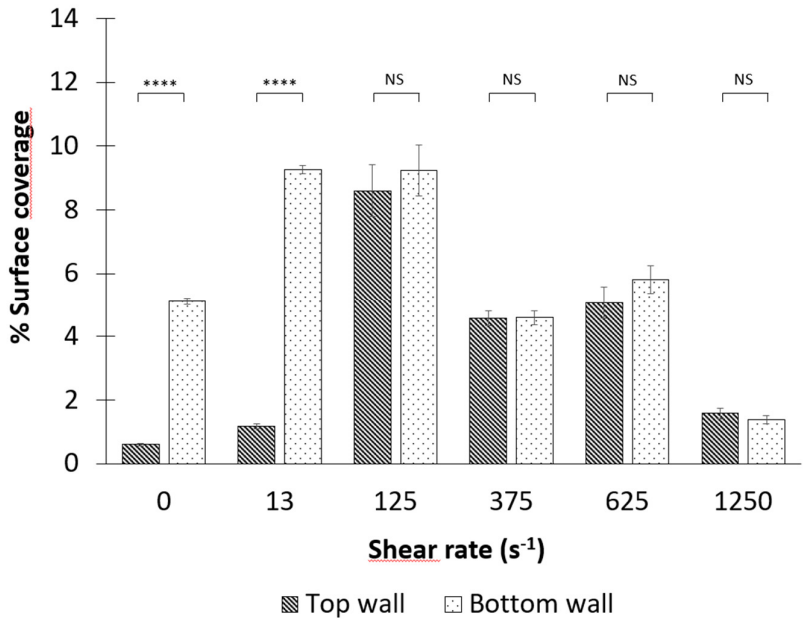


Fig. S2. Average surface coverage (%) of adhered *S. oneidensis* at the top and bottom wall of the capillary according to shear rates after 2h colonization. For each shear rate, histograms represent mean and standard error for 30 independent values per shear rate and per wall condition. (NS = not statistically significant, **** = p value < 0.0001).

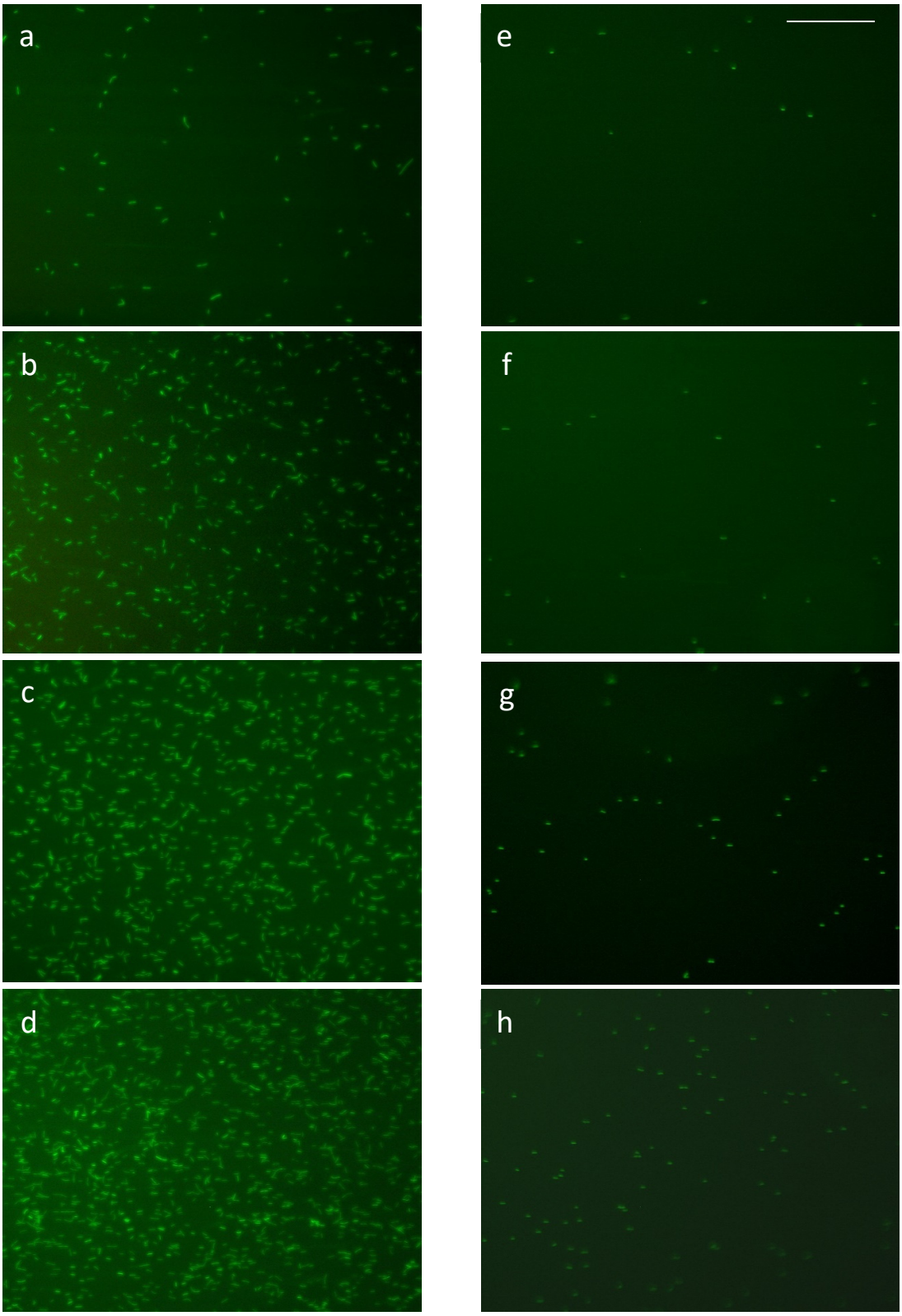


Fig. S3. Representative epifluorescence microscopic observations of adhered *S. oneidensis* gfp cells at the top wall capillary for 2 shear rates: 125 s^{-1} (a,b,c,d) and 1250 s^{-1} (e,f,g,h).and at 4 colonization times : 0.08h (a,e) ; 0.5h (b,f) ; 1h (c,g) ; 2h (d,h). Flow is right to left. Scale bar represents 100 µm.

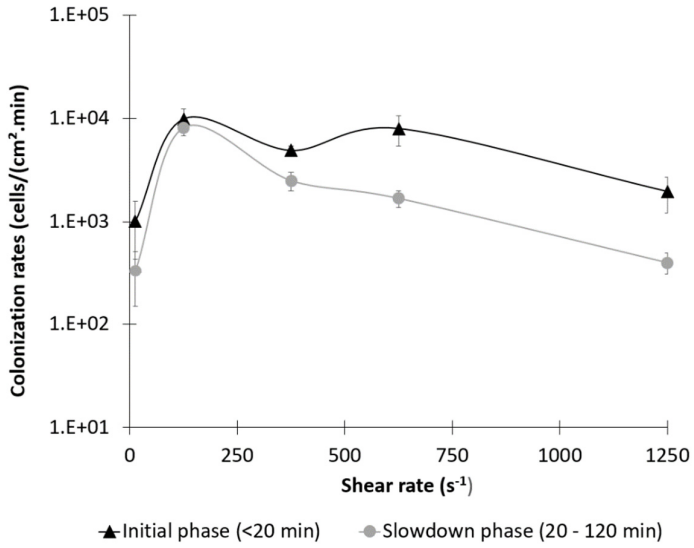


Fig. S4. Colonization rates of *S. oneidensis* at the upper capillary wall during the first two hours of colonization as a function of shear rates. Two distinct phases were considered: the initial phase (<20 min of colonization; see Fig. 4) and the slowdown phase (20 to 120 min of colonization; see Fig. 4). Each value is the mean and standard error of three independent experiments. The curves are for display purposes only.

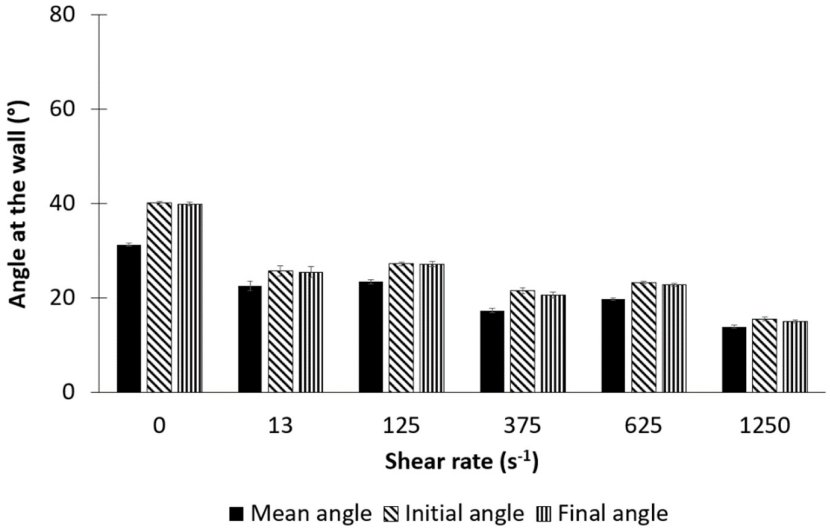


Fig. S5. Mean, initial and final wall orientation, relative to the flow direction of *S. oneidensis* adhered bacteria during the first 14 min according to shear rate. The total number of bacteria analysis was n_{total} = 20,344 bacteria (with n = 6,053 for $\dot{\gamma}_w = 0$ s^{-1}; n = 674 for $\dot{\gamma}_w = 13$ s^{-1}; n = 3,182 for $\dot{\gamma}_w = 125$ s^{-1}; n = 1,801 for $\dot{\gamma}_w = 375$ s^{-1}; n = 6,151 for $\dot{\gamma}_w = 625$ s^{-1}; n = 2,483 for $\dot{\gamma}_w = 1{,}250$ s^{-1}). Data obtained came from 3 independent experiments by shear rate (except for 13 s^{-1}; N = 2).

3 Explorations complémentaires fondées sur les résultats de deep learning

3.1 Effet de l'hydrodynamique sur le déplacement des bactéries à la paroi

Les résultats présentés dans l'article (partie « Bacterial orientation at the wall »), montrant une orientation moyenne des bactéries à la paroi légèrement différente entre le moment de l'adhésion et celui du détachement, nous ont amenés à nous interroger sur la capacité des bactéries à se déplacer le long de la paroi. Si un tel déplacement est possible, il pourrait représenter un avantage pour les bactéries en leur permettant de se réorienter à la paroi. Cela pourrait conduire aux orientations privilégiées dans le sens de l'écoulement que nous observons, ou qui ont été rapportées dans d'autres études (Korber *et al*., 1990 ; Liu *et al.,* 2011 ; Palalay *et al.,* 2023 ; Xu *et al*., 2021), où la surface bactérienne exposée au courant est minimisée, favorisant ainsi un temps de résidence plus long. Par ailleurs, cette capacité pourrait faciliter le regroupement des bactéries à la paroi, conduisant à la formation d'amas plus stables (surface individuelle exposée au cisaillement réduite et cohésion de groupe). Bien que ce phénomène de clusterisation n'ait pas été observé dans notre système avec nos conditions d'écoulement ; certaines études le décrivent et suggèrent qu'il est favorisé à fort cisaillement (Saur *et al*., 2017).

Dans ce contexte, nous avons mené des investigations supplémentaires sur les 20 000 bactéries analysées et en particulier, nous nous sommes intéressés à la dynamique de déplacement des bactéries pionnières à la paroi (14 premières minutes de colonisation). Nous avons notamment cherché à déterminer si le taux de cisaillement influençait ce mouvement et s'il existait une corrélation entre la capacité de déplacement des bactéries à la paroi et leur temps de résidence. Les paragraphes suivants présentent les résultats obtenus dans ce contexte.

3.1.1 Déplacement des bactéries à la paroi

La Figure 61 (a,b) présente des exemples de trajectoires bactériennes observées à la paroi pour les deux conditions d'écoulement les plus contrastées : en condition statique et pour le plus fort taux de cisaillement testé (1250 s^{-1}). En condition statique, certaines trajectoires se réduisent à des points, indiquant une immobilisation des bactéries une fois arrivées à la paroi, tandis que d'autres plus longues, indiquent un déplacement significatif à la paroi. Avec le plus fort cisaillement étudié, une grande majorité des trajectoires se résument à des points, indiquant une absence de mouvement à la paroi. Certaines bactéries conservent toutefois une capacité de déplacement, bien que leurs trajectoires soient plus courtes et principalement orientées dans le sens de l'écoulement.

Afin d'évaluer quantitativement le mouvement bactérien à la paroi, le déplacement total des bactéries ainsi que leur vitesse de déplacement ont été déterminés (Figure 61). Le déplacement total moyen des bactéries pionnières à la paroi varie de 3 à 7 µm, suivant un profil en cloche selon le taux de cisaillement appliqué, avec des déplacements moyens légèrement plus importants (facteur 2) pour les cisaillements

intermédiaires (Figure 61c). Ces déplacements moyens restent néanmoins faibles et inférieurs à 3 fois la taille de la bactérie, et les vitesses de déplacement associées sont extrêmement faibles, comprises entre 0,05 et 0,11 µm/s sans différence notable entre les conditions de cisaillement (Figure 61d).

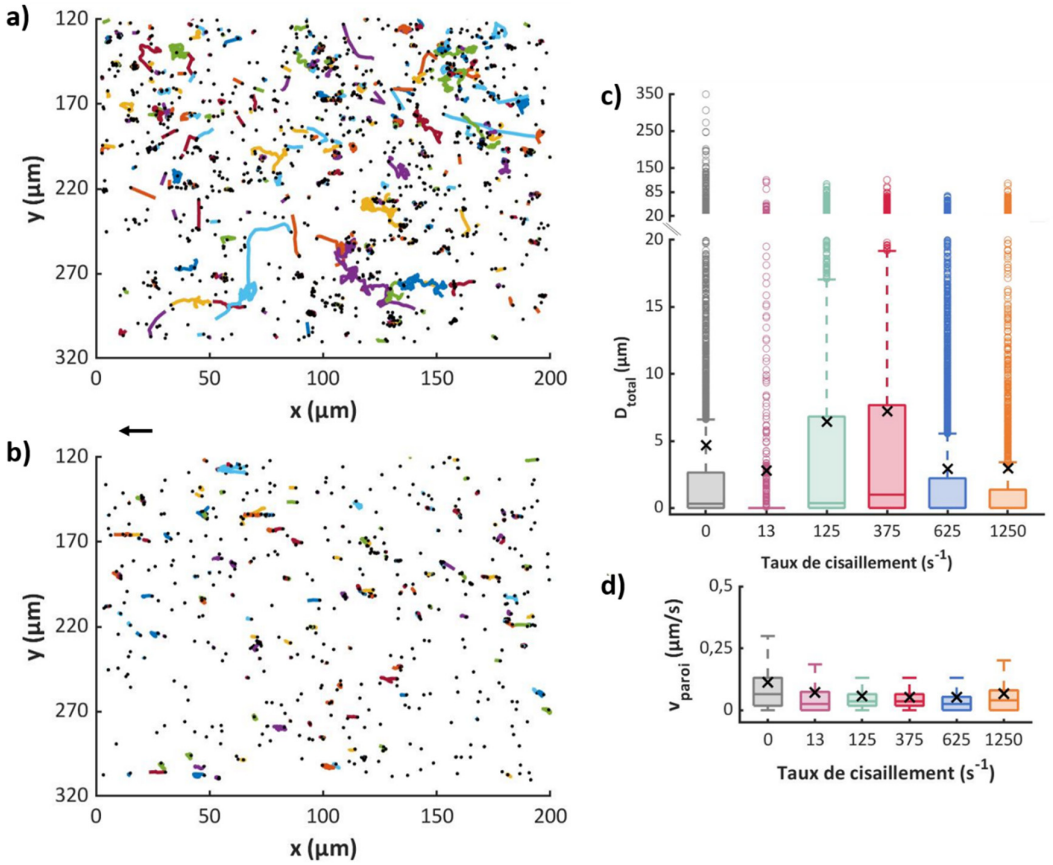


Figure 61. (a-b) Exemples représentatifs de trajectoires bactériennes observées à la paroi au cours des 14 premières minutes d'adhésion, dans une zone d'analyse de 200 × 120 µm², en condition statique (a) et sous un cisaillement de 1250 s^{-1} (b). Chaque trajectoire est représentée par une couleur distincte, avec un point noir épaissi indiquant le point de départ. La flèche noire indique le sens de l'écoulement.
(c-d) Représentations en boîtes à moustaches du déplacement total (c) et de la vitesse de déplacement (d) des bactéries pionnières à la paroi, en fonction du taux de cisaillement. Chaque boîte indique la médiane, les premier et troisième quartile, et les moustaches représentent les étendues des données hors valeurs extrêmes. La moyenne est indiquée par une croix noire. Les valeurs extrêmes sont indiquées par des cercles vides dans la figure c ; de plus une discontinuité a été appliquée à l'axe des ordonnées afin d'améliorer la lisibilité des données. Les données correspondent à un total de n = 20 344 bactéries analysées (avec n = 6053 pour $\dot{\gamma}_w = 0$ s^{-1} ; n = 674 pour $\dot{\gamma}_w = 13$ s^{-1} ; n = 3182 pour $\dot{\gamma}_w = 125$ s^{-1} ; n = 1801 pour $\dot{\gamma}_w = 375$ s^{-1} ; n = 6151 pour $\dot{\gamma}_w = 625$ s^{-1} ; n = 2483 pour $\dot{\gamma}_w = 1250$ s^{-1}). Les données sont issues de trois expériences indépendantes par taux de cisaillement, à l'exception de $\dot{\gamma}_w$ = 13 s^{-1} (N=2).

Comme illustré par la Figure 61c, la distribution des distances de déplacement des bactéries diffère selon le cisaillement : à 375 s^{-1}, l'écart interquartile atteint 20 µm, soit 2,8 fois plus qu'en condition statique (7 µm), indiquant des déplacements plus fréquents et marqués dans ces conditions de flux intermédiaire comparativement au cas statique ou ceux aux forts flux. Néanmoins, des longueurs de déplacement extrêmes pouvant aller jusqu'à 340 µm en conditions statique ont été observées, soit trois fois plus que

sous flux. Il existe donc un réel comportement dynamique de déplacement des bactéries à la paroi en condition statique et sous flux, ce que la Figure 62 illustre parfaitement bien. Seuls les déplacements totaux de plus de 20 µm (distance choisie car ≫ taille bactérie et représentative d'un réel déplacement à la paroi) ont été considérés ici.

En condition statique (Figure 62a), les trajectoires observées sont relativement longues et explorent la surface dans toutes les directions, traduisant une liberté de mouvement isotrope. Sous flux (Figure 62 b-f), cette liberté diminue : l'aire de déplacement des bactéries se réduit, les trajectoires raccourcissent et s'alignent de plus en plus avec l'écoulement à mesure que le cisaillement augmente. Un seuil de cisaillement critique (375 s^{-1}) marque la transition vers un déplacement exclusivement dans le sens du flux. Au-delà, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'une bactérie tentant de se déplacer à contre-courant subit des forces hydrodynamiques trop importantes, empêchant son déplacement effectif ou provoquant son détachement.

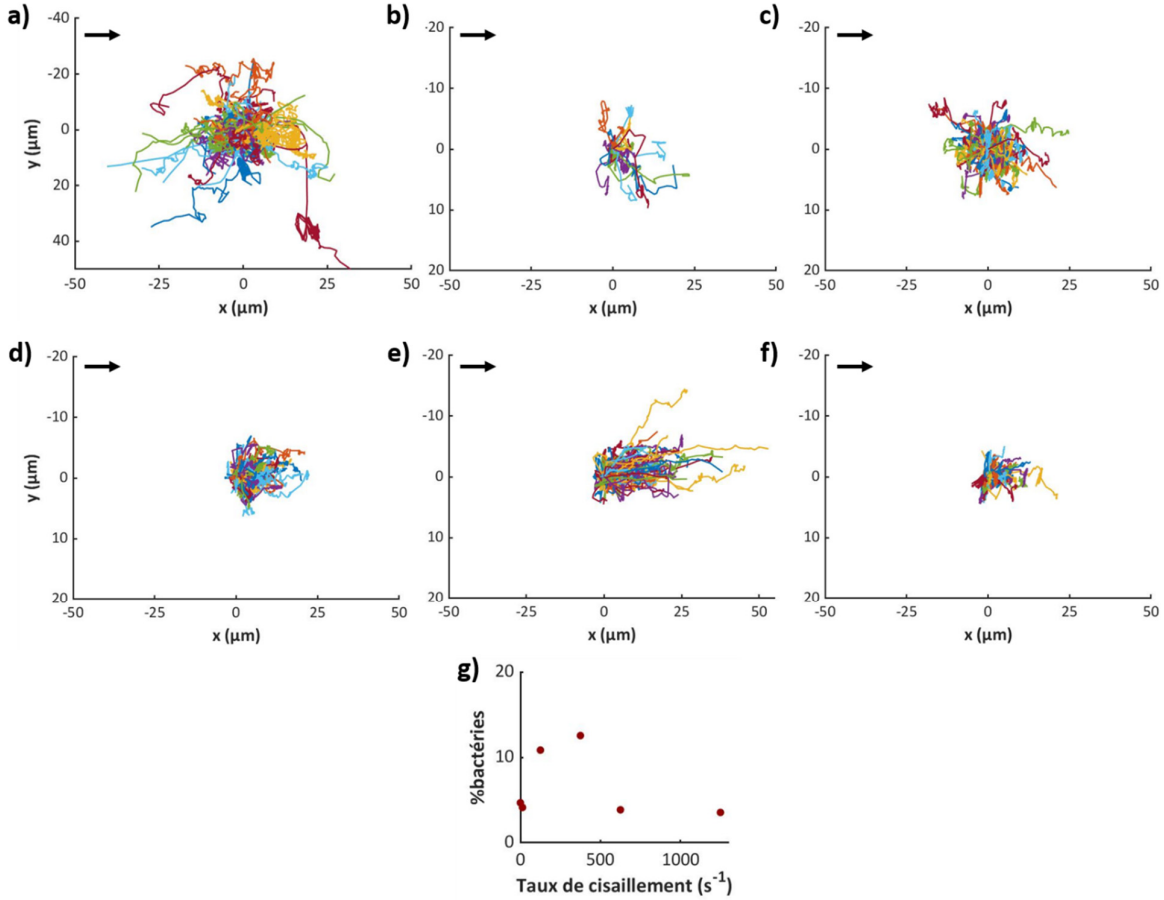


Figure 62. (a-f) Ensemble des trajectoires bactériennes dont le déplacement total dépasse 20 µm, en fonction des différentes conditions de cisaillement testées (a = 0 s^{-1} (n = 294), b = 13 s^{-1} (n = 28), c = 125 s^{-1} (n = 343), d = 375 s^{-1} (n = 230), e = 625 s^{-1} (n = 238), f = 1250 s^{-1} (n = 101)). Pour faciliter la visualisation, toutes les trajectoires ont été translatées pour commencer au point (x = 0, y = 0). Le sens de l'écoulement est indiqué par une flèche noire. Attention, un changement d'échelle intervient entre la figure a) et les suivantes. g) Proportion des bactéries, parmi celles analysées pour chaque condition de cisaillement, dont le déplacement dépasse à 20 µm.

Dans le sens du flux, des trajectoires relativement longues sont néanmoins observées à 625 s^{-1} (Figure 62e), et deviennent moins fréquentes à 1250 s^{-1} (Figure 62f). Cela pourrait indiquer que, jusqu'à un certain seuil de cisaillement, les bactéries sont partiellement entraînées par le flux tout en conservant des points de contact avec la paroi, ce qui traduirait un mouvement de type « stick-and-roll » à la paroi, déjà décrit dans la littérature (Thomas *et al.*, 2004), point qui sera discuté dans la section discussion générale. Au-delà (1250 s^{-1}), les forces hydrodynamiques plus importantes pourraient empêcher le maintien de ces interactions, réduisant les déplacements par roulement et favorisant le détachement.

La Figure 62g présente le pourcentage de bactéries dont le déplacement à la paroi dépasse 20 µm en fonction du cisaillement. Ce pourcentage reste relativement constant (∼4 %) aux cisaillements faibles (0 et 13 s^{-1}) et élevés (625 et 1250 s^{-1}), mais est multiplié par un facteur 3 pour les cisaillements intermédiaires (125 et 375 s^{-1}). Cela renforce l'observation faite Figure 61, suggérant un déplacement accru à ces cisaillements. Comme l'analyse présentée à la section 2 (article) a montré que ces cisaillements favorisaient aussi le temps de résidence des bactéries à la paroi ; nous avons cherché à déterminer s'il existe un lien entre ce temps et la capacité des bactéries à se déplacer à la paroi.

3.1.2 Lien entre déplacement et temps de résidence des bactéries à la paroi

La Figure 63 présente la distribution des temps de résidence des bactéries à la paroi selon le taux de cisaillement et leur déplacement à la paroi ($<$ ou $\geq$ 20 µm). Pour toutes les conditions testées, le constat est sans appel : les bactéries ayant parcouru plus de 20 µm à la paroi présentent des temps de résidence significativement plus longs, avec des valeurs au moins dix fois supérieures à celles observées pour les bactéries dont le déplacement est limité. Bien que ces bactéries ne représentent qu'une faible proportion de la population totale (entre 4 et 12% en fonction du cisaillement), ces résultats indiquent clairement un lien fort entre le déplacement et le temps de résidence des bactéries à la paroi.

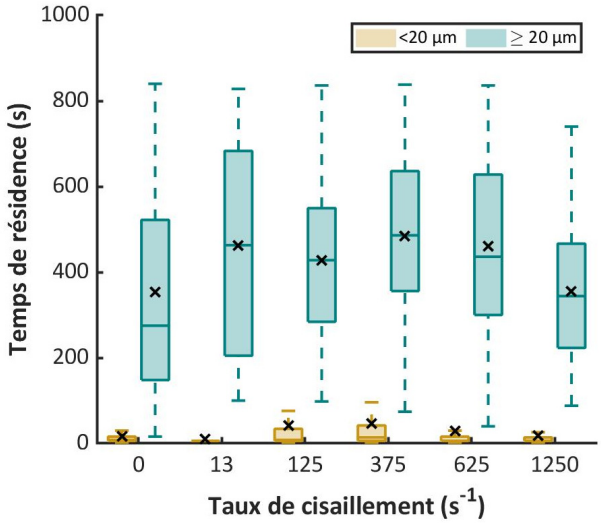


Figure 63. Représentation en boîte à moustache du temps de résidence des bactéries pionnières à la paroi en fonction du cisaillement et de leur déplacement à la paroi. Les données correspondent à un total de 20 344 bactéries analysées.

La difficulté réside désormais dans l'interprétation de cette relation : les bactéries restent-elles plus longtemps à la paroi parce qu'elles sont capables de s'y déplacer, ou bien se déplacent-elles davantage parce qu'elles y restent plus longtemps ?

Dans le premier cas, l'hypothèse suivante pourrait être formulée : une bactérie motile nouvellement arrivée à la paroi conserverait temporairement sa capacité à se déplacer afin d'explorer la surface à la recherche de zones plus favorables à son adhésion. Par zones plus favorables, j'entends des régions offrant de meilleures conditions, telles que la présence de micro-rugosités de surface ou la présence d'autres bactéries (obstacles) qui atténueraient les contraintes de flux. Cela inclut également la présence de dépôts organiques (film conditionnant ou matrice d'EPS) susceptibles de faciliter les interactions supramoléculaires.

Le second cas est également envisageable : seules les bactéries capables de rester longtemps à la paroi pourraient s'y déplacer efficacement. Cette capacité à rester longtemps à la paroi favoriserait l'établissement d'une adhésion plus pérenne, ce qui pourrait permettre l'activation éventuelle de mécanismes de motilité de surface, comme le *twitching* (*S. oneidensis* possédant des pili de type IV) pour se déplacer à la paroi tout en conservant de solides points d'ancrage / d'interactions avec la paroi, limitant ainsi leur détachement.

Nous ne sommes actuellement pas en mesure de trancher entre ces hypothèses, il faudrait pour cela étudier à quel moment le déplacement à la paroi survient : dès l'interaction initiale entre la bactérie et la paroi, ou seulement après un certain temps d'adhésion. De plus, il ne faut pas non plus négliger la possibilité que ces deux phénomènes coexistent.

3.2 Évolution temporelle de la dynamique bactérienne à la paroi ?

La dynamique bactérienne à la paroi, en termes de temps de résidence, d'orientation et de déplacement a été évaluée jusqu'à présent dans ce travail dans le cas de bactéries pionnières ; c'est-à-dire des bactéries qui rencontrent une surface vierge lors de leur arrivée à la paroi. Nous sommes certes conscients que cette dernière se colonise progressivement ; néanmoins son état initial n'est en rien comparable à celui au bout de 1 ou 2 heures de colonisation. Pour ces temps plus avancés, la concentration bactérienne surfacique est plus importante (cf cinétique de colonisation), et les bactéries qui arrivent à la surface interagissent potentiellement avec une surface dont les propriétés physico-chimiques ont déjà évolué. On peut notamment envisager l'accumulation de dépôts organiques provenant du milieu $LB_{1/10}$ qui véhicule les bactéries, ou encore la présence de molécules produites par des bactéries dont le temps de résidence à la paroi a été suffisant pour initier une telle production.

Nous nous sommes donc demandé si la dynamique bactérienne à la paroi évoluait avec le temps et en particulier si cette surface « modifiée » était plus favorable à l'adhésion que la surface vierge initiale. Notre objectif a donc visé à déterminer :

- D'une part le temps de résidence des bactéries arrivant à la paroi 1 ou 2 heures après le début de la colonisation.
- D'autre part si les bactéries déjà présentes à la paroi pourraient constituer des obstacles pour celles qui arrivent, conduisant à une compétition pour l'espace disponible ou à la création de perturbations locales dans l'écoulement, qui pourraient influencer l'adhésion des nouvelles arrivantes, voire favoriser leur détachement ; ou si, au contraire, elles pourraient faciliter l'adhésion des nouvelles bactéries.

Avant de mener cette investigation, il était nécessaire de valider la performance de notre modèle d'apprentissage pour des temps de colonisation plus longs, c'est-à-dire pour des surfaces comportant un nombre plus important de bactéries.

3.2.1 Validation de l'analyse par deep learning pour des cinétiques de colonisation plus longues

La Figure 64a présente la corrélation entre le nombre de bactéries détectées pour différents temps de colonisation selon les deux méthodes d'énumération (comptage manuel et *deep learning*). Comme nous pouvons le constater, au-delà d'un certain seuil de bactéries à la paroi, le modèle de détection développé, perd en efficacité et tend à sous-estimer le nombre de bactéries présentes à la paroi. Ceci nous permet de définir un seuil de validité du modèle, proche de 800 bactéries, en dessous duquel le modèle semble très fiable. La preuve avec l'encart de la Figure 64a qui montre une forte corrélation (R^2 = 0,97) entre détection par IA et comptage manuel lorsque le nombre de bactéries/image n'excède pas 800. Cette corrélation valide l'utilisation du modèle jusqu'à ce seuil. Ainsi, toutes les vidéos acquises lors des expériences d'adhésion pendant deux heures peuvent être traitées en toute confiance, à l'exception de celles réalisées à un cisaillement de 125 s^{-1}, où ce seuil est dépassé (Annexe Chapitre 3 Fig SI.1). Dans ce cas, notre analyse s'est limitée à une durée d'une heure.

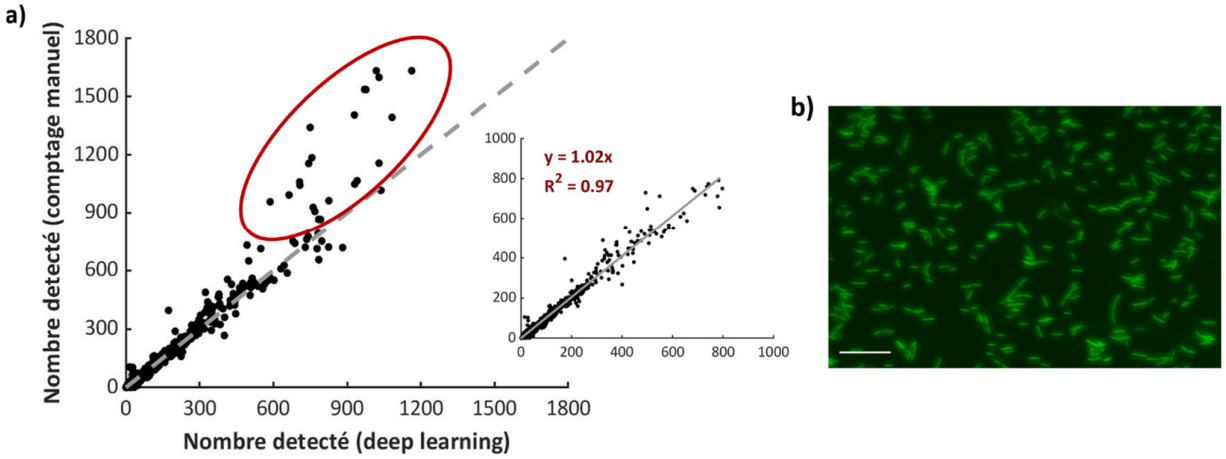


Figure 64. a) Corrélation entre le nombre de bactéries détectées par comptage manuel et par *deep learning* pour tous les taux de cisaillement et les essais confondus. Les données regroupent 1080 images et environ 128 200 bactéries détectées. b) Sous-Image (126*189 µm²) représentative d'une surface colonisée (t = 2h), avec un nombre de bactéries excédant le seuil déterminé (~105 bactéries pour la surface présentée ici). Cette image illustre les limites du modèle de détection lorsque le nombre de bactéries à la paroi est important. La barre d'échelle représente 25 µm.

À titre d'exemple, la Figure 64b correspond à une sous-image obtenue au bout de 2h de colonisation à 125 s^{-1} ; on y observe une perte d'individualisation des bactéries en raison d'une densité bactérienne élevée à la paroi, rendant leur détection individuelle difficile. Ce phénomène explique les pertes de performance du modèle Yolov8, que nous avons entrainé uniquement pour l'identification de bactéries isolées. Il faudrait ici envisager une autre stratégie de labellisation pour refléter plus fidèlement l'état de colonisation de la surface.

3.2.2 Évolution temporelle du temps de résidence des bactéries à la paroi

Cette validation nous a permis d'estimer les temps de résidence des bactéries arrivant à la paroi au début de la colonisation (t ∈ [0: 14] min), après 1 h de colonisation (t ∼ ∈ [46: 60] min) et à la fin des 2 h de colonisation (t ∼ ∈ [106: 120] min) (Figure 65). L'encart associé à la figure permet de rappeler les cinétiques de colonisation présentées précédemment ; ce qui sera utile lors de l'interprétation des résultats.

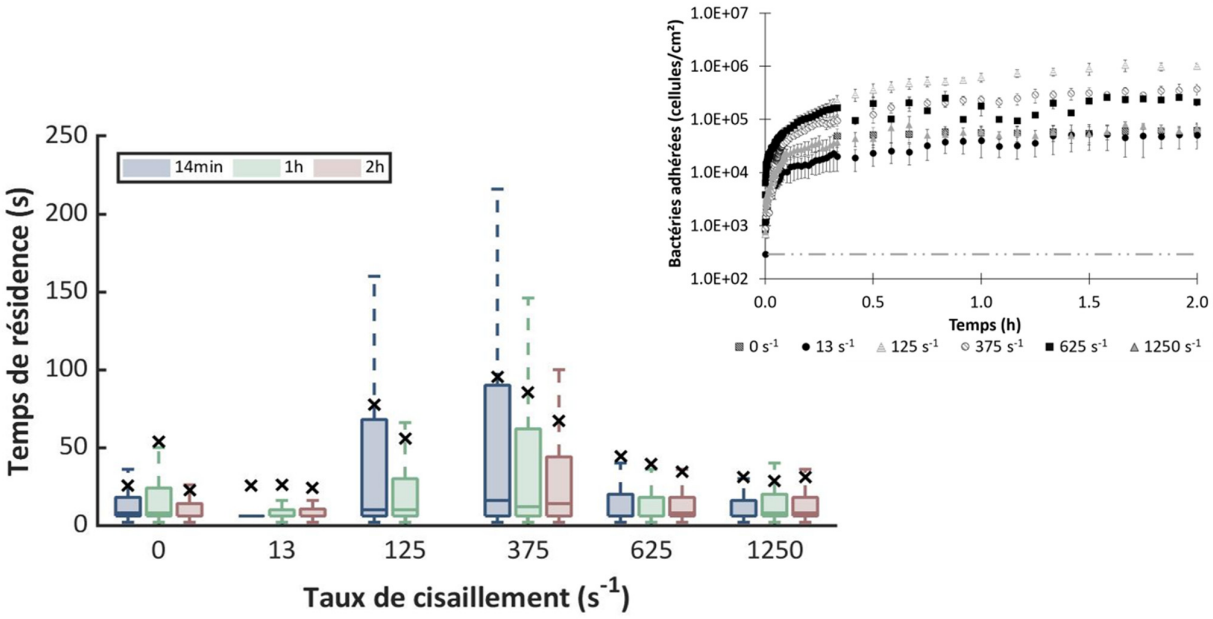


Figure 65. Représentation en boîte à moustache du temps de résidence des bactéries à la paroi, mesuré à différents temps de colonisation (0, 1 et 2h), en fonction du cisaillement appliqué. Chaque boîte à moustache présente les centiles 25 (Q_1), 50 (médiane) et 75 (Q_3) de la distribution des temps de résidence des bactéries analysées. Les moustaches s'étendent jusqu'aux valeurs extrêmes situées à moins de 1,5 × IQR (intervalle interquartile = $Q_3 – Q_1$). Le nombre total de bactéries analysées pour chaque temps est respectivement de 20 344, 37 255 et 18 697. Les données sont issues de 3 expériences indépendantes, sauf pour 13 s^{-1} (n=2). Le cas t=2h n'a pas pu être analysé à 125 s^{-1} en raison des limitations du modèle. L'encart correspond aux cinétiques de colonisation obtenues à la paroi.

Lorsque l'on examine l'influence des conditions hydrodynamiques sur le temps de résidence, que ce soit au temps initial (t < 14 min), ou après 1 h et 2 h de colonisation, les distributions des temps de résidence des bactéries à la paroi présentent un profil en cloche, avec des valeurs moyennes et des distributions plus étendues pour les cisaillements intermédiaires testés (125 et 375 s^{-1}). Conformément aux observations

rapportées dans l'article publié (paragraphe 2), nous postulons que les forces d'interactions entre les bactéries et la paroi augmentent avec le taux de cisaillement, favorisant ainsi un meilleur ancrage bactérien à la paroi et, par conséquent, un temps de résidence accru. En revanche, au-delà d'un certain seuil de cisaillement (ici > 375 s^{-1}), les contraintes hydrodynamiques deviendraient trop importantes pour permettre aux bactéries d'établir des interactions suffisamment fortes avec la paroi, entraînant leur détachement et des échanges paroi/bulk plus dynamiques.

Concernant l'évolution temporelle des distributions de temps de résidence, les résultats montrent que pour les cisaillements les plus faibles et les plus forts testés (13 s^{-1} et 1250 s^{-1}), les centiles (25, 50 et 75) ainsi que les temps de résidence moyens (représentés par une croix) restent similaires au cours du temps. En revanche, pour les cisaillements intermédiaires, en particulier à 125 s^{-1} et 375 s^{-1}, une légère décroissance du temps de résidence moyen des bactéries à la paroi est constatée, accompagnée d'une réduction de la dispersion des distributions. Par exemple, à 375 s^{-1} ; le temps de résidence moyen entre 15 min et 2 h est réduit d'un facteur 1,5 et l'écart-interquartile est divisé par 2,2. Cela suggère une diminution de la proportion des bactéries appelées sédentaires à la paroi ainsi qu'un raccourcissement de leur temps de résidence à la paroi.

Pour conclure, les résultats obtenus remettent en question notre hypothèse initiale selon laquelle une surface préalablement colonisée favoriserait l'adhésion et le maintien des nouvelles bactéries arrivant à la paroi, par exemple par une modification des propriétés physico-chimiques de la paroi ou par l'intermédiaire de bactéries déjà fixées pouvant aider l'adhésion des nouvelles (points d'ancrage). En revanche, nos observations suggèrent que la colonisation progressive de la surface pourrait entraver l'adhésion des nouvelles bactéries. Plusieurs mécanismes pourraient être envisagés : une compétition locale entre les bactéries pour l'espace disponible, une saturation progressive des sites d'adhésion disponibles à la paroi ou encore des effets mécaniques résultant du nombre accru de bactéries à la paroi, tels que des perturbations locales de l'écoulement dues aux bactéries déjà adhérées.
Cette interprétation est corroborée par les cinétiques de colonisation obtenues à la surface (Figure 65, encart). En effet, les cisaillements extrêmes (13 et 1250 s^{-1}) conduisent à des niveaux de colonisation faibles, avec une concentration bactérienne à la paroi similaire à 15 min et 2 h, suggérant une surface d'adhésion constante et une stabilité du temps de résidence des bactéries à la paroi. Autrement dit, à surface équivalente, la dynamique n'est pas modifiée. En revanche, aux cisaillements intermédiaires, la colonisation croît davantage avec le temps de colonisation tandis que le temps de résidence des bactéries adhérées diminue, indiquant qu'un encombrement accru peut entraver l'adhésion et l'installation durable des bactéries. Ce phénomène, connu sous le terme d'hydrodynamic *blocking*, a été investigué sur nos données et est détaillé dans le paragraphe suivant.

3.3 « Hydrodynamic blocking » et distribution des bactéries à la paroi

L'observation d'un pseudo-plateau lors de l'étude des cinétiques de colonisation à la paroi nous a amenés à formuler l'hypothèse d'un phénomène de « blocage hydrodynamique » (« hydrodynamic blocking »). Ce mécanisme suppose que chaque bactérie adhérée à la paroi perturbe localement le champ d'écoulement, ce qui génère en aval d'elle une zone d'«ombre hydrodynamique». Cette zone, caractérisée par des lignes de courant déviées et un flux bactérien réduit près de la paroi, pourrait limiter, voire empêcher, l'adhésion de nouvelles bactéries dans cette région. Ce phénomène pourrait contribuer à expliquer le ralentissement progressif observé dans les cinétiques de colonisation, malgré un flux constant de bactéries en suspension. Ce mécanisme pourrait également expliquer en partie les cinétiques observées en Figure 66.

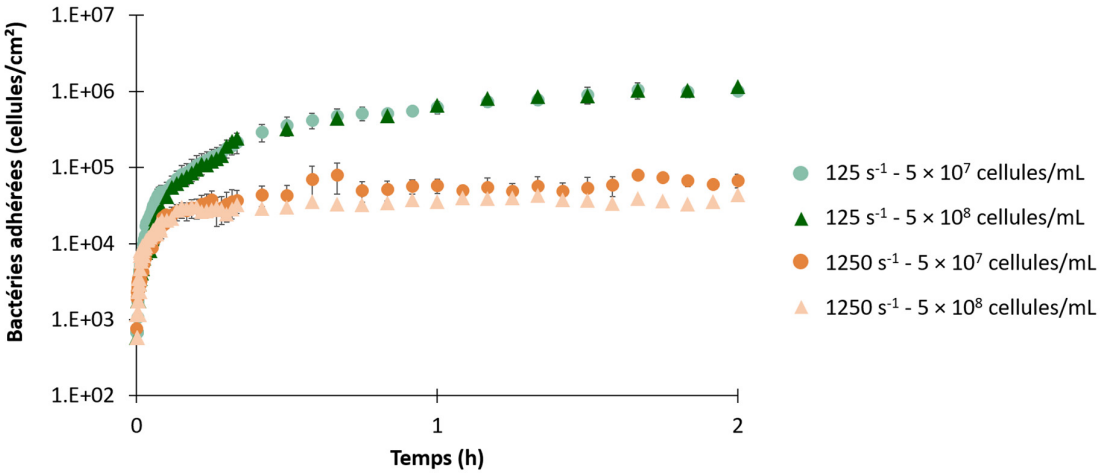


Figure 66. Évolution temporelle du nombre de bactéries *S. oneidensis* adhérées (cellules/cm²) à la paroi supérieure du capillaire pour deux taux de cisaillement (125 s^{-1}, 1250 s^{-1}) et deux concentrations d'ensemencement (5×10^7 cellules/mL, 5×10^8 cellules/mL). Les données obtenues à 5×10^7 cellules / mL correspondent à la moyenne d'un triplicat ; celles à 5×10^8 cellules/mL à un unique essai.

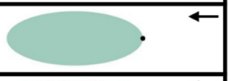
En augmentant la concentration de l'inoculum de 5×10^7 cellules/mL à 5×10^8 cellules/mL pour deux conditions de cisaillement (125 et 1250 s^{-1}), les mêmes cinétiques de colonisation sont obtenues, ce qui est un peu contre-intuitif. En effet, pour un même temps, on aurait pu s'attendre à un niveau de colonisation plus important lorsque l'inoculum est 10 fois plus concentré. Ce résultat est intéressant car il suggère que le niveau de colonisation à la paroi constitue un facteur limitant, qui empêche le contact et l'adhésion de nouvelles bactéries une fois ce niveau atteint. Cette limitation pourrait s'expliquer par la présence de ces « zones d'ombre hydrodynamiques » à la paroi. Ce mécanisme bien documenté dans le cas de particules colloïdales (Adamczyk, 2012, 2003 ; Ko et Elimelech, 2000 ; Van Loenhout *et al.*, 2009), a également été un peu exploré dans le contexte de l'adhésion bactérienne (Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Camesano et Logan, 1998 ; Ko et Elimelech, 2000 ; Lu *et al.*, 2013). Ces travaux montrent notamment que la taille de la zone de blocage dépend du taux de cisaillement imposé : plus celui-ci est fort et plus la zone de blocage en aval de la bactérie est importante. Ce phénomène pourrait ainsi, dans le cadre de notre étude, contribuer à expliquer le plus faible niveau de colonisation surfacique observé pour le plus fort taux de cisaillement.

Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons, à titre très exploratoire, utilisé un modèle préexistant et modélisé cette zone d'exclusion autour des bactéries adhérées à la paroi. L'objectif était d'estimer dans quelle mesure ce phénomène pouvait expliquer la saturation observée dans les cinétiques de colonisation. Les paragraphes suivants présentent le modèle utilisé, et les résultats obtenus. Nous sommes cependant conscients des incertitudes sur ces résultats, liées à l'application directe du modèle et de ses paramètres.

3.3.1 Présentation du modèle de blocage hydrodynamique utilisé

La zone d'exclusion autour de chaque bactérie a été modélisée à l'aide de la formule déterminée expérimentalement et numériquement par Van Loenhout *et al.* (2009) pour des particules colloïdales. Cette zone est représentée par une ellipse, dont les dimensions des axes principaux sont définies de la manière suivante : 1) L_s : longueur de l'ellipse parallèle à l'écoulement et 2) L_{S0} : longueur de l'ellipse perpendiculaire à l'écoulement. L_{S0} représente la dimension de la zone d'exclusion en condition statique et est de forme circulaire. Une approximation courante consiste à prendre L_{S0} comme deux fois le rayon de la particule, soit dans notre cas R = 1,5 µm (d'après des mesures de taille de notre modèle *S. oneidensis* effectuées à la paroi). Il a été démontré que L_{S0} reste constante quelle que soit la contrainte d'écoulement, tandis que L_s augmente avec celle-ci. Plus la contrainte est élevée, plus l'ellipse s'étire dans le sens de l'écoulement, traduisant un allongement de la zone d'exclusion vers l'arrière. Van Loenhout *et al.* (2009) ont établi la relation suivante entre la longueur de la zone de blocage et les conditions hydrodynamiques : $Ls = A_h \times Pe^n + Ls_0$, avec $A_h = 0{,}7$ et $n = 0{,}87$, coefficients déterminés numériquement par les auteurs et que nous avons repris pour nos données comme première approximation du phénomène. Le nombre de Péclet d'écoulement (Pe) est défini par la relation suivante : $Pe = (R^2 \times \dot{\gamma}_w)/D$; où $\dot{\gamma}_w$ est le taux de cisaillement à la paroi, et D est le coefficient de diffusion (ici nous avons pris D = 100 µm²/s, valeur couramment trouvée dans la littérature dans le cas de bactéries motiles).

Tableau 11. Dimensions des axes de l'ellipse modélisant la zone d'exclusion en fonction du taux de cisaillement $(\dot{\gamma}_w)$ et du nombre de Péclet (Pe). Ces dimensions ont été calculées selon la relation déterminée par Van Loenhout *et al*. (2009). La schématisation associée représente la bactérie par un point noir et la zone d'exclusion par une ellipse verte. L'écoulement s'effectue de la droite vers la gauche.

$\dot{\gamma}_w$	Pe	L_s	L_{S0}	Schématisation — 2 µm
0	0	3	3	
13	0.3	3.2	3	
125	2.8	4.7	3	
375	8.5	7.5	3	
625	14.1	10.0	3	
1250	28.1	15.8	3	

À l'aide de ces formules, nous avons calculé les dimensions des axes de l'ellipse pour chacune des bactéries afin de modéliser leurs zones d'exclusion en fonction du taux de cisaillement. Les valeurs obtenues sont présentées en Tableau 11. On observe un facteur 5 entre la longueur de la zone d'exclusion générée sous le plus fort cisaillement testé par rapport à celle observée en condition statique d'écoulement. Cela illustre bien l'influence importante du cisaillement sur l'élongation progressive de cette zone d'exclusion dans le sens du flux.

3.3.2 Résultats obtenus

Après avoir déterminé les dimensions des ellipses d'exclusion individuelle, nous les avons superposées à l'ensemble des bactéries observées à la paroi pour t = 14, 60 et 120 minutes (N = 3 par $\dot{\gamma}_w$ et temps sauf à 125 s^{-1}, N = 1 pour t=2h) (Figure 67). Nous avons examiné l'aire totale couverte par ces zones d'exclusion (aire totale d'exclusion) (Figure 68a) pour voir si cela expliquait la saturation de la colonisation. Par ailleurs, nous avons analysé les chevauchements entre zones d'exclusion des bactéries, en calculant le pourcentage de bactéries aux ellipses chevauchantes (Figure 68b) et la proportion de l'aire de chevauchement par rapport à l'aire totale des ellipses (Figure 68c). Théoriquement, on s'attend à ce qu'aucune bactérie ne soit présente dans les zones d'exclusion générées par d'autres bactéries adhérées à la paroi.

La Figure 67 montre que l'aire d'exclusion totale de ces ellipses tend à s'amplifier avec le temps. Excepté pour le cas statique et le plus faible cisaillement, cette tendance est notamment marquée aux cisaillements intermédiaires où elle atteint jusqu'à 7 % après 2 heures (Figure 68a), en lien avec les niveaux de colonisation plus importants obtenus. Cet impact du cisaillement sur l'importance de cette zone d'exclusion hydrodynamique est également remarquable à 1250 s^{-1}, où l'aire d'exclusion représente 2,5 % à t=2h, soit 10 fois plus que celle observée à 13 s^{-1} alors que la colonisation était identique. Malgré cela, plusieurs constats peuvent être fait qui viennent moduler / modérer nos hypothèses de départ :

1) des zones libres sans bactérie et sans aire d'exclusion subsistent (Figure 67), sur lesquelles l'adhésion d'éventuelles nouvelles bactéries est possible. Le phénomène de blocking hydrodynamique ne suffit donc pas à lui seul, à expliquer les pseudo-plateaux observés dans les cinétiques de colonisation.

2) des chevauchements d'ellipses (Figure 12, zones oranges) sont observés et leur proportion peut atteindre jusqu'à 20 %. Ils tendent à augmenter avec le temps de colonisation (Figure 68b), sans pour autant être statistiquement significatifs excepté pour 375 s^{-1} (p-value = 0,03).

3) en revanche, par rapport à l'aire totale des ellipses, cette surface de chevauchement reste faible et stable dans le temps : moins de 2 % pour les faibles cisaillements, environ 4 % pour les autres (Figure 68c). Cela indique que, malgré un chevauchement relativement fréquent (entre 5 à 20 %), l'espace réellement partagé est limité, suggérant effectivement une zone d'exclusion efficace en aval des bactéries, peu propice à l'adhésion bactérienne.

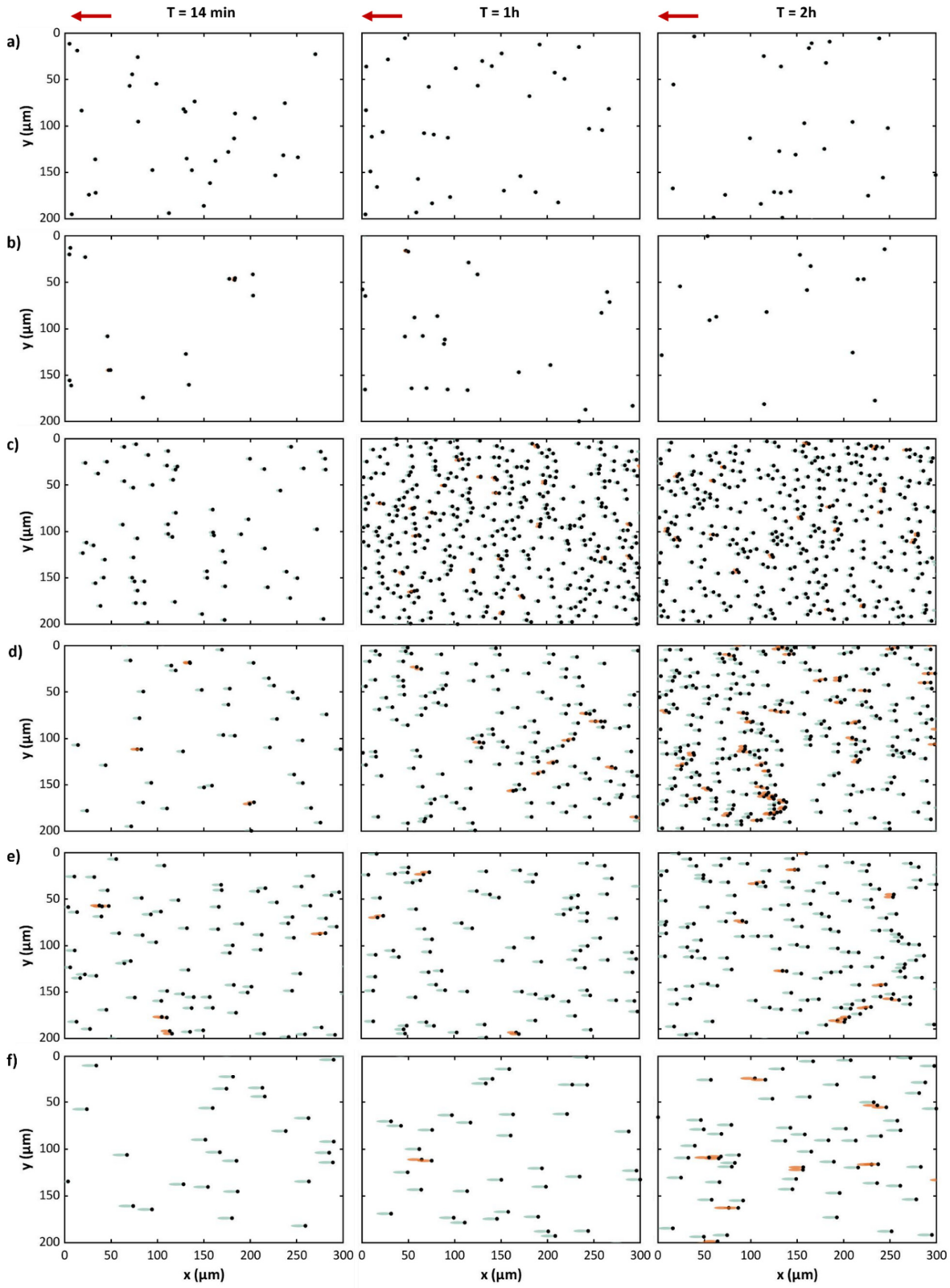


Figure 67. Représentation des zones d'exclusion autour des bactéries (points noirs) adhérées à la paroi pour chaque taux de cisaillement (a) 0 s^{-1}, b) 13 s^{-1}, c) 125 s^{-1}, d) 375 s^{-1}, e) 625 s^{-1} et f) 1250 s^{-1}) et à trois temps distincts (14, 60 et 120 min). Le flux s'écoule de droite à gauche. Les ellipses sont vertes lorsqu'elles sont isolées, orange lorsqu'elles se chevauchent. Le cadre représente une sous-partie de l'image acquise (300 × 200 µm).

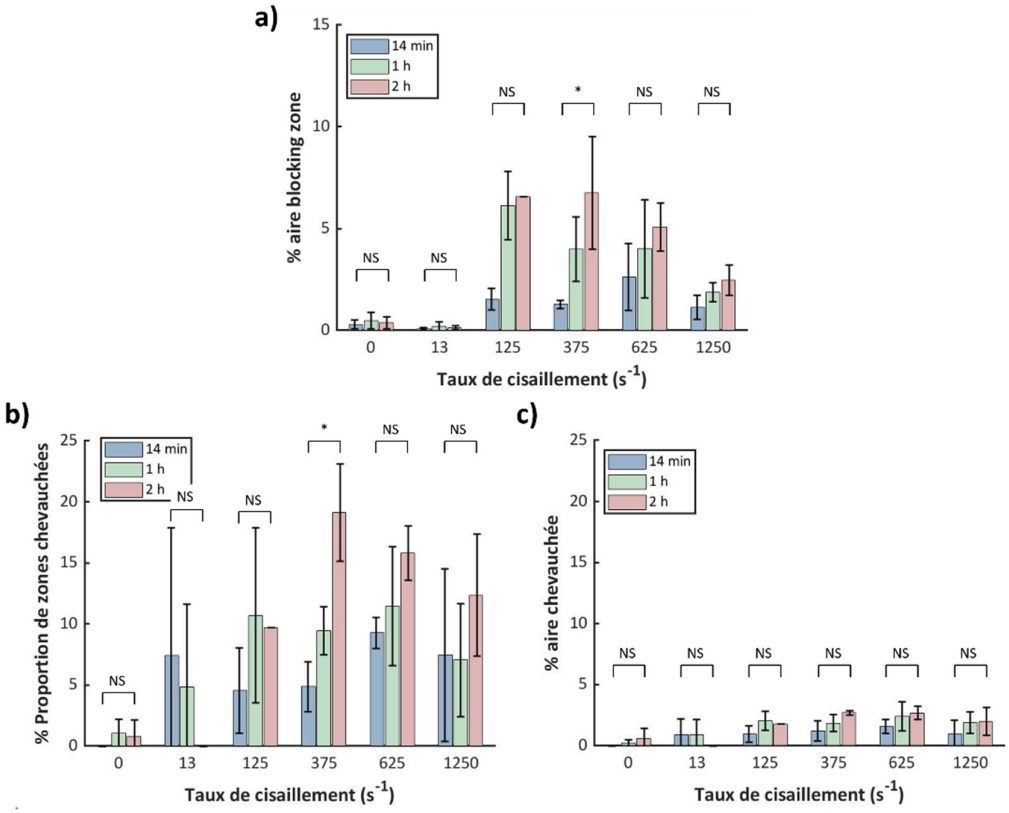


Figure 68. Évolution des zones d'exclusion bactérienne en fonction du taux de cisaillement et du temps (14, 60 et 120 min) : aire de blocage hydrodynamique (a), pourcentage d'ellipses chevauchantes (b), et de l'aire relative de chevauchement (c). Moyennes et écarts-types de ces aires pour 3 images par condition, sauf pour 2 h à 125 s^{-1} où seulement 1 image a été analysée en raison de problèmes de détection liés à la forte concentration bactérienne. (NS = non significatif statistiquement, * = 0,01 < p value ≤ 0,05).

En résumé, bien que le phénomène de blocking hydrodynamique semble être présent, et amplifié dans des conditions de fort cisaillement et de forte densité surfacique bactérienne, son impact reste limité, voire négligeable dans certaines conditions (statique et 13 s^{-1}). Il ne suffit donc pas à lui seul, à expliquer les pseudo-plateaux observés dans les cinétiques de colonisation. Néanmoins, son rôle ne peut être entièrement écarté ; et sa contribution, bien que secondaire, pourrait contribuer au ralentissement observé à temps plus longs. L'analyse des zones d'exclusion suggère en effet une organisation spatiale contrainte autour des bactéries déjà fixées, avec une possible inhibition locale de l'adhésion, en aval de ces dernières. Cette inhibition pourrait réduire les probabilités d'adhésion et les temps de résidence des bactéries, lorsqu'elles tentent de se fixer dans ces zones mais en sont rapidement détachées sous l'effet des perturbations hydrodynamiques générées.

Par ailleurs, ces valeurs obtenues doivent également être nuancées par les limites du modèle utilisé. En effet, celui-ci repose sur certaines approximations, notamment concernant les valeurs des paramètres R et de D variables selon les conditions expérimentales. De plus, il a été initialement développé pour des particules colloïdales, ce qui pose la question de sa transposabilité à des systèmes biologiques complexes

comme les bactéries. Malgré ces limites, ces observations ouvrent des pistes intéressantes pour approfondir la compréhension de la dynamique d'adhésion bactérienne, ainsi que sa structuration à la paroi. Elles suggèrent également l'implication de mécanismes complémentaires pour expliquer le pseudo-plateau observé, tels que des modifications physico-chimiques de la surface induites par l'adhésion bactérienne (excrétion de polymères, modification de la charge de la surface) ou par le dépôt de matière organique du milieu circulant, créant un environnement localement défavorable à la fixation de nouvelles bactéries. Des interactions bactériennes, comme la compétition spatiale ou des effets de signalisation locale, pourraient également réduire les sites de fixation disponibles.

Conclusions

Au cours de ce chapitre, nous avons cherché à répondre à deux objectifs principaux ; d'une part le développement d'une méthode automatisée de traitement d'images basée sur le *deep learning* et d'autre part, l'évaluation de l'influence du taux de cisaillement à la paroi sur la dynamique d'adhésion bactérienne. Les paragraphes suivants résument les principaux résultats obtenus :

- Dans un premier temps, cette étude a permis d'implémenter et de valider une approche innovante de traitement d'images par *deep learning*, qui a permis d'analyser à l'échelle individuelle plus de 76 000 bactéries adhérées à la paroi. Cette méthode s'est montrée efficace pour analyser la dynamique d'adhésion bactérienne à la paroi au cours des premières étapes de la colonisation, et ce, sur des échelles de temps relativement longues (jusqu'à deux heures) par rapport à ce qui est généralement rencontré dans la littérature. Elle reste fonctionnelle jusqu'à des densités cellulaires à la paroi relativement conséquentes ($\approx 4{,}7 \times 10^5$ cellules/mL), bien qu'une limite soit observée au-delà de ce seuil, liée à la perte d'individualisation des bactéries en raison de la formation d'amas.
- Cette approche à l'échelle individuelle nous a permis de caractériser d'un point de vue statistiquement robuste différents paramètres liés à l'adhésion bactérienne, tels que le temps de résidence à la paroi des bactéries adhérées, leur orientation ou encore leur déplacement. Ces critères sont peu/pas étudiés dans la littérature, et notre étude se distingue par leur mesure sur un échantillon bactérien aussi conséquent. Notons également les perspectives qu'offre cette méthode pour enrichir davantage notre étude et affiner nos hypothèses. Elle pourrait notamment permettre l'extraction de cartographies des fréquences d'adhésion et de détachement, ainsi que des fréquences de collisions entre une bactérie arrivant à la paroi et une cellule déjà installée à la paroi, afin de tester l'influence de la surface sur l'adhésion.
- Par ailleurs, comparée aux méthodes de traitement d'images plus classiques, cette approche présente l'avantage d'être plus robuste face à une forte variabilité des images, tant en termes d'intensité de fluorescence que d'hétérogénéité des populations bactériennes étudiées. Cette performance résulte

du travail réalisé lors de la phase d'apprentissage du modèle, permettant désormais une généralisation efficace de son utilisation à diverses conditions expérimentales.

- Concernant notre second objectif, l'influence du taux de cisaillement sur la dynamique d'adhésion bactérienne pionnière de *S. oneidensis* à la paroi a été évaluée, en combinant une analyse à l'échelle populationnelle, par l'obtention de cinétiques de colonisation, et cette approche à l'échelle individuelle par deep learning.
- L'analyse des cinétiques de colonisation a révélé une dynamique d'adhésion en deux phases, commune à l'ensemble des conditions hydrodynamiques testées : une phase initiale rapide, suivie d'un ralentissement progressif de la colonisation, aboutissant à un pseudo-plateau vers deux heures. Ces cinétiques ont également mis en évidence l'effet non proportionnel de l'effet de cisaillement sur la colonisation bactérienne ; initialement une augmentation de ce dernier facilite la colonisation bactérienne jusqu'à un certain seuil au-delà duquel une augmentation supplémentaire entraîne une diminution de la colonisation. L'effet optimal a été observé à 125 s^{-1}.
- Notre étude a permis d'identifier deux comportements bactériens distincts à la paroi et variables selon les conditions hydrodynamiques. Le premier, majoritaire (70 %) est très dynamique, avec un temps de résidence très court à la paroi (< 1 minute), ce qui correspond par analogie avec les différentes étapes de formation du biofilm, à une phase d'adhésion réversible. Le second comportement, plus minoritaire, est plus sédentaire à la paroi avec des temps d'adhésion plus longs. Cette population est significativement favorisée par des taux de cisaillements intermédiaires, notamment à 125 s^{-1} et 375 s^{-1} où plus de 10 % des bactéries restent adhérées plus de 5 minutes. Ces observations sont cohérentes avec les niveaux de colonisation plus importants observés à l'échelle de la population pour ces conditions. La question se pose de savoir si cette population sédentaire est celle qui initie le passage de l'adhésion réversible à une adhésion irréversible.
- Nous avons également observé une orientation préférentielle des bactéries adhérées dans le sens de l'écoulement, tendance qui s'accentue avec l'augmentation du cisaillement. Cela suggère que le flux n'influence pas uniquement le processus d'adhésion, mais également l'organisation spatiale des bactéries à la paroi. Il intervient également dans le déplacement des bactéries à la paroi ; avec à l'image des temps de résidence à la paroi, un profil en cloche obtenu en fonction du cisaillement, avec un maximum observé pour des taux de cisaillement intermédiaires, indiquant que ces conditions favorisent non seulement une adhésion prolongée mais également un déplacement accru à la paroi.
- Enfin, l'analyse des pseudo-plateaux et du ralentissement progressif des temps de résidence des bactéries à la paroi suggère qu'une surface partiellement colonisée devient progressivement moins favorable à l'adhésion de nouvelles bactéries. L'hypothèse d'un « hydrodynamic blocking » a été testée par modélisation, mais les résultats indiquent que ce mécanisme, à lui seul, ne suffit pas à expliquer les pseudo-plateaux observés.

Annexes chapitre 3

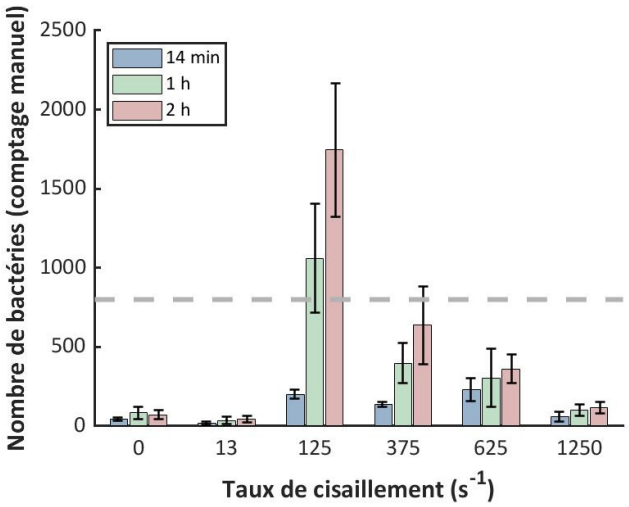


Figure SI 1. Évolution du nombre de bactéries détectées à la paroi par comptage manuel en fonction du temps et du taux de cisaillement. Le trait pointillé gris représente le seuil maximal de détection efficace du modèle de *deep learning* entraîné. Données présentées pour N=3 par condition, sauf pour 13 s^{-1} (N=2).

CHAPITRE 4 :

INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE SUR LA DYNAMIQUE DE NAGE ET DE TRANSPORT DE *S. oneidensis* PAR MICROSCOPIE HOLOGRAPHIQUE

Introduction

L'étude du transport et du transfert à la paroi des bactéries sous flux présente un intérêt scientifique majeur, car ces phénomènes précèdent la phase d'adhésion bactérienne abordée au chapitre précédent. Ils résultent de mécanismes passifs (convection, diffusion, sédimentation) ou de la motilité active des bactéries (Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Carniello *et al*., 2018 ; Palmer *et al.*, 2007 ; Wadhwa et Berg, 2022). Le couplage entre motilité et écoulement a fait l'objet de nombreuses études, révélant des comportements complexes proche des parois : accumulation bactérienne proche des surfaces (Berke *et al.*, 2008 ; Rusconi *et al*., 2014), modification des trajectoires (Khong *et al*., 2021 ; Lauga *et al.*, 2006 ; Li *et al*., 2008), nage à contre-courant (Hill *et al.*, 2007 ; Kaya et Koser, 2012) ou encore rhéotaxie (Kaya et Koser, 2012 ; Marcos *et al*., 2012). Loin des parois, les bactéries restent soumises aux forces hydrodynamiques, ce qui conditionnent leur approche et leurs interactions avec les surfaces. Plusieurs travaux théoriques et de simulation ont caractérisé ce comportement bactérien en volume (Elgeti *et al*., 2015 ; Ezhilan et Saintillan, 2015 ; Ganesh *et al*., 2023 ; Junot *et al*., 2019). Néanmoins, ces modèles souffrent d'un manque de données expérimentales quantitatives et robustes, limitant l'évaluation de leur pertinence et de leur précision.
Un obstacle majeur à l'étude expérimentale réside dans la difficulté de suivre les trajectoires bactériennes en volume sous écoulement. La vitesse du fluide, la petite taille et la vitesse intrinsèque des bactéries, ainsi que leur capacité à traverser les lignes de courant, rendent ce suivi complexe (Dubay *et al.*, 2023). Les techniques d'imagerie conventionnelles présentent en effet une profondeur de champ limitée et ne permettent pas de mesurer simultanément les trois composantes de la vitesse (Acres et Nadeau, 2021 ; Palma *et al*., 2022 ; Taute *et al*., 2015). Il apparaît donc nécessaire de recourir à des méthodes d'imagerie 3D capables de suivre individuellement les bactéries dans l'espace et le temps.

Dans ce contexte, nos objectifs sont les suivants :

(1) Exploiter la microscopie holographique en conditions d'écoulement pour suivre individuellement les bactéries en 3D dans le capillaire utilisé précédemment pour l'adhésion pionnière. Cette méthode a été validée à l'aide de traceurs passifs avant d'être appliquée au suivi de *S. oneidensis* MR-1 WT et MR-1 ΔFla. À notre connaissance, cette étude figure parmi les premières à utiliser cette approche pour caractériser la dynamique de transport bactérien sous écoulement, avec des gammes de cisaillement comparables à celles de la seule étude recensée à ce jour (Molaei et Sheng, 2016).

(2) Caractériser la dynamique de nage libre (absence de contrainte hydrodynamique) **de *S. oneidensis* MR-1**, peu documentée dans la littérature, à l'échelle individuelle (vitesses, angles, comportements de nage) et populationnelle (persistance directionnelle, comportement balistique, coefficients de diffusion).

(3) Évaluer l'influence du cisaillement (0 - 20 s^{-1}) **sur la dynamique de transport bactérien**, en examinant comment les conditions hydrodynamiques modulent l'importance relative des mécanismes de transport (convection, diffusion, motilité), ainsi que la capacité des bactéries à se déplacer activement.

Les résultats obtenus sont présentés en quatre sections :

- La première section est consacrée à la vérification du caractère motile ou non-motile des souches utilisées : *S. oneidensis* MR-1 WT et MR-1 ΔFla.
- La deuxième, d'ordre méthodologique, détaille le processus de traitement et d'analyse des trajectoires bactériennes brutes, implémenté dans le cadre de ce travail à partir des données obtenues par microscopie holographique. Elle propose également une validation du suivi bactérien en 3D par holographie en conditions d'écoulement.
- La troisième présente la caractérisation de la dynamique de nage et de transport de *S. oneidensis* en conditions d'écoulement. Cette étude est présentée sous la forme d'un article scientifique déposé sur HAL le 12/12/2025 en vue d'une soumission dans PNAS.
- Enfin, la quatrième vient compléter les travaux soumis en explorant un paramètre clé de l'hydrodynamique : le confinement. En modulant la hauteur du capillaire (50 et 200 µm, contre 100 µm dans l'article), nous avons étudié son influence sur la nage libre de *S. oneidensis* et sur son comportement sous écoulement. Ce second aspect reste toutefois à approfondir et nécessitera la réalisation d'expériences complémentaires pour être pleinement interprété.

1 Caractérisation initiale de la motilité de *S. oneidensis*

Une souche mutante MR-1 ΔFla, incapable de synthétiser son flagelle, nous a été fournie par le laboratoire DIP (UMR 7281). Son obtention était essentielle afin de distinguer les effets purement hydrodynamiques de ceux liés à la motilité bactérienne lors du transport bactérien au sein de notre système microfluidique. L'absence de motilité de cette souche, ainsi que la confirmation d'une population motile au sein de celle sauvage, ont été vérifiées par la réalisation de tests de motilité en milieu soft agar. Cette méthode, principalement qualitative est utilisée majoritairement pour distinguer les souches motiles des non motiles, notamment lors de la vérification de mutants ou pour des screening rapides de conditions expérimentales influençant la motilité. Des travaux antérieurs sur *S. oneidensis* (Armitano *et al*., 2013 ; Koerdt *et al*., 2009 ; Paulick *et al*., 2009 ; Yang et Chen, 2020) ont montré que ce test permet de distinguer les souches flagellées des non-flagellées dans les conditions utilisées ($\leq$ 0,4 % d'agar). Un exemple de migration des deux souches de *S. oneidensis* utilisées est présenté en Figure 69. Comme attendu, aucune migration n'est observée pour la souche MR-1 ΔFla, confirmant son incapacité à se déplacer activement ; seul le point de piqûre au centre de la boite grossit ce qui correspond à une croissance. Tandis qu'une migration progressive est observée

pour la souche sauvage. Ces tests, réalisés à minima 3 fois sur des suspensions indépendantes, nous permettent de valider le choix de ces deux souches pour l'étude présentée dans ce chapitre.

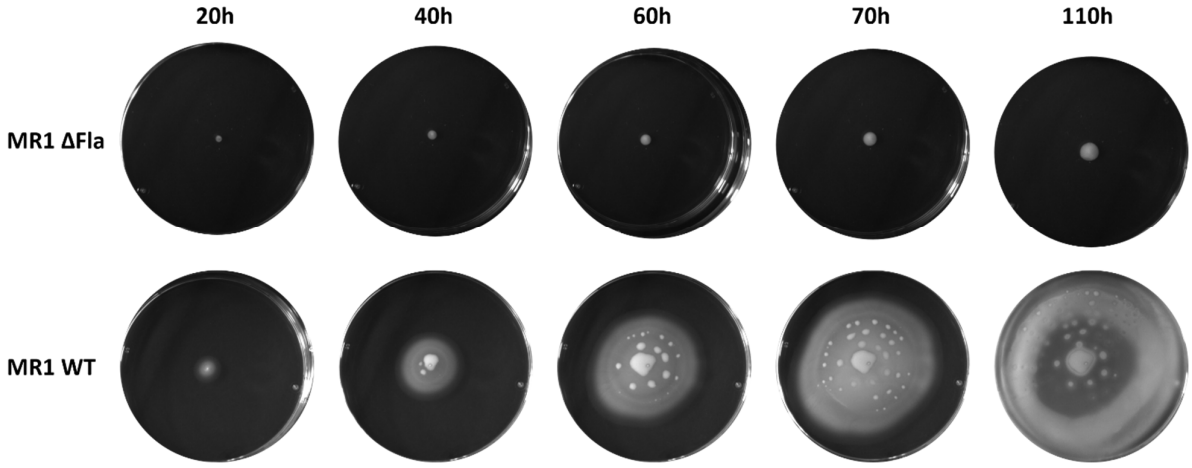


Figure 69. Exemple d'évolution temporelle de la migration de *S. oneidensis* MR-1 ΔFla et WT sur milieu LB soft agar (0,2 %). Ensemencement : 2 µL de culture (~2 × 10^8 cellules/mL), incubation à 22 ± 1 °C.

En premier lieu, les résultats de ces tests ont attiré notre attention avec le développement systématique de motifs naissant progressivement lors de la migration (Figure 70), et jamais décrits pour *S. oneidensis*. Ces motifs spatio-temporels apparaissent sous forme de spots disposés en cercles concentriques autour du point d'inoculation ; chaque cercle apparaissant à intervalles réguliers. Bien que sans lien direct avec ma thèse, ce phénomène ne pouvait être ignoré, ce qui a conduit à des tests préliminaires (non présentés) visant à identifier les facteurs déclenchant leur apparition et à vérifier d'éventuelles différenciations physiologiques au cours de la migration. Je ne développerai pas plus ce point ici.

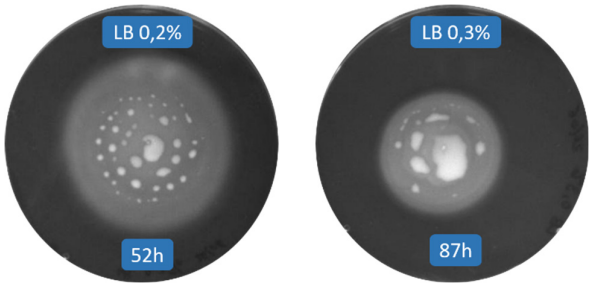


Figure 70. Exemples de migration de *S. oneidensis* MR-1 WT en milieu LB soft agar.

D'autre part, ces tests de motilité ont permis des suivis temporels de l'évolution de la migration de la souche MR-1 WT par enregistrement time-lapse. Ils montrent une progression quasi-linéaire du rayon de migration (Figure 71a), à une vitesse de 9,7 (± 1,2) µm/min, en accord avec les ordres de grandeur rapportés dans la littérature (Croze *et al*., 2011 ; Licata *et al*., 2016 ; Pfeifer *et al*., 2022) et sans alternance de phases d'arrêt/nage, contrairement à *Proteus mirabilis* par exemple, où la migration cyclique forme des terrasses concentriques (Hoeniger, 1964 ; Kearns, 2010 ; Rauprich *et al*., 1996).

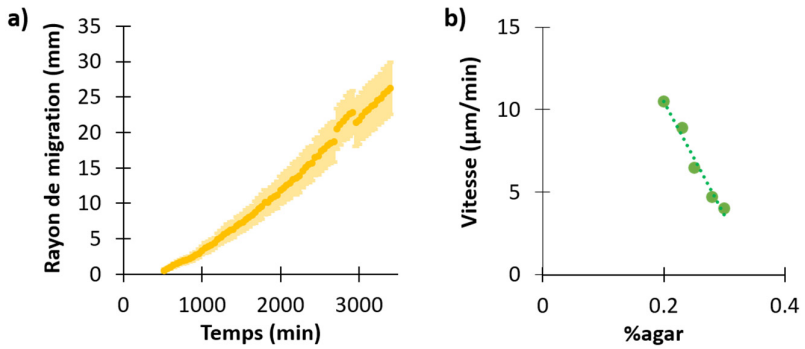


Figure 71. a) Cinétique de migration de *S. oneidensis* MR-1 WT sur LB soft agar (0,2%), incubé à 22 ± 1 °C. (moyenne ± écart type, N=7). b) Vitesse de migration en fonction du pourcentage d'agar. Les mesures ont été réalisées avec N=1 pour les conditions, à l'exception de 0,2 % d'agar (N=7) et 0,3 % d'agar (N=3).

Des cinétiques de migration ont été évaluées sous différentes conditions connues pour influencer la motilité. Les résultats ne seront pas détaillés ici, mais les tendances principales sont les suivantes. L'augmentation de la viscosité du milieu, modulée par la concentration en agar (Figure 71b), réduit la vitesse de migration d'un facteur 2,5 entre 0,2 % et 0,3 % d'agar et l'inhibe complètement au-delà de 0,4 %. L'élévation de la température à 30°C, température optimale de *S. oneidensis* (Venkateswaran *et al*., 1999) accélère la migration, tandis que la concentration en sel, testée en raison du moteur sodium pomAB dominant de *S. oneidensis* (Duhl *et al*., 2018 ; Paulick *et al*., 2009) n'a pas d'effet significatif. Enfin, la richesse nutritive du milieu affecte la motilité : maximale en LB, elle diminue d'un facteur 1,3 pour un LB dilué 10 fois et est nulle dans un LB concentré 10 fois, probablement en raison de l'augmentation de la viscosité ou d'un effet toxique lié à l'excès de nutriments. Bien que ces conditions ne reproduisent pas l'habitat naturel bactérien, elles influencent la motilité bactérienne. Pour l'étude présentée ci-après ces paramètres ont été fixés, en gardant à l'esprit que d'autres conditions auraient pu produire des comportements légèrement différents.

2 Méthodologie et validation du suivi 3D par holographie

Les paragraphes suivants décrivent le protocole expérimental mis en œuvre pour étudier les propriétés de transport de *S. oneidensis* sous écoulement. Cette section présente également la méthodologie implémentée pour le traitement des trajectoires brutes obtenues par holographie, ainsi que sa validation.

2.1 Protocole expérimental

Le système microfluidique, connecté à un pousse-seringue (chapitre 2 paragraphe 4.1), a été positionné sur la platine d'observation du microscope inversé. Après préparation et caractérisation de l'inoculum bactérien (souche MR-1 et MR-1-R Δfla) en termes de biomasse totale, PI^+ et cultivabilité (chapitre 2 paragraphe 2), le système a été ensemencé en boucle ouverte pendant une durée maximale de 2h. Les débits imposés ont été déterminés de manière à assurer, pour chacun des confinements étudiés (h = 50,

100 et 200 µm), des taux de cisaillement pariétaux identiques ($\dot{\gamma}_w$ = [0, 2, 5, 8, 10, 20] s^{-1}). Les débits correspondants sont respectivement Q = [0 ; 0,3] µL/min pour h = 50 µm, Q = [0 ; 2] µL/min pour h = 100 µm, et Q = [0 ; 16] µL/min pour h = 200 µm. Par ailleurs, la concentration cellulaire a été ajustée en fonction du confinement afin de maintenir des conditions optimales pour l'holographie en ligne, soit environ 100 bactéries dans le champ d'observation. Les concentrations bactériennes correspondantes sont C = (4 ± 0,2) × 10^8 cellules/mL pour h = 50 µm, C = (2 ± 0,3) × 10^8 cellules/mL pour h = 100 µm, et C = (1 ± 0,3) × 10^8 cellules/mL pour h = 200 µm. Trois réplicats biologiques ont été réalisés ; chacun incluant l'ensemble des débits testés.

Le système microfluidique est éclairé par une diode laser, et les hologrammes générés sont enregistrés à l'aide d'une caméra. Ces derniers sont ensuite analysés afin de détecter les positions des bactéries dans le volume et reconstruire leurs trajectoires individuelles. Pour rappel, la formation, l'enregistrement et le traitement des hologrammes sont détaillés dans le chapitre 2 paragraphe 6. Enfin, les trajectoires obtenues sont analysées selon la méthodologie présentée ci-après.

2.2 Traitement des trajectoires brutes

Une fois l'étape de tracking réalisée, nous obtenons l'ensemble des trajectoires analysées au cours de l'essai. Le nombre de bactéries suivies est conséquent, conférant à notre étude une robustesse statistique importante. À titre d'exemple, le Tableau 12 présente le nombre moyen de bactéries analysées selon les conditions hydrodynamiques testées. Par rapport à la littérature (Tableau 4 et Tableau 5), notre étude se distingue à la fois par le nombre élevé de bactéries suivies pendant l'expérience et par sa réalisation sous flux, une configuration plus contraignante en raison de la vitesse de déplacement accrue des bactéries.

Tableau 12. Nombre moyen de bactéries analysées par condition hydrodynamique testée (3000 hologrammes par condition, capillaire de 100 µm, N = 3-6 selon la condition).

$\dot{\gamma}_w$ (s^{-1})	0	2	5	8	10	20
Nombre de bactéries N_b	3997	2731	4231	8568	7287	8102

Lissage des trajectoires bactériennes

Les trajectoires obtenues sont ensuite exploitées pour calculer des grandeurs caractéristiques du transport bactérien, telles que la vitesse instantanée le long de chaque trajectoire. Toutefois, l'estimation de ces grandeurs est inévitablement affectée par un certain niveau de bruit, résultant principalement de la précision de la détection du centre de masse des bactéries. En effet, en raison de leur morphologie ellipsoïdale, la répartition de l'intensité de la lumière diffractée est fortement modifiée par l'orientation de la bactérie dans l'écoulement. Pour réduire ce bruit de mesure, la stratégie employée consiste à filtrer les trajectoires en les convoluant avec une gaussienne tronquée de largeur w (en nombre de pas de temps) et de fenêtre k. Le noyau gaussien est défini par :

$$K_w(\tau) = A_w e^{-\frac{\tau^2}{w^2}} + B_w \quad (1)$$

Où les paramètres A_w et B_w sont déterminés par les conditions suivantes :

$$K_w\left(\pm\frac{k}{2}\right) = 0 \quad ; \quad \int_{-k/2}^{k/2} K_w(t)dt = 1 \quad (2)$$

Ces conditions garantissent respectivement que la gaussienne est tronquée aux bords de la fenêtre et que le noyau est normalisé. Le paramètre w définit l'importance relative des points voisins qui contribuent au filtrage d'un point donné ; tandis que la fenêtre k fixe la longueur totale de la portion de trajectoire utilisée pour le calcul de la convolution. Cette méthode de filtrage a été initialement proposée par Mordant *et al.* (2004) et reprise par la suite dans le cadre du suivi lagrangien de particules (Basset, 2023 ; Laplace, 2022 ; Ouellette, 2006). Le choix du filtre est déterminant : un filtrage trop large lisse excessivement les trajectoires et raccourcit leur longueur exploitable. Quelques valeurs de w ont été testées, sans différence notable, d'où le choix de k = 3w, comme rencontré dans la littérature. De plus, comme détaillé dans les sections suivantes, *S. oneidensis* présente un comportement de nage relativement fluide, caractérisé par de longs runs, ce qui limite la nécessité d'un filtrage important.

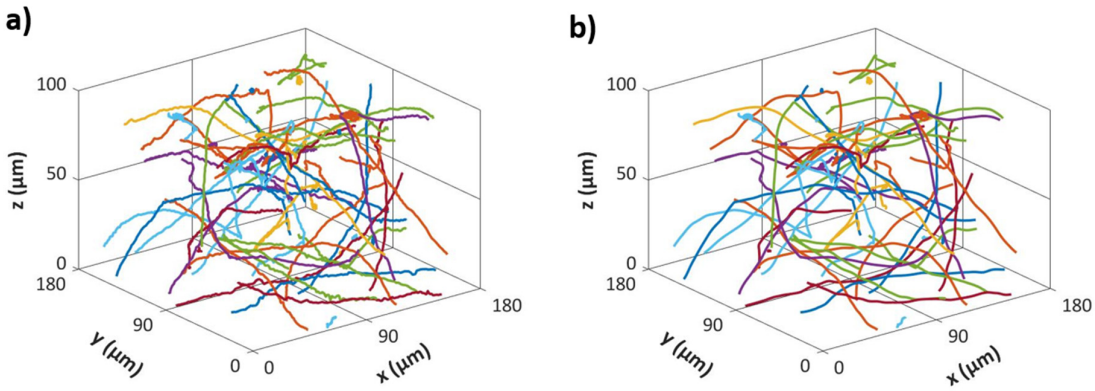


Figure 72. Trajectoires bactériennes (N_b = 50) obtenues en condition statique au sein d'un capillaire de 100 µm, brutes **(a)** et après application du filtre de convolution **(b).**

L'effet de ce filtrage sur la position des bactéries est illustré à l'échelle populationnelle en Figure 72, et pour une bactérie isolée en Figure 73, où sa trajectoire globale est décomposée selon ses trois composantes $x(t)$, $y(t)$ et $z(t)$. À l'échelle populationnelle (Figure 72), le filtrage produit un lissage cohérent des trajectoires, confirmé à l'échelle individuelle (Figure 73 b-d) par la très bonne superposition entre les signaux bruités et filtrés. Cela confirme que le filtrage corrige principalement le bruit inhérent à la mesure, sans altérer significativement la dynamique bactérienne. Cette méthode de convolution a donc été retenue pour le post-traitement des trajectoires obtenues.

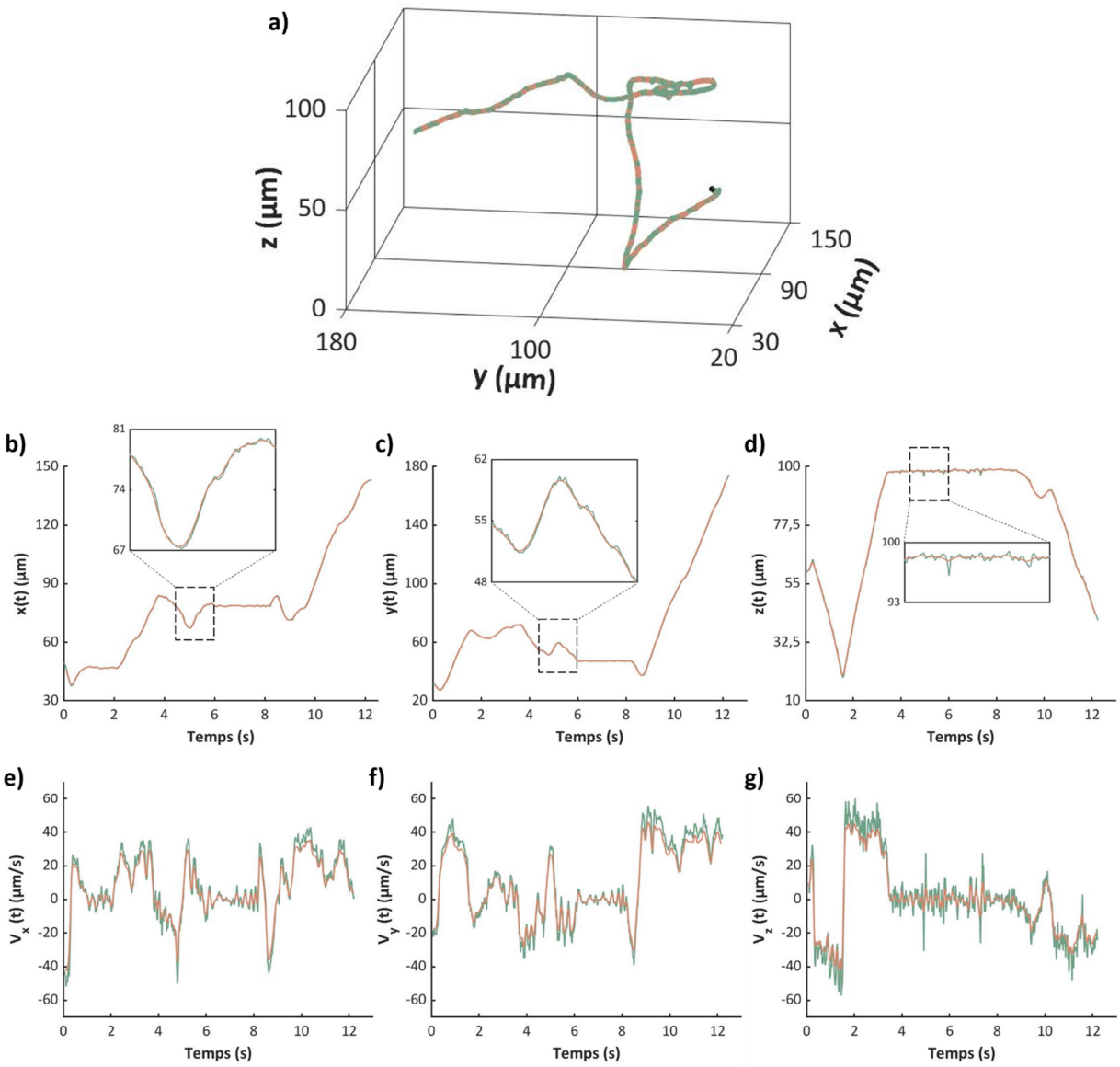


Figure 73. Trajectoire d'une bactérie isolée avec superposition de la trajectoire brute (en vert) et après application du filtre de convolution (en orange) : (**a**) trajectoire globale, et évolution de sa position **(b)** en x, **(c)** en y et **(d)** en z au cours du temps. Composantes de la vitesse correspondantes **(e)** en x, **(f)** en y, et **(g)** en z, comparées aux vitesses calculées par la méthode des différences finies centrées avec Δt = 0,1s.

Détermination des vitesses bactériennes

Le calcul des vitesses le long des trajectoires est réalisé en convoluant les positions brutes par la dérivée du noyau Gaussien utilisé pour lisser les trajectoires (Basset, 2023 ; Mordant *et al*., 2004 ; Ouellette, 2006). Cette approche présente l'avantage de réduire le bruit tout en étant indépendante du choix du pas de temps Δt contrairement aux méthodes de différences finies, qui y sont très sensibles. La Figure 74a illustre cette dépendance, avec à titre d'exemple une diminution de 20 % de la vitesse estimée lorsque le pas de temps varie de 2 à 100 ms. Le choix du Δt est crucial et doit être réfléchi en fonction de la vitesse de la bactérie et de son comportement de nage. Par exemple, une bactérie effectuant des « tumbles » fréquents

nécessitera un Δt plus court qu'une bactérie présentant une trajectoire homogène de type « long run ». Dans le cadre de notre étude sous flux, il aurait été essentiel d'optimiser ce Δt pour chaque condition expérimentale afin de prendre en compte la dynamique des bactéries sous écoulement. Ainsi, la méthode de convolution a été privilégiée, après validation de sa pertinence. L'évolution des composantes de la vitesse instantanée (V_x, V_y, V_z) de la bactérie isolée obtenue par les deux méthodes est présentée à la Figure 73 (e-g). Les profils sont globalement similaires, bien que la méthode par convolution produise un léger lissage des courbes. À l'inverse, la méthode des différences finies génère un signal plus bruité en raison de sa sensibilité au pas de temps. La Figure 74 (b,c) compare quantitativement les deux méthodes pour trois conditions de cisaillement. Les distributions sont globalement similaires, bien qu'une légère élévation soit observée pour la méthode des différences finies, avec un facteur moyen de 1,14 par rapport à la convolution, et une corrélation satisfaisante entre les méthodes. Au vu de ces résultats, la méthode de convolution a été retenue pour le calcul des vitesses le long des trajectoires des bactéries.

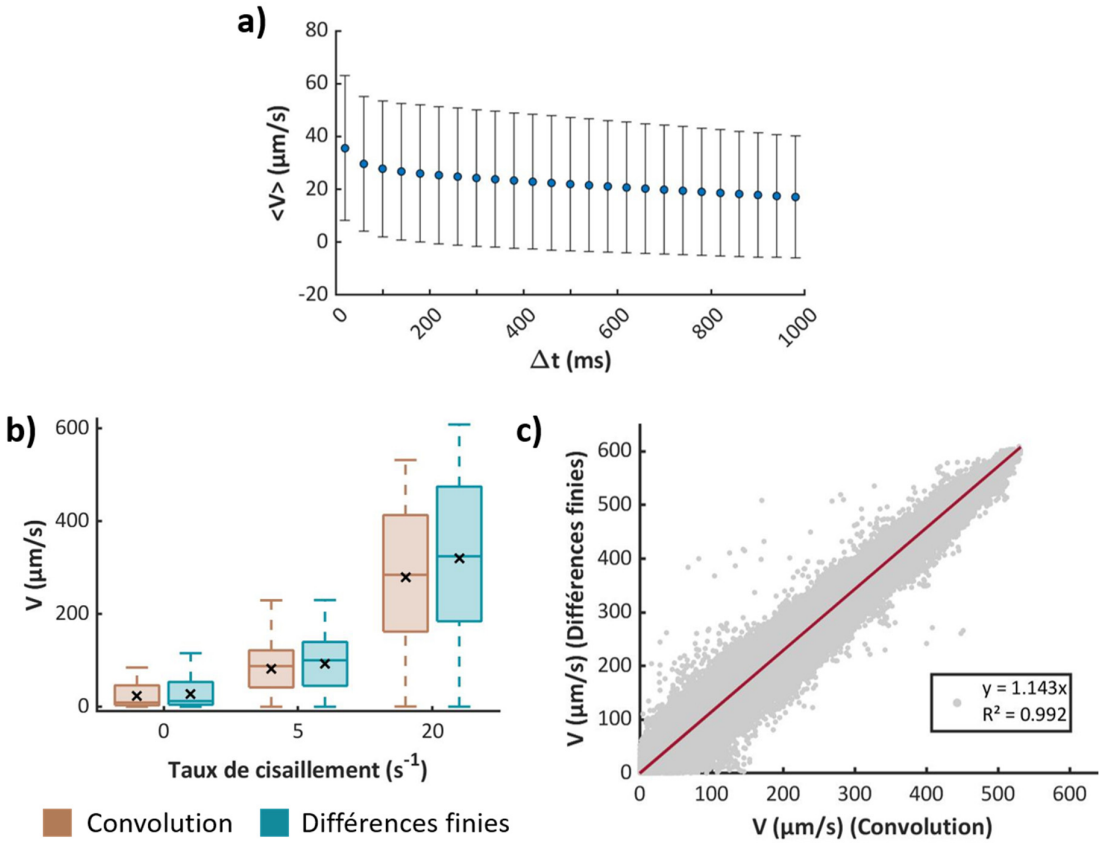


Figure 74. **a)** Vitesse bactérienne moyenne (3500 bactéries analysées) en condition statique, obtenue par la méthode des différences finies, en fonction du pas Δt. **b)** Boxplots des distributions de vitesses instantanées pour différents cisaillements et calculées par les deux méthodes, avec Δt = 0,1s pour la méthode des différences finies (n = 31 979, 13 323, 16 576 bactéries pour les cisaillements de 0, 5 et 20 s^{-1}). La croix indique la moyenne. **c)** Corrélation entre les vitesses obtenues par les deux méthodes, basée sur l'ensemble des valeurs présentées en (b).

2.3 Analyse des trajectoires lissées

Une fois le traitement des trajectoires brutes effectué, différents programmes Matlab ont été développés au cours de ma thèse afin d'analyser ces trajectoires. Cette analyse a été menée à l'échelle individuelle, en termes de vitesse instantanée, d'orientation et d'angle de réorientation ainsi qu'à l'échelle populationnelle, par la caractérisation des propriétés de nage libre (en l'absence de contrainte hydrodynamique) de *S. oneidensis*. Cette dernière approche permet d'accéder au temps de persistance de nage de la bactérie, ainsi qu'à ses coefficients de diffusion translationnelle et rotationnelle. Une classification a également été implémentée afin de regrouper les bactéries selon leur mécanisme de transport (convection, diffusion, motilité). Cette étape a permis de cibler spécifiquement la population motile au cours de nos travaux, l'idée étant d'étudier le couplage écoulement et motilité. L'évaluation de ces paramètres, ainsi que l'influence de l'hydrodynamique sur ces derniers, fait l'objet d'une publication soumise, présentée en partie 3 du chapitre. Néanmoins, afin de faciliter la lecture et la compréhension de cet article, nous rappelons ici brièvement les formules utilisées, ainsi que les notions associées lorsque cela s'avère nécessaire.

À l'échelle individuelle, chaque trajectoire a été analysée afin d'extraire les grandeurs suivantes :

- **Vitesse instantanée : V**

Une fois les composantes de vitesse V_x, V_y, V_z obtenues par convolution, la vitesse instantanée de la bactérie V à un instant t donné est calculée comme suit :

$$V(t) = \sqrt{V_x(t)^2 + V_y(t)^2 + V_z(t)^2} \quad (4)$$

À titre d'exemple, la trajectoire individuelle présentée en Figure 75a est colorée en fonction de sa vitesse instantanée, illustrant l'hétérogénéité intrinsèque de la nage au cours du temps, avec un ralentissement observé à proximité des parois et lors des mouvements de réorientation.

- **Orientation**

L'orientation instantanée de la bactérie dans le volume est représentée par un vecteur unitaire d'orientation $\vec{p}$**(t)** (Ezhilan et Saintillan, 2015 ; Junot *et al.*, 2019) (Figure 75b) :

$$\vec{p}(t) = \left(m_x(t), m_y(t), m_z(t)\right) \quad (5)$$

Avec m_x, m_y, $et\ m_z$ les composantes directionnelles le long des axes x, y et z. À chaque instant t, elles sont calculées à partir des composantes de vitesse instantanée :

$$m_x(t) = \frac{V_x(t)}{V(t)} \; ; \; m_y(t) = \frac{V_y(t)}{V(t)} \; ; \; m_z(t) = \frac{V_z(t)}{V(t)} \quad (6)$$

L'évolution de ces composantes pour la même trajectoire est présentée en Figure 75 (c-e), projetée dans un plan 2D pour faciliter la lecture.

- **Angle de réorientation : θ**

L'angle de réorientation (Figure 75b) entre deux directions successives à t et $t + \Delta t$ est calculé à partir des vecteurs d'orientation $\overrightarrow{p_1} = \left(m_x(t), m_y(t), m_z(t)\right)$ et $\overrightarrow{p_2} = \left(m_x(t + \Delta t), m_y(t + \Delta t), m_z(t + \Delta t)\right)$, selon le produit scalaire : $\cos(\theta) = \overrightarrow{p_1} \cdot \overrightarrow{p_2}$. L'angle θ est ensuite obtenu par la fonction cosinus inverse et converti en degrés (0 - 180°). Le pas de temps Δt a été fixé à 0,1s, garantissant que la bactérie se déplace moins de deux fois sa propre longueur pendant cet intervalle.

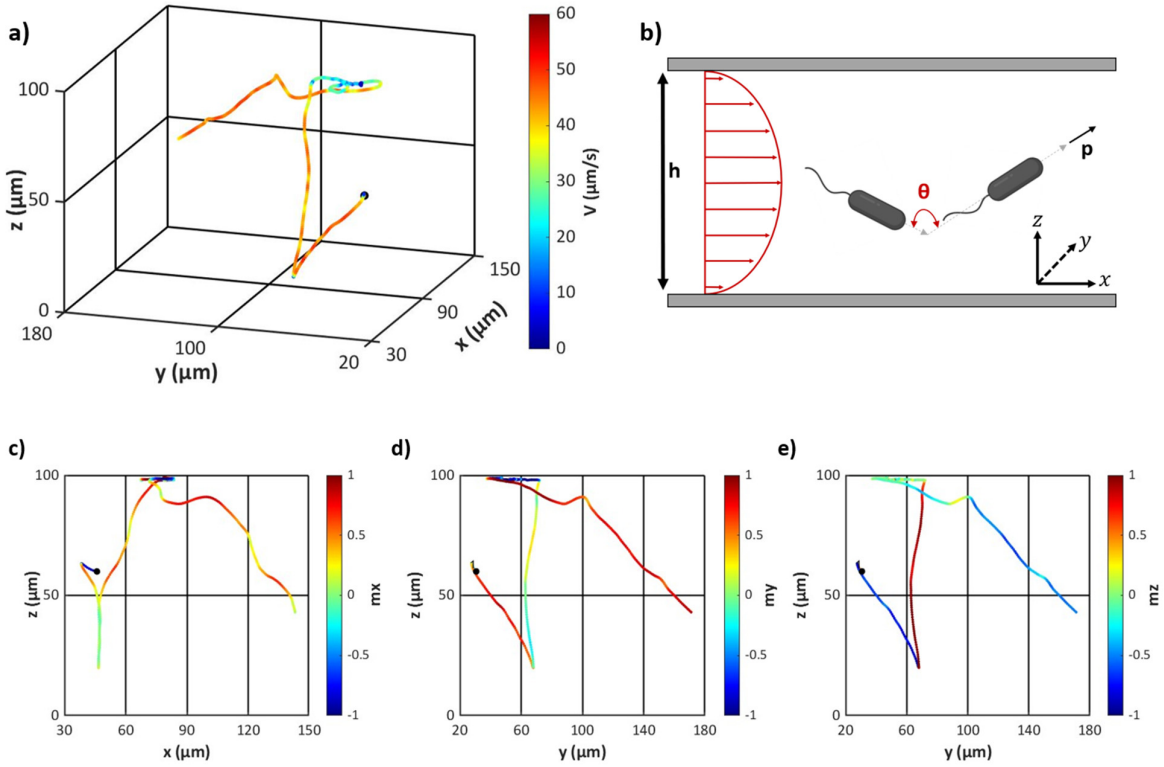


Figure 75. **a)** Trajectoire d'une bactérie isolée colorée selon sa vitesse instantanée le long de sa trajectoire. **b)** Illustration du vecteur d'orientation unitaire p et de l'angle de réorientation θ au sein du capillaire. **(c-e)** Projection 2D de la trajectoire, colorée selon les composantes directionnelles, m_x, m_y, m_z, respectivement.

À l'échelle populationnelle, nous nous sommes intéressés à la distribution des bactéries le long de l'axe z du capillaire. Cette concentration bactérienne a été analysée de la manière suivante :

- **Concentration au sein du caillaire : c(z)**

La hauteur du capillaire a été divisée en couches (bins) de 5 µm d'épaisseur avec n_{bin} le nombre total de bins. Pour chaque hologramme enregistré, le nombre de bactéries présentes dans chaque bin, n_z, est compté puis normalisé par le nombre moyen de bactéries par bin, n_{moyen}, avec $n_{moyen} = \frac{n_{total}}{n_{bin}}$.

La concentration normalisée est alors donnée par : $c(z) = n_z / n_{moyen}$. Le profil ainsi obtenu est ensuite moyenné sur l'ensemble des 3 000 hologrammes enregistrés par expérience, puis exprimé en fonction de la profondeur normalisée z/h, où h est la hauteur du capillaire. On obtient donc $c(z/h)$.

Le déplacement quadratique moyen et la fonction d'autocorrélation de l'orientation ont également été calculés. Les paragraphes suivants présentent les formules utilisées ; pour rappel ces notions sont un peu plus détaillées au Chapitre 1 paragraphe 2.2.2.2.

- **Le déplacement quadratique moyen (MSD)**

Le MSD (Berg, 2000 ; Codling *et al*., 2008 ; Lovely et Dahlquist, 1975) a été calculé en condition statique selon la formule :

$$< r^2 > = < [x(t + \Delta t) - x(t)]^2 + [y(t + \Delta t) - y(t)]^2 + [z(t + \Delta t) - z(t)]^2 > \quad (7)$$

Où $x(t), y(t), z(t)$ représentent les coordonnées spatiales de la bactérie à l'instant t, et Δt le pas de temps entre deux mesures. Pour chaque bactérie, ce dernier a été calculé pour toutes les valeurs possibles de Δt, en effectuant d'abord, pour chaque Δt, une moyenne temporelle le long de la trajectoire. Une moyenne d'ensemble sur l'ensemble des bactéries a ensuite été réalisé afin d'obtenir une estimation robuste du MSD. Le MSD fournit des informations sur le transport bactérien, et permet de distinguer les mouvements de type balistique ou diffusif. Le mouvement balistique se traduit par une augmentation quadratique du MSD avec le temps (MSD $\propto$ t²), caractéristique d'un déplacement à vitesse constante et en ligne droite. À l'inverse, le mouvement diffusif, typique du mouvement brownien, où les bactéries se déplacent de manière aléatoire et sans persistance directionnelle, se traduit par une relation linéaire entre le MSD et le temps (MSD $\propto$ t). En ajustant les courbes de MSD selon la loi d'échelle : $< r^2 > \propto t^{\alpha}$, il est possible d'extraire la vitesse moyenne de nage de la population dans le régime balistique et le coefficient de diffusion translationnelle D_t dans le régime diffusif.

- **Fonction d'autocorrélation de l'orientation**

La persistance directionnelle de nage de *S. oneidensis* en l'absence de contrainte (condition statique) a été quantifiée à l'aide de la fonction d'autocorrélation de l'orientation (Berg, 1993 ; Clément *et al*., 2016 ; Saragosti *et al.*, 2011) : $c(\Delta t) = < \vec{p}(t).\vec{p}(t + \Delta t) >_t$, où $\vec{p}$ est le vecteur unitaire d'orientation à l'instant t et Δt le pas de temps. Par analogie avec le MSD, l'autocorrélation a été calculée pour toutes les valeurs possibles de Δt, en effectuant d'abord une moyenne temporelle pour chaque Δt, puis une moyenne d'ensemble sur toutes les bactéries. La fonction d'autocorrélation (Figure 3e de l'article) décroit de manière exponentielle (Saragosti *et al.*, 2012) : $c(\Delta t) = e^{-\frac{\Delta t}{t_c}}$ ce qui permet de déterminer le temps de persistance de nage caractéristique t_c, c'est-à-dire la durée moyenne pendant laquelle l'orientation de nage reste corrélée. Ce temps de persistance donne également accès au coefficient de diffusion rotationnelle D_r (rad²/s) selon la relation : $D_r = \frac{1}{2 * t_c}$.

Classification des trajectoires bactériennes

Finalement, l'ensemble des bactéries détectées a été classé selon leur mécanisme de transport dans le flux (diffusion, convection ou motilité active). Un exemple est présenté en Figure 76.

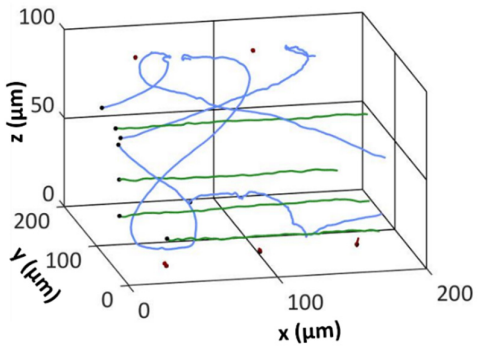


Figure 76. Exemples représentatifs de trajectoires de la souche sauvage de *S. oneidensis* acquises sous écoulement ($\dot{\gamma}_w$= 5 s^{-1}). Après classification, les trajectoires se répartissent : en marron les bactéries diffusées / immobiles, en vert les bactéries convectées et en bleu les bactéries motiles.

- **Bactéries diffusées**

Ces bactéries, uniquement soumises au mouvement brownien, présentent par définition une portée de déplacement limitée au sein du volume, déterminée uniquement par leur coefficient de diffusion et leur temps d'analyse. Ainsi, en supposant que les bactéries étaient uniquement soumises à la diffusion, un déplacement théorique maximal ($L_{diffusion}$) a été calculé pour chaque bactérie selon la formule : $L_{diffusion} = \sqrt{D * t}$ en fixant un coefficient de diffusion D = 0,7 µm²/s (Kim, 1996 ; Nossal et Chen, 1972 ; Stock et Jenkins, 1978) et où t correspond au temps d'analyse de la bactérie considérée. Ce déplacement théorique a ensuite été comparé à la distance maximale parcourue par la bactérie à partir de sa position initiale. Si cette distance maximale était inférieure à 5*$L_{diffusion}$, la bactérie était classée comme « diffusée ». Notons que cette catégorie inclue également les bactéries adhérées aux parois, qui ne se déplacent pas. Cependant, comme notre étude ne portait pas spécifiquement sur ces bactéries immobiles, nous n'avons pas cherché à les distinguer davantage.

- **Bactéries convectées**

Ces bactéries, simplement entraînées par le flux le long des lignes de courant (régime laminaire), présentent par définition des trajectoires globalement rectilignes avec peu ou pas de déplacement transversal suivant y et z. Afin d'identifier ces bactéries, deux métriques de déplacement ont été déterminées :

- **La longueur totale de la trajectoire bactérienne (DL)** :

$$DL = \sum_{i=1}^{n-1} \sqrt{\big(x(i+1) - x(i)\big)^2 + \big(y(i+1) - y(i)\big)^2 + \big(z(i+1) - z(i)\big)^2} \qquad (9)$$

Où x, y et z sont les coordonnées de la bactérie à chaque instant et n la longueur de la trajectoire.

- **Le déplacement net (L) :**

$$L = \sqrt{(x(final) - x(initial))^2 + (y(final) - y(initial))^2 + (z(final) - z(initial))^2} \qquad (10)$$

Où x, y et z représentent les coordonnées initiales et finales de la bactérie.

Le rapport $^{DL}/_{L}$ sert de mesure de la tortuosité de la trajectoire (Dentz *et al.,* 2022 ; Scheidweiler *et al*., 2020), des valeurs proches de 1 indiquant un déplacement rectiligne. En combinant ce paramètre avec les déplacements maximaux en y et z par rapport à la position initiale, les bactéries ont été classées comme convectées lorsque $^{DL}/_{L}$ < 10 et que les déplacements en y et $z \leq 10$ µm. Selon ces critères, les bactéries sont considérées comme se déplaçant le long des lignes de courant, c'est-à-dire convectées.

- **Bactéries motiles**

Enfin, l'ensemble des bactéries non classées comme diffusées ou convectées a été considéré comme motile. Ces critères de classification ont été validés expérimentalement lors des essais réalisés avec des traceurs passifs et la souche mutante Δfla, pour lesquelles aucune motilité n'était attendue, et effectivement aucune n'a été observée. En complément, une analyse qualitative a été effectuée par inspection visuelle des trajectoires afin de vérifier la cohérence des comportements observés avec les catégories attribuées. De plus parmi les bactéries motiles, différents comportements de nage ont été observés (Figure 77), conduisant à une classification complémentaire selon la nature de leur mouvement :

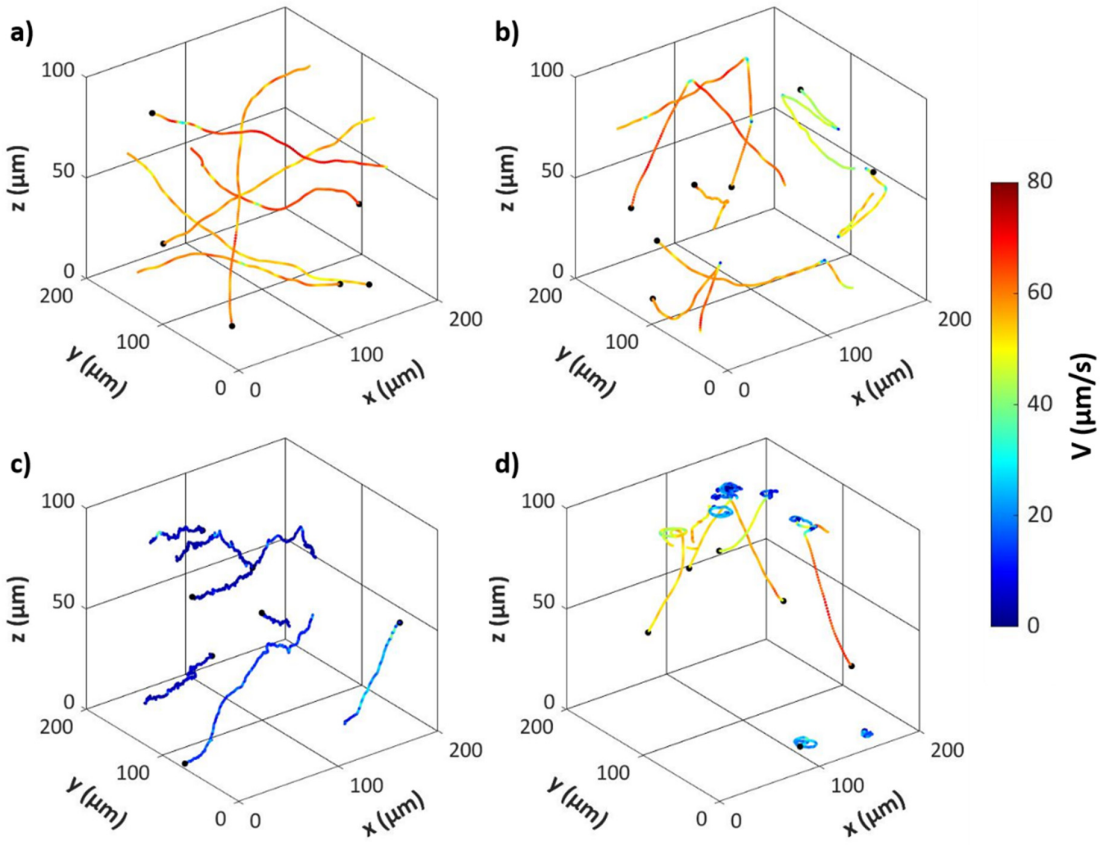


Figure 77. Exemples représentatifs de trajectoires de nage de la souche sauvage de *S. oneidensis*, acquises en condition statique. Les trajectoires sont codées en couleur selon la vitesse instantanée de nage (voir barre de couleur à droite) et le point de départ de chaque trajectoire est indiqué par un point noir. Les trajectoires illustrent différents comportements de nage : **a)** Runs longs, rectilignes ou légèrement courbés ; **b)** Dynamique run-and-tumble ; **c)** Nage lente ; **d)** Bactéries proches des parois.

a) Bactéries à trajectoires rectilignes ou faiblement courbées : se déplacent par de long « runs », avec des angles de réorientation inférieurs à 50°.

b) Bactéries de type run-and-tumble : se déplacent par alternance de phases de « run » et de réorientation « tumble », définies ici par des angles de réorientation supérieurs à 50° (Berg et Brown, 1972 ; Molaei et Sheng, 2016).

c) Bactéries à faible vitesse : se déplacent dans le volume à une vitesse inférieure à 15 µm/s pendant au moins 1s. Déjà rencontré en proportion minoritaire chez d'autres espèces (Molaei *et al.*, 2014).

d) Bactéries proches des parois : présentent un déplacement prolongé (>1s) à proximité des parois (z<5 µm et z>95 µm) avec des trajectoires majoritairement circulaires.

2.4 Validation et reproductibilité des mesures

Avant l'utilisation de la microscopie holographique en routine dans le cadre de notre étude, une étape préalable de validation des données obtenues s'est avérée nécessaire. L'objectif était de s'assurer de la fiabilité des mesures réalisées par l'outil, ainsi que de sa reproductibilité d'un réplicat à l'autre. Cette validation a été conduite en prenant la vitesse comme paramètre d'évaluation. Les paragraphes suivants présentent les résultats obtenus.

2.4.1 Validation par profil de Poiseuille

Afin de valider la cohérence des vitesses mesurées sous flux par microscopie holographique, des billes de latex de 2 µm, considérées comme traceurs passifs, ont été utilisées dans un premier temps pour l'ensemble des conditions de débit étudiées (Figure 78). Les profils expérimentaux des vitesses moyennes dans le sens de l'écoulement ($V_x(\frac{z}{h})$) ont été établis en fonction de la position z, normalisée par la hauteur du capillaire (h = 100 µm), puis comparés au profil théorique de Poiseuille attendu (Chapitre 1 paragraphe 1.3). Si les mesures sont correctes, les vitesses longitudinales des traceurs doivent se superposer au profil théorique. De plus, aucune composante vitesse selon y ou z n'est attendue, les billes étant uniquement entraînées par convection. La Figure 78a présente quelques trajectoires obtenues à faible débit, montrant un comportement rectiligne des billes, aligné dans la direction x de l'écoulement, cohérent avec une simple convection des particules. Les profils expérimentaux de vitesse obtenus dans le sens de l'écoulement présentent l'allure caractéristique d'une parabole, signature du profil de vitesse de Poiseuille. Ces profils se superposent fidèlement aux courbes théoriques attendues pour les différents débits testés, validant ainsi la précision des mesures effectuées par holographie, ainsi que la concordance entre le débit imposé et le débit effectivement observé. Une légère perte de données est constatée près de la paroi supérieure, liée à la sédimentation des billes. Enfin, les profils selon y et z confirment l'absence de composante de

vitesse transverse (Figure 78 c,d). La variabilité légèrement plus importante observée en z est attribuée à la résolution plus faible de la mesure dans cette direction par rapport au plan x-y.

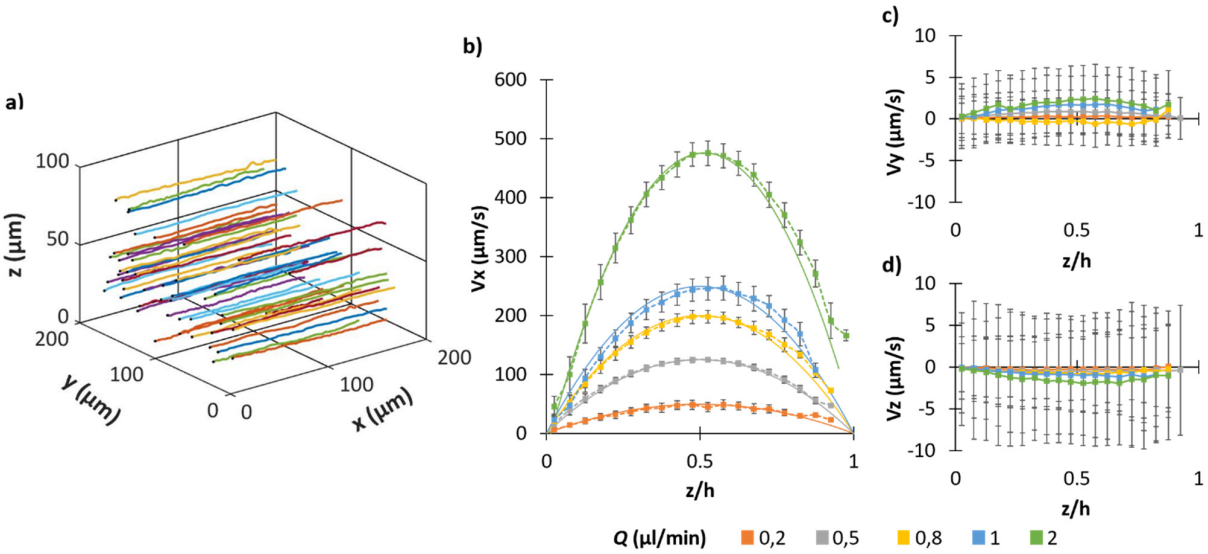


Figure 78. **a)** Trajectoires de billes de latex de 2 µm (N_{billes} = 50) obtenues à 2 s^{-1} (Q = 0,2 µL/min) au sein du capillaire. **b)** Profils moyens de la composante de vitesse $V_x(z/h)$, obtenus par microscopie holographie pour ces traceurs passifs. Les symboles en pointillées représentent les données expérimentales et la ligne solide le profil théorique de Poiseuille. **(c-d)** Profils moyens des composantes de vitesses $V_y(z/h)$ et $V_z(z/h)$ obtenus dans les mêmes conditions expérimentales. Le nombre total de billes analysées par condition est de 1 176 (0,2 µL/min), 3 346 (0,5 µL/min), 4 270 (0,8 µL/min), 4 482 (1 µL/min), 3 993 (2 µL/min).

Cette validation a ensuite été étendue aux bactéries étudiées (Figure 79) :

a) Souche MR-1 ΔFla, dépourvue de flagelle. Comme ces bactéries ne sont pas motiles, elles sont uniquement entraînées par convection. On s'attend donc à un comportement similaire à celui des traceurs passifs. Cette étape permet de vérifier la fiabilité du suivi pour des objets biologiques plus complexes et dont la détection par holographie est plus difficile en raison de leur faible diffraction.

b) Souche MR-1 WT, une partie de ces bactéries étant motile, des déviations par rapport au profil de Poiseuille pourraient être attendues.

Les profils expérimentaux dans la direction de l'écoulement pour la souche MR-1 Δfla sont globalement similaires à ceux des traceurs passifs, avec des écarts-types comparables et des phénomènes de sédimentation également observables (Figure 79a). Pour la souche MR-1 WT, les profils moyens se superposent en grande partie au profil théorique, mais certaines différences apparaissent (Figure 79b). Tout d'abord, on note des petites déviations par rapport au profil parabolique, surtout à faible débit et près des parois. De plus, les écarts-types autour des vitesses moyennes sont beaucoup plus importants que pour les billes ou la souche ΔFla. Cette observation est confirmée pour les graphiques de la Figure 79 (c-f) qui superposent, pour deux débits, le profil expérimental moyen, le profil théorique et l'ensemble des vitesses

individuelles pour les souches MR-1 ΔFla et WT. Pour la souche sauvage (Figure 79 d et f), une large distribution des vitesses selon x est observée, résultat illustrant la dynamique de nage des bactéries et leur capacité à se déplacer activement dans l'écoulement.

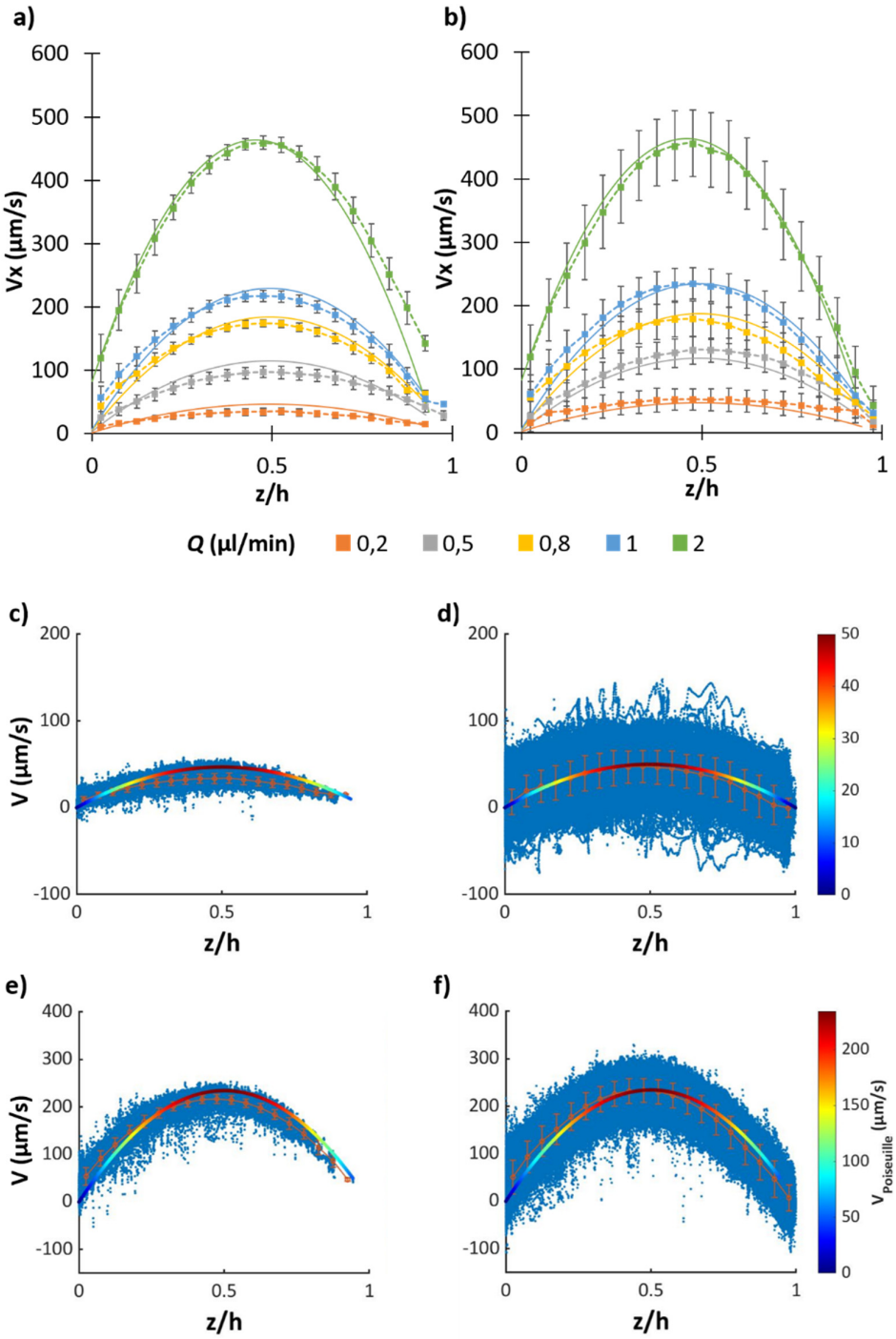


Figure 79. **(a-b)** Profils moyens des vitesses $V_x(z/h)$ obtenus par microscopie holographie pour la souche MR-1 ΔFla **(a)** et MR-1 WT **(b)** sous différentes conditions de débit. Les symboles en pointillés représentent les données expérimentales et la ligne solide le profil théorique de Poiseuille. L'écoulement est le long de l'axe x et la position z est normalisée par la hauteur du capillaire (100 µm). **(c-d)** Profils moyens à 0,5 µL/min **(e-f)** et 1 µL/min pour les mêmes objets (c,e : MR-1 ΔFla ; d,f : MR-1 WT), comparés au profil théorique et incluant toutes les vitesses individuelles mesurées.

2.4.2 Reproductibilité des mesures expérimentales

La reproductibilité des mesures de vitesse obtenues par microscopie holographie a été évaluée sous différentes conditions d'écoulement. La Figure 80 présente les distributions des vitesses instantanées mesurées pour l'ensemble des bactéries analysées pour trois conditions de cisaillement distinctes : 0, 5 et 20 s^{-1}. Chaque condition correspond à un triplicat expérimental, à l'exception de la condition en statique pour laquelle N=4. Les distributions obtenues présentent des profils très similaires, avec une forte superposition observée quelle que soit l'intensité du cisaillement appliqué. Cela traduit une excellente reproductibilité expérimentale et justifie la fusion des données entre elles afin d'accroître la robustesse statistique.

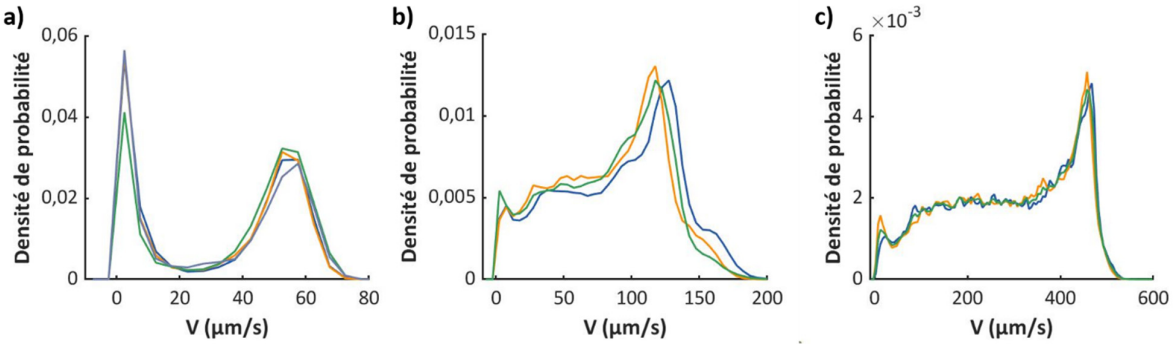


Figure 80. Densité de probabilité des vitesses instantanées obtenues à 0 s^{-1} (a), 5 s^{-1} (b) et 20 s^{-1} (c) pour les trois ou quatre réplicats réalisés. Le nombre moyen de bactérie analysées par condition est respectivement de 3 997 (a), 4 231 (b) et 8 102 (c).

2.4.3 Stabilité de la motilité bactérienne

L'objectif principal de ce chapitre étant d'étudier le couplage entre l'écoulement et la motilité bactérienne, une attention particulière a été accordée à la stabilité temporelle de la motilité libre de *S. oneidensis* WT au sein de l'inoculum, c'est-à-dire en l'absence de contrainte hydrodynamique. Il s'agissait de vérifier que cette motilité (proportion de bactéries motiles et vitesse de nage) demeurait similaire sur la durée totale de l'expérience, afin de s'assurer que les variations observées dans la dynamique de transport bactérien sous flux résultaient bien de l'intensité de l'écoulement et non d'une évolution physiologique des cellules. Pour ce faire, le pourcentage de bactéries motiles (Cf critère section 3), ainsi que leurs vitesses ont été analysés systématiquement en amont et en aval de chaque expérience. La Figure 81 présente les résultats obtenus. Aucune différence significative n'a été observée au cours du temps pour ces deux paramètres (respectivement p-value = 0,800 et 0,440). De plus, comme présenté au Chapitre 3 (paragraphe 1.2.2), aucune croissance détectable n'a été observée en deux heures dans ces conditions de culture. Le nombre total de bactéries, ainsi que la proportion de cellules motiles demeurent donc constants, confirmant la stabilité de la motilité bactérienne au sein de l'inoculum au fil du temps. Notons également que l'absence

de variation entre le début et la fin de l'expérience implique que les niveaux de cisaillement testés ne sont pas suffisants pour fragiliser ou détacher le flagelle bactérien.

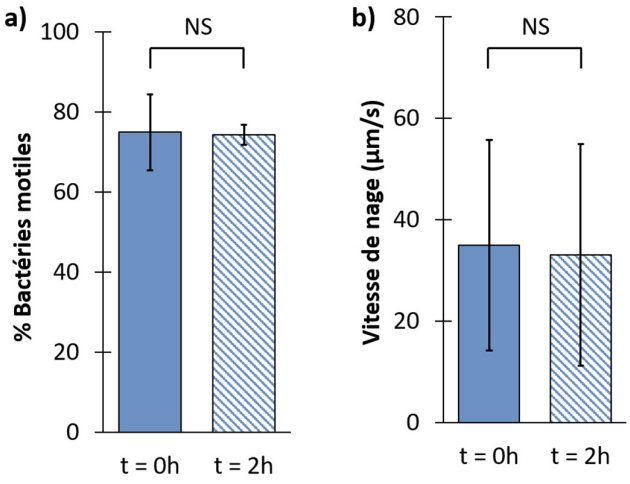


Figure 81. Proportion **(a)** et vitesse de nage moyenne **(b)** des bactéries motiles *S. oneidensis* MR-1 WT au début (t = 0 h) et à la fin (t = 2 h) de l'expérience. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Quatre expériences indépendantes ont été réalisées, avec un nombre total de bactéries de 15 051 (n = 7 051 à t = 0 h et n = 8 000 à t = 2 h). NS = non significatif.

3 Influence du taux de cisaillement sur la dynamique de transport de *Shewanella oneidensis*

Cette section est présentée sous la forme d'un article scientifique, en anglais, déposé le 12/12/2025 sur le serveur Hal (hal-05412937) / Arxiv en vue d'une soumission dans le journal PNAS. Afin d'alléger la lecture, certaines informations figurant dans les informations supplémentaires (SI) de l'article ont été retirées car présentées au début du Chapitre 4.

All in one: holographic microscopy unveils bacterial transport from single cells to population

Lucie Klopffer[a,b], Simon Becker [b], Laurence Mathieu[c], Nicolas Louvet [b*],

[a] Université de Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000 Nancy, France ; [b] Université de Lorraine, CNRS, LEMTA, F-54000 Nancy, France ; [c] EPHE, PSL, UMR CNRS 7564, LCPME, F-54000 Nancy, France

*Corresponding author:

Nicolas Louvet ; LEMTA, 2 Avenue de la Forêt de Haye, BP 90161, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France **;** nicolas.louvet@univ-lorraine.fr

Abstract

Prior to pioneer surface adhesion, bacteria must navigate in flows, often in confined environments. While much is known about their individual swimming dynamics, our understanding of their transport properties at the population level remains limited. This is primarily due to the experimental challenges of tracking a large sample of these microorganisms in three dimensions and under flow conditions. Here we investigate, using fast digital holographic microscopy (DHM), a suspension of *Shewanella oneidensis* MR-1 bacteria in a confined Poiseuille flow. Based on the analysis of several thousand Lagrangian trajectories, we first demonstrate the ability of DHM to discriminate between the fraction of bacteria that adhere to walls, those that are only convected by the flow, and those for which motility helps them migrate through the channel and cross the streamlines. Focusing on the motile part of the bacterial population, we report new experimental results concerning the spatial and orientational distributions across the confinement direction. In the central part of the flow, migration and shear trapping are observed and well described by existing kinetic models. Close to the walls, averaging over the entire motile population clearly reveals an accumulation layer but with no net orientational order, which contradicts models that neglect hydrodynamic interactions with solid surfaces. We believe that DHM, coupled with the analysis of large-scale bacterial populations, will help understand their transfer mechanisms from the bulk to surfaces, as well as improve theoretical models.

Introduction

Understanding the transport properties of planktonic bacteria in flows and their transfer to surfaces is of significant interest as it is the precursor step to biofilm formation (Berne *et al*., 2018; Busscher and Van Der Mei, 2006; Klopffer *et al.*, 2024). It influences many natural or industrial processes (Donlan *et al*. 2016; Satpathy *et al.*, 2016; Sentenac *et al.*, 2022) such as in healthcare (Koo *et al.*, 2017) or even in spacecraft (Diaz *et al.*, 2019; Goeres *et al.*, 2023) and is of prime importance for antibiofilm material strategies (Zou *et al*., 2025). In these various applications, while passive transfer mechanisms like diffusion (due to Brownian motion), sedimentation (density differences between bacteria and surrounding fluid) and fluid advection contribute to the transfer from bulk to surfaces (Busscher and Van Der Mei, 2006; Carniello *et al*., 2018; Palmer *et al.*, 2007), the role of bacterial motility and its coupling with a flow is of first importance (Clement *et al.*, 2016; Lauga, 2016; Wadhwa and Berg, 2022). For instance, numerous studies during recent decades have highlighted complex near-surface swimming behaviors like bacterial accumulation near walls (Berke *et al.*, 2008; Clement *et al.*, 2016; Drescher *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2008), reduced swimming speeds when approaching surfaces (Elius *et al*., 2023; Frymier *et al.*, 1995; Lauga and Powers, 2009; Qi *et al.*, 2017), body reorientation (Bianchi *et al., 2017;* Lauga, 2016; Molaei *et al.*, 2014), circular trajectories close to walls (DiLuzio *et al.*, 2005; Khong *et al.*, 2021; Lauga, 2016; Li *et al.*, 2008), upstream swimming against flow (Hill *et al*., 2007; Kaya and Koser, 2012; Mathijssen *et al*., 2019), as well

as rheotaxis (Jing *et al.*, 2020; Kaya and Koser, 2012; Marcos *et al.*, 2012; Morales-Soto *et al*., 2015). Far from surfaces, bacteria experience the flow field leading to active Bretherton–Jeffery orbits (Junot *et al.*, 2019) and complex concentration distribution profiles, depending on the swimming behavior of the bacteria and the flow conditions. Yet, aside from a limited number of experimental studies (Darnige *et al.*, 2017; Figueroa-Morales *et al.*, 2020; Junot *et al.*, 2019; Mathijssen *et al.*, 2019; Molaei *et al.*, 2014; Molaei and Sheng, 2016; Rusconi *et al.*, 2014; Torres Maldonado *et al.*, 2024), there is still a shortage of quantitative and statistically robust experimental data on bacterial motion in a bulk flow, especially the full time resolved three-dimensional bacterial dynamics which hampers the validation and refinement of theoretical models (Elgeti and Gompper, 2013; Ezhilan and Saintillan, 2015; Ganesh *et al.*, 2023; Junot *et al.*, 2019).

One major challenge lies in accurately detecting and tracking bacterial trajectories in the bulk under flow. These difficulties arise from both the fluid dynamics and the intrinsic properties of bacteria, such as their small size and their ability to cross streamlines in the case of motile populations (Acres *et al.*, 2021; Dubay *et al.*, 2023; Taute *et al.*, 2015). Most experimental studies use conventional microscopy techniques such as phase contrast or fluorescence. While these approaches are simple to set up, they offer limited depth of field, which makes it impossible to resolve the full three-dimensional bacterial motions over a long period of time (Palma *et al.*, 2022). Only a limited number of three-dimensional techniques have emerged to overcome this problem. While sensitive, these methods have limitations in terms of the number of bacteria that can be detected and require calibration to accurately determine their 3D positions (Darnige *et al.*, 2017; Taute *et al.*, 2015). Digital Holographic Microscopy (DHM), on the other hand, is a powerful, time-resolved, 3D technique for tracking complex bacterial suspensions in flow. More than hundreds of bacteria can be tracked simultaneously over a long period of time (minutes) without any calibration, enabling analysis at both the individual and population scales and providing a high level of statistical accuracy. However, some drawbacks restrict the use of DHM. Processing holograms at high bacterial concentrations is extremely time-consuming and often requires access to powerful computing clusters (Molaei and Sheng, 2016). Moreover, the low intrinsic contrast between bacteria and the background often requires advanced and optimized hologram processing. This significant computational demand hinders the adoption of the technique.

In this work, we implement a fast Gabor in-line digital holographic microscope to access thousands of 3D Lagrangian bacterial trajectories, enabling strong statistical significance. Through analyses at both individual and population scales, we report new findings on the motility and dynamics of *Shewanella oneidensis* MR-1 strain under Poiseuille flow conditions. This monotrichous bacterium demonstrates fast and persistent swimming that drives a rare observation of bacterial central depletion and shear trapping, as well as unexpected super active Jeffery loops even at high shear rates. Through a detailed analysis of bacterial orientation and concentration over the entire channel, we show that kinetic models capture the behavior in the centerline region but fail to describe our results near walls. Indeed, we observe an

accumulation layer that is not associated with a net bacterial orientation towards the walls as expected by these models that neglect hydrodynamic wall interactions.

Materials and Methods

Shewanella oneidensis strains and inoculum preparation

Experiments were performed using *Shewanella oneidensis* MR-1 WT as a model strain (Teal *et al.*, 2006). A Δfla deletion mutant of *Shewanella oneidensis* MR-1 (Armitano *et al.*, 2013) was used as a control. Motility tests were performed to confirm the absence of motility of the mutant (Fig. S1). Prior to the assay, the requisite strain of *S. oneidensis* was recovered from a glycerol stock at -80°C onto Lysogeny Broth agar plates. After 2 days of incubation at 30°C, several isolated colonies of *S. oneidensis* were used to inoculate a 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of sterile 10-fold diluted LB medium ($LB_{1/10}$). After an overnight culture (30°C, 160 rpm), the bacterial suspension was centrifuged (3,000 g for 4 min) and resuspended in fresh $LB_{1/10}$ medium to reach a final average concentration of $2.3 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7$ cells/mL, among which $1 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$ cells/mL were membrane-damaged as measured by flow cytometry (Klopffer *et al.*, 2024).

Microfluidic system and experiments

The microfluidic system (Fig. 1a) is composed of a high aspect ratio rectangular glass capillary (Vitrocom, height h = 0.1 mm, width w = 1 mm, length L = 100 mm) connected to a syringe pump (NEMESYS Low pressure module). For each assay, a new entire microfluidic device (capillary, connectors and tubing) was used and cleaned using the following protocol: SDS (0.1 % - 30 min - 1 mL/min), ultrapure water (30 min at 1 mL/min), HCl (0.1 M - 30 min at 1 mL/min) and ultrapure water (30 min - 1 mL/min). The bacterial suspension fed the system at flow rates Q ranging from 0 to 2 µL/min that led to a good approximation of planar Poiseuille flow far from lateral edges in the x-direction (Fig. 1b and Fig. S2): $V_x^{flow}(z) = \frac{6Q}{wh}\left(\frac{z}{h} - \left(\frac{z}{h}\right)^2\right)$. From this velocity profile, the wall shear rate is derived: $\dot{\gamma}_w = \frac{6Q}{wh^2}$ (Bruus, 2007). Each experiment lasted less than 2 hours with no bacterial motility variations (Fig. S3). Each experimental condition was replicated three times to ensure statistical robustness.

Digital holographic microscopy setup and holograms processing for bacteria detection and tracking

The microfluidic system was mounted under an inverted microscope (ZEISS Axio Observer; 40X, 0.9 NA objective) (Fig. 1a). The Gabor in-line holographic setup was composed of a single-mode fiber laser diode (λ = 660 nm, 50 mW, Thorlabs LP660-SF50) fitted with a fiber collimator for plane wave generation (Thorlabs PAF2P-A10A) and mounted above the microscope to illuminate the bacterial suspension within the central part of the capillary (5 cm away from injection point and centered laterally). A digital camera (Dantec Dynamics, pixel size of 7 μm, resolution 1024 × 1024 pix² matrix) was used to record time-resolved

hologram sequences of 3,000 holograms. The frame rate was varied as a function of flow rates in a range [50 - 300] Hz in order to limit maximal bacterial displacements to the bacterial size (2 µm). The field of view was 180 x 180 µm² laterally and 100 µm in depth.

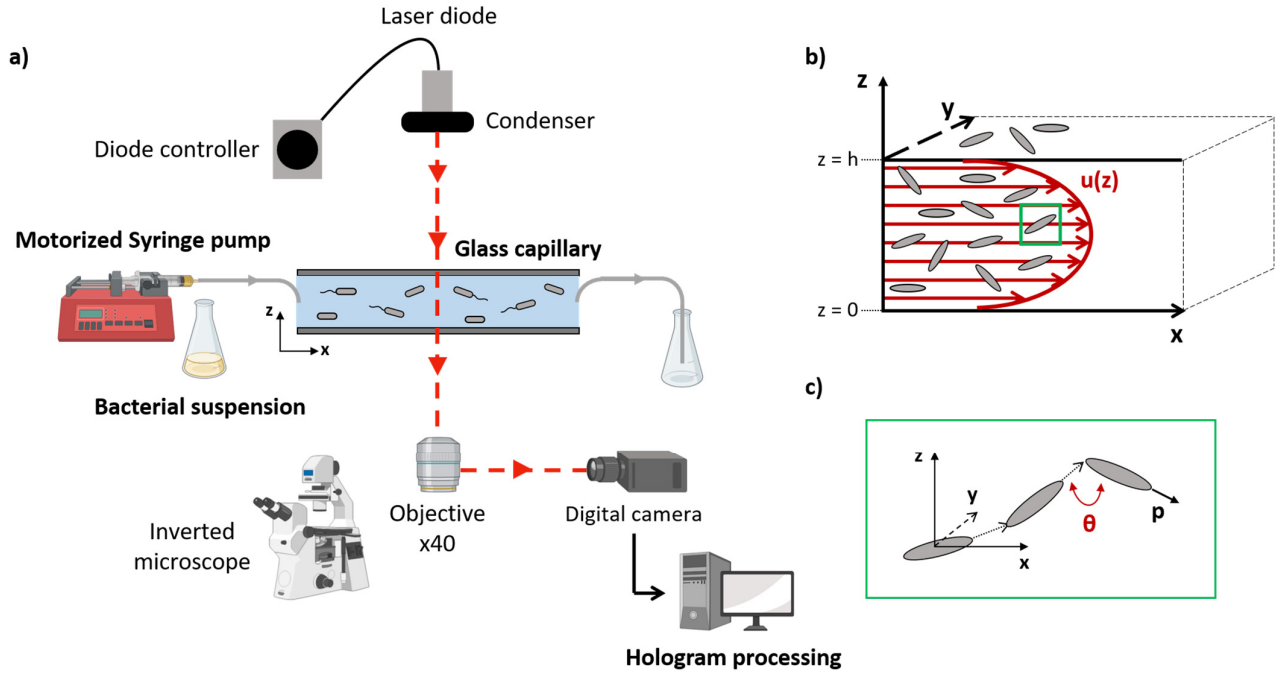


Fig.1. (a) Schematic representation of the DHM setup. **(b)** Diagram of the confined capillary system, exhibiting Poiseuille flow. Coordinate axes: *x* - flow direction, *y* - horizontal transverse (vorticity direction) and *z* - vertical confinement direction (shear direction). **(c)** Bacterial unit vector $\vec{p}(t) = \frac{\vec{V}}{\|\vec{V}\|}$ indicating the bacterial orientation and $\theta(t)$ the turning angle.

We recall briefly the hologram formation and analysis with detailed information found in (Becker *et al.*, 2024). The reference electromagnetic wave E_R emitted from the laser is diffracted by the bacterial suspension. The diffracted wave, called the object wave E_O, interferes with the reference wave at the sensor plane to form the hologram $H_0(x, y, z = 0, t) = |E_R + E_O|^2$. Before volume reconstruction, the captured holograms are first processed using background division to minimize stationary noise. The background image is computed by averaging the intensity values across the hologram series (3,000 holograms). The cleaned holograms are backpropagated along the optical axis (z – axis) by discrete steps of 0.5 µm over 200 planes to obtain a reconstructed volume of the same size as the field of view (180 x 180 x 100 µm³). The angular spectrum theory (decomposition into plane waves) is used as backpropagator kernel which is suited for short propagation distance (Becker *et al.*, 2024). The bacteria coordinates are determined by applying successively for each propagated plane: a Tenengrad focus function to enhance the contrast between bacteria and fluid (Fonseca *et al.*, 2016) and a threshold criterion for image binarization. We then compute a three-dimensional connected component labeling (CCL3D) over the entire volume that groups voxels of interest. Finally, we determine and associate the centroid coordinates of each

group of voxels with bacterial coordinates. The last step was to build the 3D Lagrangian trajectories from the bacteria positions, and this was done with the Trackpy module. All trajectories with fewer than 10 points were removed from analysis.

Our source code, programmed in Python/CuPy, is in open access (Becker *et al.*, 2024). With our simple informatic equipment (laptop: Core i5, 16GB of RAM, Quadro GTX 3000 GPU), the computation time needed to localize a hundred bacteria on a single hologram (backpropagation of 200 planes of 32 floats with a resolution of 1024 x 1024 pix², binarization and CCL3D) was less than 1 second. Then post-processing a time sequence of 3,000 holograms takes around 45 minutes. This is to our knowledge the fastest hologram computation time with a standard laptop and GPU acceleration that allows easy laboratory use.

Results

S. oneidensis **classification dynamics**

Our holographic microscopy setup allows for high-precision three-dimensional reconstruction and analysis of bacterial trajectories, enabling the tracking of 2,000 to 4,000 bacteria per experiment. This method provides valuable insights into the mechanisms underlying bacterial transport properties in inhomogeneous shear flow. Fig. 2 (a-c) illustrates representative 3D Lagrangian trajectories of *S. oneidensis* MR-1 WT under increasing flow conditions.

The flow strength is characterized by the flow Peclet number: $Pe_f = \frac{\dot{\gamma}_w}{D_r}$ where D_r is the rotational diffusion coefficient that describes the ability of bacteria to keep their swimming orientational direction (see below). This dimensionless number serves as a control parameter and compares the time scale for a bacterium to lose its swimming direction due to active rotational diffusion ($1/D_r$) over the time scale it takes to be aligned by the shear flow gradient ($1/\dot{\gamma}_w$). For $Pe_f \gg 1$, bacteria are aligned in the flow direction and lose their ability to cross streamlines, while for $Pe_f \ll 1$, the bacterial swimming dynamics are slightly disturbed by the flow and they migrate through the channel.

A diverse range of bacterial dynamics is observed through trajectory shapes, turning angles, and explored volumes, which calls for classification. Based on simple criteria (Chapter 4, paragraph 2.3) we determined three categories (Fig.2 (d-g)) and their evolution with Pe_f. The first category (C1), “diffused bacteria”, consists of bacteria that are either wall-adhered or exhibit Brownian motion; (C2), “convected bacteria”, are characterized by trajectories following the streamlines; and (C3), “motile bacteria”, are those that cross the streamlines.

As the flow strength increases, the C1 category drops rapidly (Fig. 2g). Under static or low flow conditions, C1 trajectories occupy the entire volume, but moderate or high shear locate this category near walls. Indeed, non-motile bacteria far from the walls are carried by the flow and fall in the category C2. The fraction of motile bacteria (C3) also evolves with the imposed flow rate. While this fraction is close to 80% of the entire population under static conditions, it drops to 20% with the application of shear and to 10%

with the larger flow rate. Their movement can be attributed solely to the presence of their flagella, as such trajectories are absent in the *S. oneidensis* MR-1 Δfla mutant strain (Fig. S4). Finally, at large shear, most bacteria are convected.

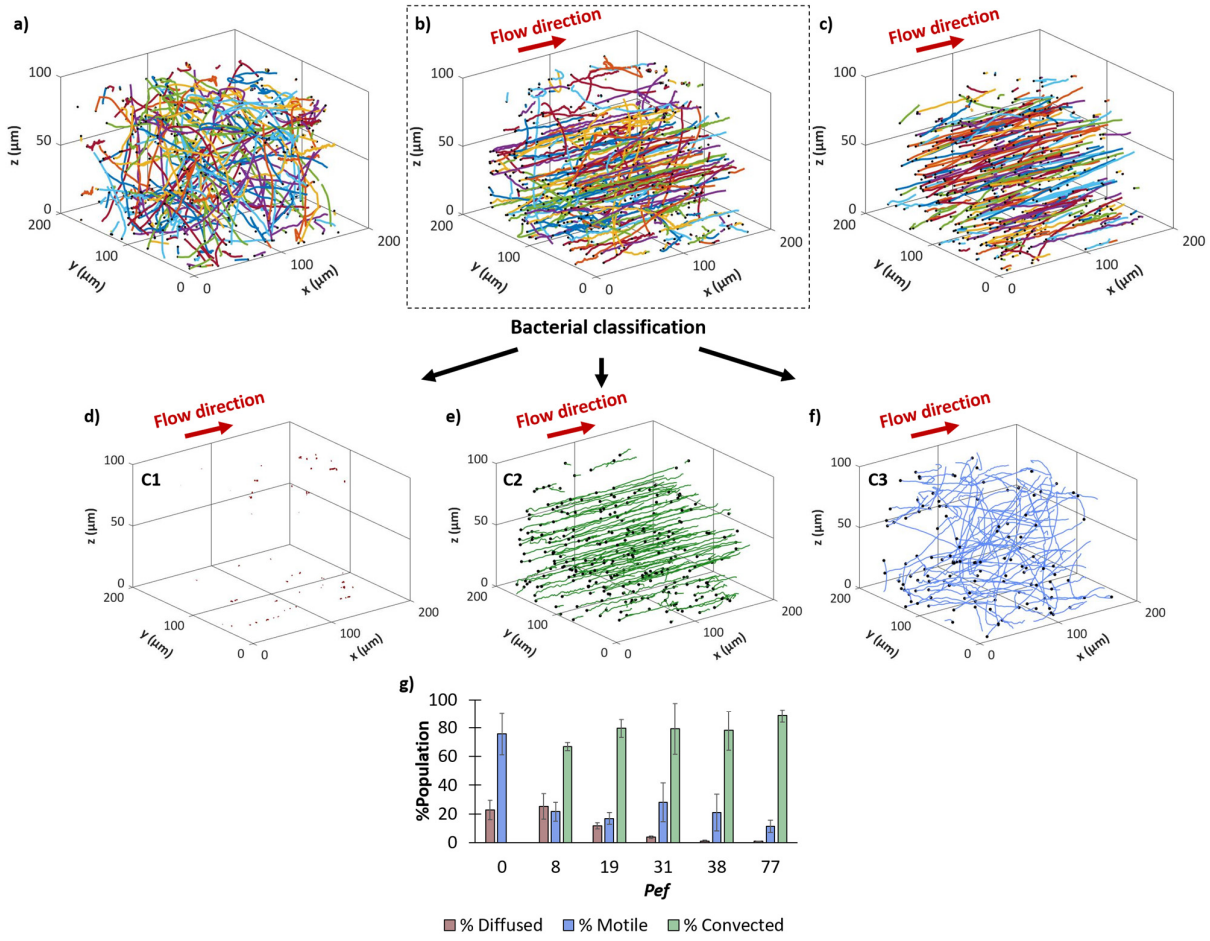


Fig.2. (a), **(b)** and **(c)** are representative examples of three-dimensional trajectories (about 500) of wild type *Shewanella oneidensis MR-1* obtained for different flow rates **(a)** $\dot{\gamma}_w = 0$ s^{-1}, $\langle V_x^{flow} \rangle = 0$ µm/s, **(b)** $\dot{\gamma}_w = 2$ s^{-1}, $\langle V_x^{flow} \rangle = 33$ µm/s, **(c)** $\dot{\gamma}_w = 20$ s^{-1}, $\langle V_x^{flow} \rangle = 330$ µm/s) within a 180 × 180 × 100 µm^3 volume. The capillary walls are located at z = 0 (bottom) and 100 µm (top). Flow direction is along the positive x-axis, as indicated by the red arrow above the graphs. Figures **(d)**, **(e)** and **(f)** are representative examples of bacterial trajectories after classification of those obtained at $\dot{\gamma}_w = 2$ s^{-1}: **(d)** C1, "diffused bacteria", **(e)** C2, "convected bacteria" **(f)** C3, "motile bacteria". **(g)** Mean ± standard deviation of the proportion of the population identified by their transport mechanism as a function of flow Peclet number.

***S. oneidensis* free-swimming characterization**

To better understand the transport properties of *S. oneidensis* MR-1, we focused on the motile population and characterized, without external flow, their swimming properties in terms of turning angles, velocity distributions and orientational correlation (Chapter 4, paragraph 2.3 for detailed calculations).

Fig. 3a displays a selection of 10 out of 12,241 motile *S. oneidensis* trajectories. These trajectories illustrate distinct behaviors, although in varying proportions (Fig. S5). The predominant behavior, accounting for 70% of the population of motile bacteria, consists of long and slightly curved runs with low turning angles (bacteria 1 to 4). Bacteria that underwent significant reorientations ($\theta > 50°$), which we associate to tumbles (bacteria 5 to 7), were also observed to a lesser extent. Finally, a small percentage of bacteria exhibit low swimming speeds (bacteria 8) (Molaei *et al.*, 2014) and near surface behavior (bacteria 9 and 10) as previously observed in *E. coli* (Kaya and Koser, 2012; Lauga *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). These observations align with the only study on *S. oneidensis* MR-1 performed by Stricker *et al.* (2020), which demonstrated that this bacterium could exhibit multi-modal swimming behaviors such as run-reverse-flick and run-and-tumble movements.

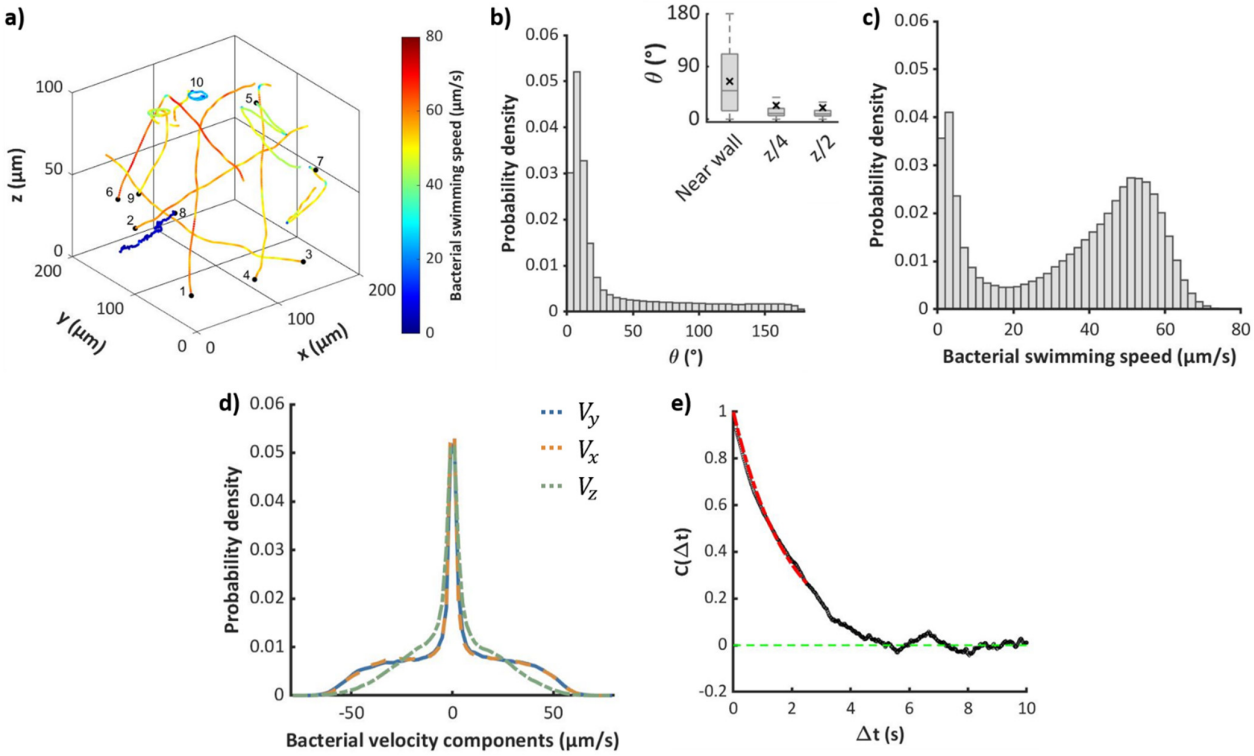


Fig. 3. Swimming dynamics properties of the motile population part of *Shewanella oneidensis* MR-1 WT without flow. **(a)** Ten representative examples of the 12,241 motile bacteria, color-encoded by their instantaneous velocities. The capillary walls are located at z = 0 (bottom) and z = 100 µm (top). **(b), (c),** and **(d)** show, respectively, the probability density function of the turning angle θ, the instantaneous bacterial swimming speed and the bacterial velocity components in each direction. The inset (b) shows the distribution of the turning angle as a function of position within the capillary. **(e)** Mean directional correlation function, fitted exponentially (red curve) to obtain persistence parameters.

The bacterial turning angle (Fig. 3b) and instantaneous swimming velocities (Fig. 3c) corroborate our previous observations. The distribution of turning angles reveals the predominance of small-angle reorientations (0 - 20°), consistent with the motility pattern of *S. oneidensis,* characterized by long runs with few directional changes, yielding an average turning angle of $\langle\theta\rangle \approx 35°$, with a large standard deviation

of 45°, reflecting the presence of angles larger than 50°. Associated with these smooth trajectories, the distribution of intrinsic bacterial swimming velocities v_0 appears bimodal with a high velocity peak centered at 50 µm/s, associated with bacteria swimming in the bulk and a low velocity peak around 5 µm/s for those interacting mainly with a wall (Fig. S6). To further analyze the swimming properties, we examined the three components of the bacterial velocity (Fig. 3d). While the velocity components in the plane perpendicular to the confinement direction are similar, the z-component distribution is narrowed and less homogeneously distributed. We assume that this effect is related to the confinement effect and to the large swimming persistence of *S. oneidensis.* Indeed, the calculation of the directional correlation function $C(\Delta t) = \langle \vec{p}(t) \cdot \vec{p}(t + \Delta t) \rangle = e^{-2D_r t}$, where $\vec{p} = \frac{\vec{V}}{\|\vec{V}\|}$ is the orientation of the bacteria, leads to a rotational diffusion coefficient $D_r \approx 0.25$ rad²/s and a correlation time of $t_c = \frac{1}{2D_r} \approx 2$ s (Fig. 3e). This demonstrates that, during this time, a motile bacterium performs a smooth trajectory with a persistent length $l_p = v_0 t_c \approx 100$ µm, which is of the same order of magnitude as the confinement (h =100 µm). This long correlation time (or low rotational diffusion coefficient) is also found in other monoflagellate bacteria like *Rhodobacter sphaeroides* which has a similar coefficient (0.255 rad²/s) (Rosser *et al.*, 2014). Consequently, most of the bacteria encounter a wall during their runs before performing a tumble, as highlighted in the inset of Fig. 3b, where large turning angles occur at the wall rather than in the bulk. This behavior is quite different from the typical peritrichous run-and-tumble *E. coli,* which has been vastly studied in the literature (Berg and Brown, 1972; Lemelle *et al.*, 2020; Saragosti *et al.*, 2012). For this bacterium, reported values $D_r \approx 1$ - 2 rad²/s and $v_0 \approx 20$ - 30 µm/s lead to a persistence length of 10 µm, allowing the bacterium to mostly tumble in the bulk. This distinction suggests different transport dynamics and highlights the need for caution when comparing numerical models of bacterial transport in confined environments, as these models predominantly rely on *E. coli* data (Bhattacharjee and Datta, 2019; Pietrangeli *et al.*, 2024). Therefore, incorporating observations from our strain into models can improve the accuracy of transport predictions by accounting for motility differences.

Shear flow impacts the transport properties of *S. oneidensis*

- **Flow effects on bacterial 3D trajectories and velocities**

Imposing a flow on a bacterial suspension strongly affects their transport properties. Examples of the trajectories of *S. oneidensis* under various Pe_f conditions are depicted in Fig. 4 (a-c) (Fig. S7 for more trajectories). For the lowest flow strength ($Pe_f = 8$), while the fraction of motile bacteria drops to 20% (Fig. 2g), their behavior is similar to the static case and retains the ability to cross streamlines with persistent runs, tumbles and circular trajectories close to the wall. As the Pe_f increases, bacterial trajectories tend progressively to align with flow streamlines, reducing the ability to explore their surrounding environment. Our observations are supported by the narrowing of the turning angle distribution and a twofold decrease in the mean turning angle (Fig. 4e).

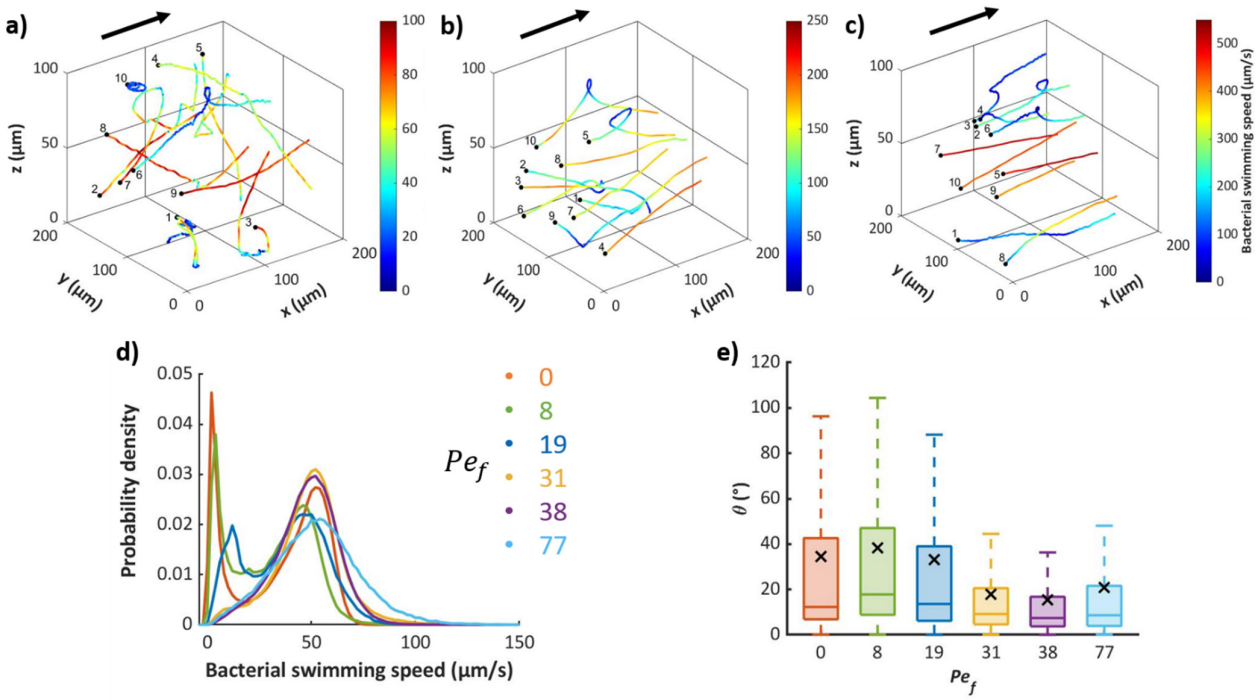


Fig. 4. (a), **(b)** and **(c)** show 10 representative examples of three-dimensional trajectories of motile Shewanella *oneidensis* MR-1 WT, obtained under different flow Peclet number conditions (a = 8, b = 31, c = 77). The capillary walls are located at z = 0 (bottom) and 100 µm (top). Flow direction is along the positive x-axis, as indicated by the black arrow. **(d)** Distribution of the bacterial swimming velocity relative to the flow field for various Peclet numbers. **(e)** Boxplots of the turning angle θ as a function of the flow Peclet numbers. The number of motile bacteria analyzed was 28,114 (12,241 for Pe_f = 0; 1,816 for Pe_f = 8; 1,991 for Pe_f = 19; 5,346 for Pe_f = 31; 4,192 for Pe_f = 38 and 2,528 for Pe_f = 77).

Interestingly, this drastic change in bacterial trajectories does not appear to be accompanied by any significant variation in the bacteria's intrinsic swimming speeds, once the flow contribution is removed (Fig. 4d). In line with Chattopadhyay *et al.* (2006), this result suggests that, despite the increased drag forces, bacteria maintain their energy for active swimming, preserving their own propulsion capabilities. Indeed, Fig. 4d shows that swimming speed distributions remain similar across all flows, with only minor deviations. In particular, as the flow increases, the low-velocity peak - primarily due to near-wall swimming diminishes and disappears once the Peclet number exceeds 19. This reduction in low-velocity events is linked, under increasing wall shear rates, to the decline of complex near-wall trajectories, such as upstream swimming and surface rheotaxis (Berke *et al.*, 2008; Drescher *et al.*, 2011; Kaya and Koser, 2012; Lauga, 2016; Lauga *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Mathijssen *et al.*, 2019). Consequently, the initial bimodal speed distribution becomes a unimodal distribution, centered on the highest swimming velocities.

- **Flow impacts bacterial spatial orientation and distribution through the channel**

We now turn on a more quantitative description of the three-dimensional spatial orientation of *S. oneidensis* MR-1 under flow. Fig. 5 (a-c) (and Fig. S8) shows, for various Peclet numbers, the distribution of each component of the orientation vector $\vec{p} = (m_x, m_y, m_z)$, respectively in the flow direction - x, the

vorticity direction - y and the wall normal direction - z. We emphasize that for all the results presented below, we have not subtracted the flow component leading to the orientation vectors measured in the laboratory reference frame. We first notice that the components m_y and m_z remain isotropic and narrow as Pe_f increases.

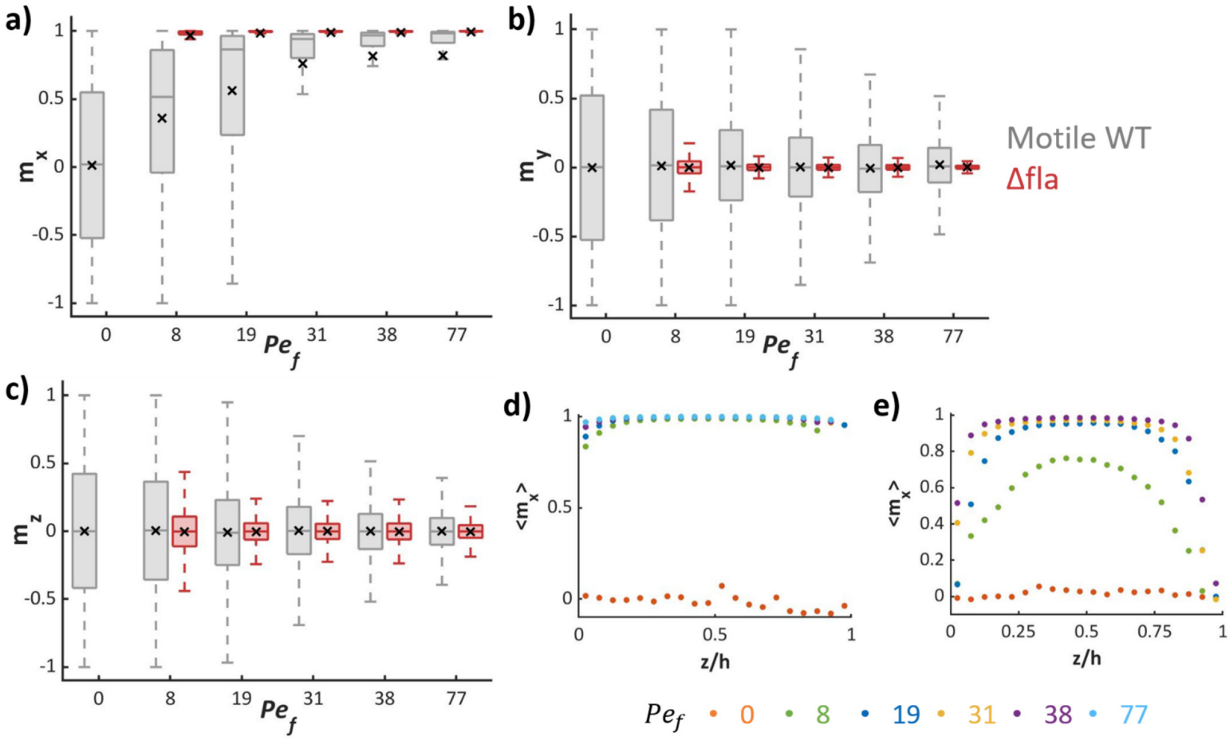


Fig. 5. Boxplots of bacterial orientation **(a)** *x*-direction, m_x **(b)** *y*-direction, m_y and **(c)** z-direction, m_z for motile *S. oneidensis* WT (grey) and Δfla mutant (red) strains under applied flow Peclet numbers. **(d)** and **(e)** Plots showing the average x orientation (m_x) of the Δfla mutant **(d)** and the motile population of *S. oneidensis* WT **(e)** under applied flow Peclet numbers, as a function of their normalized position within the capillary. A total of 28,114 bacteria were analyzed for the motile WT population, and 84,103 for the Δfla mutant.

Nevertheless, compared to the Δfla strain, the distributions are broader, indicating rheotactic effects that are more pronounced for $Pe_f > 19$, as we will show later (Fig. 6, Fig. S9). The streamwise component (Fig. 5a) reveals that, at moderate Peclet numbers, a large part of the bacteria undergoes upstream motion, while the Δfla strain is fully convected ($m_x = 1$) (see Fig. S10 for the V_x distribution as a function of the Peclet number and positions within the channel). The spatial analysis (Fig. 5d) shows that, although the average $< m_x >$ increases with flow throughout the capillary, this increase is more pronounced at the center than near the walls. Notably, a boundary layer of around 10 µm adjacent to the walls keeps $< m_x >$ below 1, even under high shear, indicating that bacteria near the walls experience hydrodynamic interactions such as surface rheotaxis (Figueroa-Morales *et al.*, 2020; Mathijssen *et al.*, 2019).

This complex orientational behavior induces a coupling with the bacterial concentration profile inside the capillary. As seen in Fig. 6a (Fig. S11a for Δfla strain), the concentration profiles are sensitive to changes

in flow strength. Under static conditions ($Pe_f = 0$), the concentration is homogeneous in the bulk but increases drastically (by a factor of 3) near the wall.

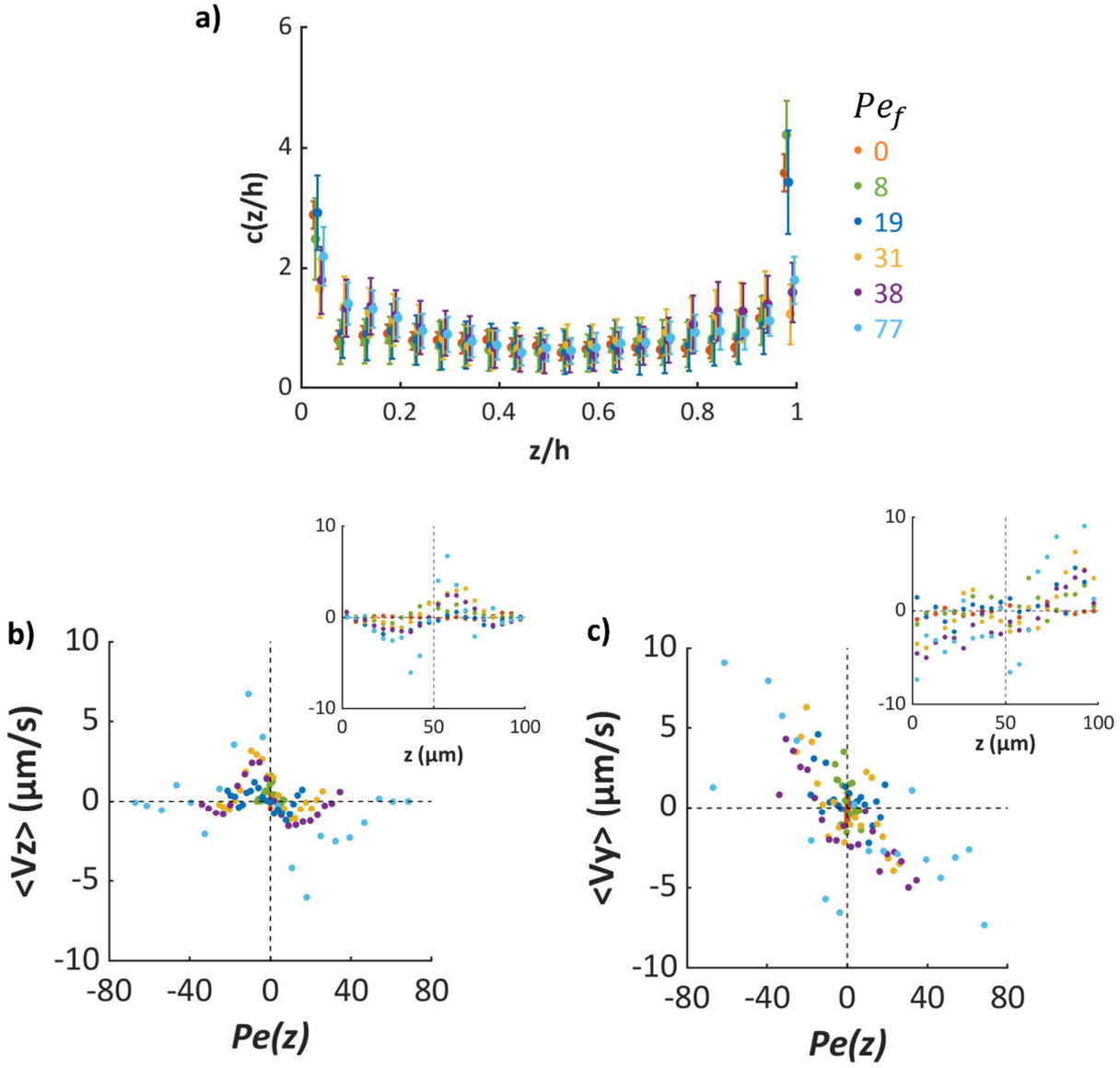


Fig. 6. (a) Vertical concentration profiles of *S. oneidensis* MR-1 WT from the bottom wall as a function of the normalized distance z across the capillary height. Curves are color-coded by the corresponding flow Peclet number. **(b-c)** Mean bacterial velocities: V_z (µm/s) in panel (b) and V_y (µm/s) in panel (c) plotted as a function of the applied local Peclet number (Pe_f) for motile *S. oneidensis* MR-1 population. Insets show the same mean velocity measurements but as a function of the z-position within the capillary. A total of 28,114 bacteria were analyzed.

This accumulation effect is well-known for pusher bacteria. Indeed, some studies (Berke *et al.*, 2008; Clement et al., 2016; Drescher et al., 2011) argue that this accumulation arises from hydrodynamic interactions between the far-field velocity field induced by the self-propulsion of the bacteria and the walls. In this case, bacteria tend to align with the surface resulting in a zero orientation toward the wall. Another

explanation proposed by some authors (Ezhilan and Saintillan, 2015) asserts that near a wall, the flux balance between self-propulsion cv_0 and diffusion $\frac{D_t c}{\delta}$ leads to an orientational sorting that drives the accumulation of bacteria and a net polarization toward the surface. This balance leads to an estimation of the accumulation thickness $\delta^{th} = \frac{D_t}{v_0}$. Taking $D_t \approx \frac{v_0^2 t_c}{3}$ (Lovely and Dahlquist, 1975) and $v_0 \approx 40$ µm/s and $t_c = 2$ s from our results, we obtain $\delta^{th} \approx 25$ µm. From the concentration profile, we estimate the accumulation layer ($c\left(\frac{z}{h} = \frac{\delta}{h}\right) = 1$) to be $\delta \approx 5$ - 10 µm corresponding to a few cell sizes, and it is significantly smaller than δ^{th}. Furthermore, we show in Fig. S9d that the average orientation toward the wall is homogeneous throughout the capillary and remains equal to zero under static conditions.

Contrary to what is mentioned in Ezhilan and Saintillan (2015), and to our knowledge, no experimental study reports, under the conditions for which the model was developed (diluted suspension), the existence of a clear orientation toward the wall near a surface. We therefore agree with the first explanation, as our results suggest this trend. We can, however, moderate our conclusion due to the strong persistent swimming properties of *S. oneidensis* MR-1. Indeed, previous works mainly focus on *E. coli* (Berke *et al*., 2008; Li *et al.*, 2011; Li and Ardekani, 2014; Li and Tang, 2009; Molaei *et al.*, 2014), which exhibits typical run-and-tumble behavior with a lower effective diffusion coefficient, possibly explaining the discrepancies.

When flow is applied, the concentration profile slightly evolves and tends to flatten out, with two notable effects. First, the concentration at the wall decreases with increasing Peclet number. Second, the concentration in the near-wall region increases and grows compared to the static case. A rough estimate for $Pe_f > 19$ gives a thickness that increases up to 20 µm. This effect, called shear trapping, has been predicted theoretically (Ezhilan and Saintillan, 2015; Ganesh *et al.*, 2023) but has rarely been observed experimentally (Rusconi *et al.*, 2014). Thanks to holography, we are able to characterize this effect more precisely by measuring the average component of the bacterial velocity normal to the wall $< V_z >$ and its evolution through the channel depth (Fig. 6b inset). Surprisingly, for each flow strength, we observe two peaks symmetrically located on either side of the centreline, with opposite magnitudes. As the Peclet number increases, the peaks get closer to the center of the channel and increase in amplitude, varying between 2 and 10 µm/s. This result indicates a net migration of bacteria away from the center that induces a growth of the region where shear trapping occurs. In order to rationalize this evolution, we plot $< V_z >$ as a function of the local Peclet number $Pe(z) = \frac{\dot{\gamma}(z)}{D_r}$ in Fig. 6b (Fig. 11b for the Δfla strain). Within experimental precision, the peaks align at the same value of $Pe(z) \approx 7$, indicating that the maximal migration velocity only depends on the shear rate. In the center, between the peaks, $< V_z >$ approaches zero due to the predominance of self-propulsion over shear alignment, resulting in an isotropic orientation of bacteria.

Beyond these peaks, $< V_z >$ rapidly drops to zero, indicating in that case that the bacteria are aligned by the flow gradient and remain trapped, with a reduced ability to cross streamlines. In the work of Ezhilan and Saintillan (2015), these trends are demonstrated theoretically, although they report a nonlinear dependence of the peak positions on the flow Peclet number Pe_f. It is interesting to note that, while close to the wall our experimental results differ from their work, their model reflects our experimental trends in the bulk region of our channel.

To obtain a complete view of the dynamics of the bacterial suspension under flow conditions, we also characterize the average transverse velocity $< V_y >$ of *S. oneidensis* MR-1 WT (Fig. 6c and Fig. 11c for Δfla strain). This monotrichous bacterium exhibits bulk rheotaxis that depends solely on the local shear rate, as shown in Fig. 6c. The rheotactic velocity increases with local shear rate (local Peclet number) and accounts for approximately 20% of the intrinsic swimming speed of the bacteria, in-line with experiments on peritrichous bacteria (Jing *et al.*, 2020; Marcos *et al.*, 2012). Without quantitative explanation, we notice that the rheotactic velocity $< V_y >$ is quite similar to the velocity normal to the walls $< V_z >$. This could be interpreted as an equilibrium between bacteria migrating from the centerline and bacteria entering via the bulk rheotactic effect.

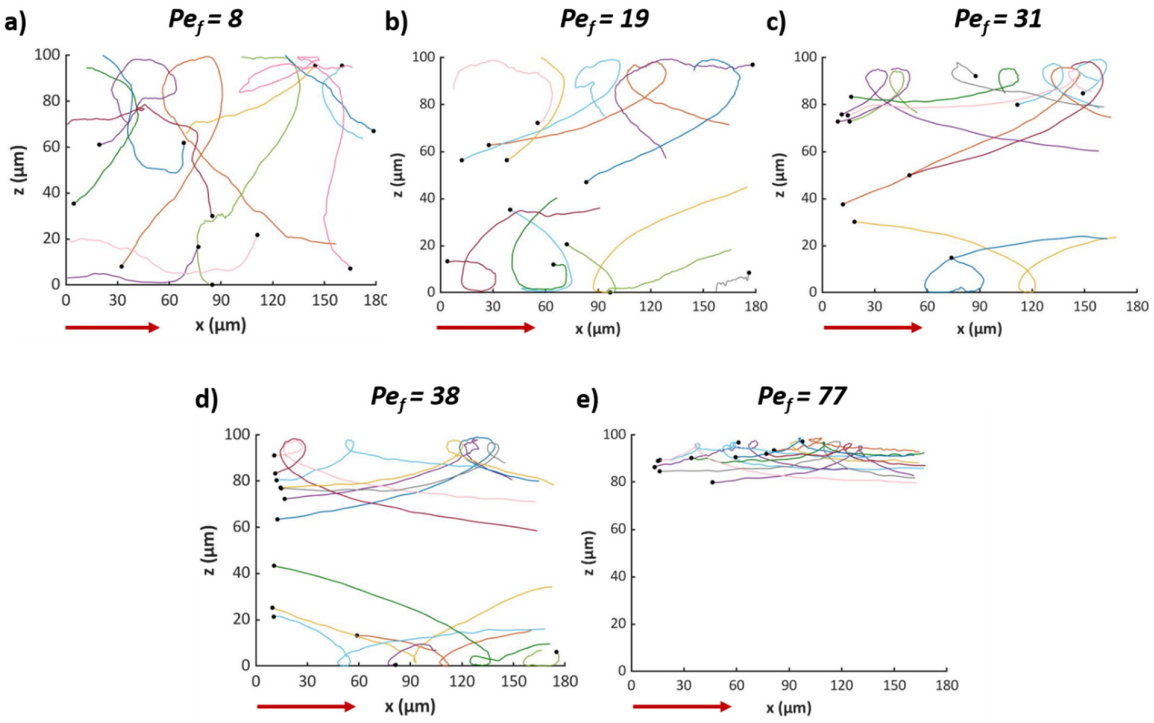


Fig. 7. Representative trajectories of motile *S. oneidensis* MR-1 WT projected onto the z-x plane, observed under different applied Peclet numbers. These trajectories illustrate Bretherton-Jeffery orbits. Trajectories are color-coded individually; black circles indicate the initial bacterial positions.

Finally, we attempted to understand the observed result $< V_z > = 0$ near the wall and the divergence from the theoretical model of Ezhilan and Saintillan (2015). A deeper analysis of the Lagrangian trajectories

near surfaces revealed that a large proportion of bacteria experienced loops even at high Pe_f (Fig. 7). These loops, called active Bretherton-Jeffery orbits, were first predicted theoretically by Zöttl and Stark (2012) and later reported experimentally once for a non-tumbling *E. coli* (Junot *et al.*, 2019). Along a trajectory, bacteria experience a velocity towards ($V_z > 0$) and away ($V_z < 0$) from the wall when entering and leaving the loop, respectively, with the same velocity amplitudes. Averaging over thousands of bacteria trajectories, this results in a cancelation of the net orientation. As the Pe_f increases, the fraction of motile bacteria that experience active orbits decreases (Fig. S12) and $< V_z > = 0$ appears to be achieved primarily through shear alignment in the flow direction.

Conclusion

Understanding how bacteria evolve in their environment is crucial for predicting their dispersion and surface colonization. In this study, we experimentally investigated the behavior of a dilute suspension of *Shewanella oneidensis* MR-1 in a confined Poiseuille flow. We demonstrate that this monotrichous bacterium interacts strongly with boundaries due to its highly persistent swimming, and couples to the flow in a manner distinct from run-and-tumble bacteria such as *E. coli*. Our ability to analyze thousands of individual trajectories enabled us to obtain robust measurements of the spatial distribution of *S. oneidensis* in flow. We found that, while kinetic models capture migration and shear trapping far from walls, they fail to describe the net bacterial orientation near surfaces. Although individual cells exhibit nonzero scattering angles upon interacting with the wall, this effect disappears at the population level, particularly as the wall shear rate increases. These results support the view that complex hydrodynamic interactions between bacteria and surfaces must be considered. Finally, our digital in-line holographic microscopy setup proved to be a rapid and powerful tool for characterizing suspensions containing both motile and non-motile bacteria, even under high flow conditions. We argue that gaining insight into pioneer surface colonization requires studying bulk-to-surface transfer mechanisms at the population scale-an approach that DHM readily enables.

Acknowledgements

We would like to express our sincere gratitude to Cécile Jourlin-Castelli (BIP, Aix-Marseille Université) for kindly providing the *S. oneidensis* Δfla strain used in this study. This work was supported by the French National Research Agency through the 'BIOCIDES' project (ANR-21-CE50-0027). N. L. acknowledged the french France 2030 program "Lorraine Initiative of Excellence", reference ANR-15-IDEX-04-LUE for supported partly this work.

References: The references used in this article are included in the reference list for the entire document.

Appendix A. Supplementary data

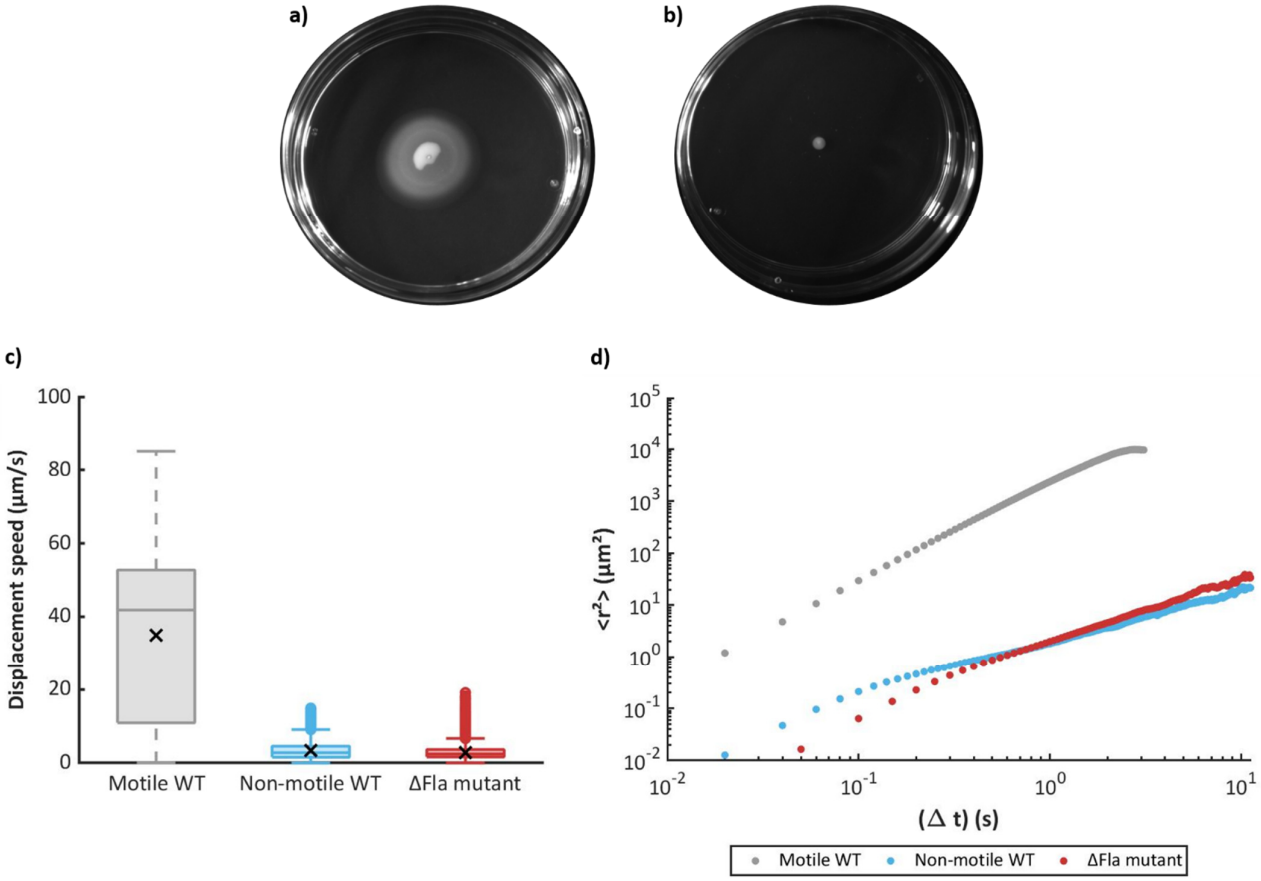


Fig. S1. (a-b) Migration behavior of *Shewanella oneidensis* MR-1 WT **(a)** and MR-1 Δfla deletion mutant **(b).** Motility assays were performed on LB plates containing 0.2% agar at a bacterial concentration close to 2×10^8 cellules/mL. After inoculation by spiking of 2 µL of the bacterial suspension, the plates were incubated at room temperature (22 ± 0.5°C) for 4 days. The pictures below were taken after 42 hours. Three independent trials were carried out before using these strains in our study. **(c)** Boxplots representing the bacterial speed distributions of the different bacterial populations identified in *S. oneidensis* MR-1: motile and no-motile wild type strains, and the Δfla mutant under static conditions. The central line represents the median; boxes indicate the interquartile range, and the black cross represents the mean value. **(d)** Mean squared displacement (MSD) curves for these bacterial populations. The number of bacteria analyzed are 12,241 for the motile wild-type, 8,110 for the non-motile wild-type, and 5,986 for the Δfla mutant strains.

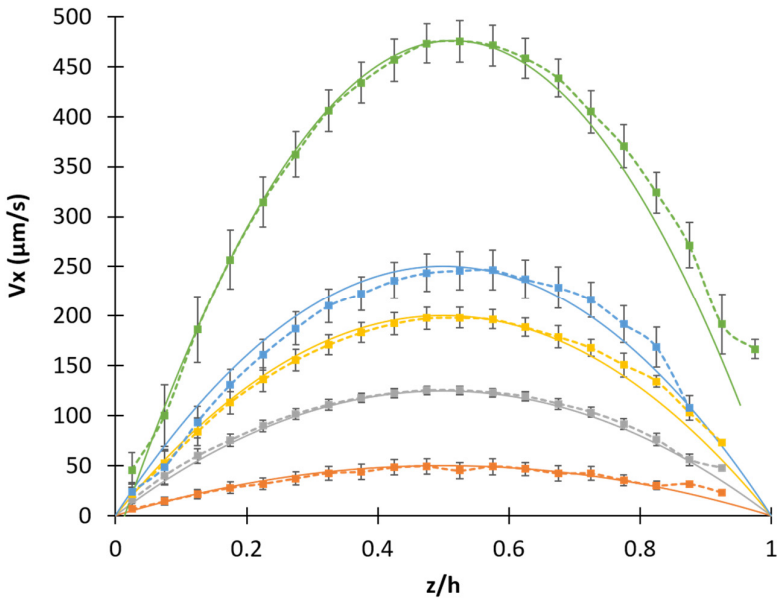


Fig. S2. Velocity profiles $V_x^{flow}(\frac{z}{h})$ obtained by holographic tracking of passive tracer particles (2 µm latex beads) in the experimental system at various applied shear rates: 2 s^{-1} (orange), 5 s^{-1} (grey), 8 s^{-1} (yellow), 10 s^{-1} (blue), and 20 s^{-1} (green). The flow is directed along the x-axis. The vertical position z represents the particle position within the capillary and is normalized by the total capillary height (100 µm). Experimental data are shown as symbols with dotted lines, while solid lines represent the theoretical Poiseuille flow profile.

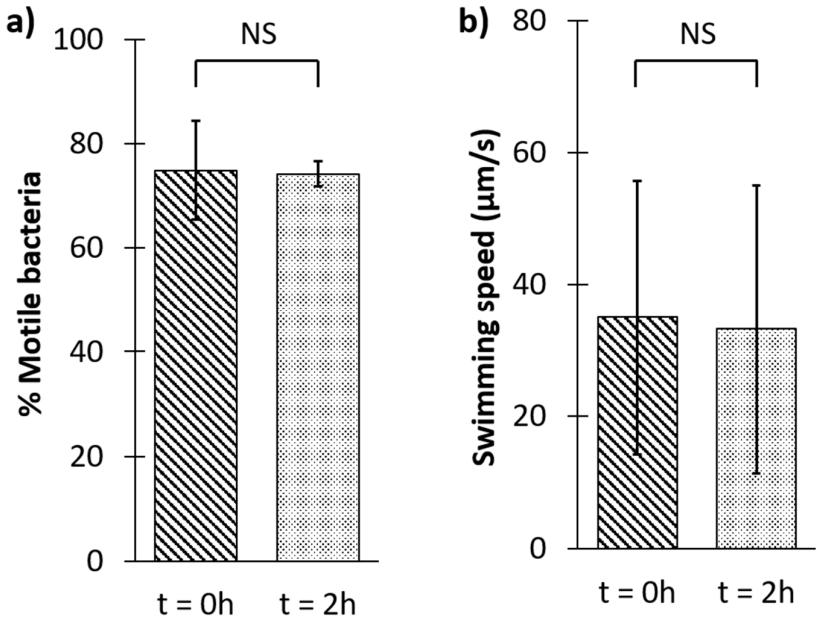


Fig. S3. Mean proportion of *S. oneidensis MR-1* WT motile bacteria (a) and swimming speed (b) at the beginning (t = 0 h) and the end (t = 2 h) of the experiment. Error bars indicate standard deviation from four independent experiments. The total number of bacteria analyzed was n_{total} = 15,051 (7,051 at t = 0 h and 8,000 at t = 2 h). (NS = not statistically significant).

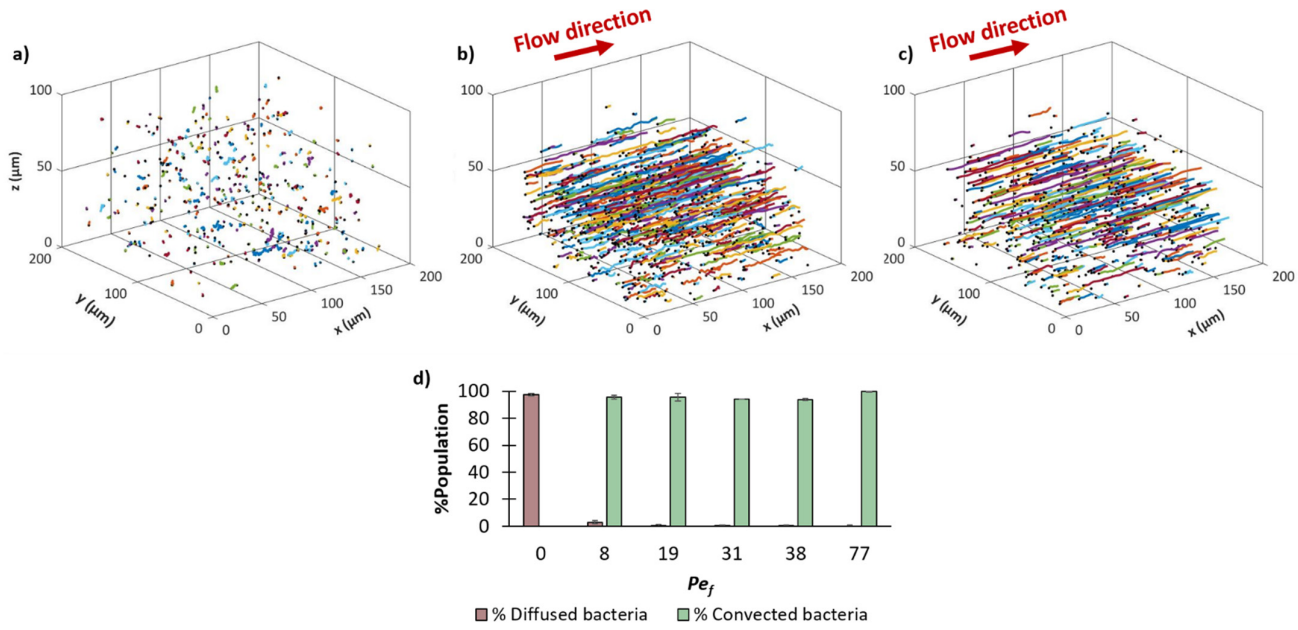


Fig. S4. Graph **(a), (b)** and **(c)** are representative examples of three-dimensional trajectories (about 500) of *Shewanella oneidensis* MR-1 Δfla mutant obtained at different flow Peclet numbers (a = 0, b = 8, c = 38) within a 180 × 180 × 100 µm^3 volume. The capillary walls are located at z = 0 (bottom) and 100 µm (top). Flow direction is along the positive x-axis, as indicated by the red arrow in figure b. **(d)** Mean ± standard deviation of the proportion of populations identified by transport mechanism as a function of applied flow Peclet number. The number of total bacteria analyzed was 88,875 (14,704 for Pe_f = 0; 14,727 for Pe_f = 8; 20,703 for Pe_f = 19; 8,703 for Pe_f = 31; 18,389 for Pe_f = 38; 6,877 for Pe_f = 77). Data were obtained from 2 independent experiments per shear rate.

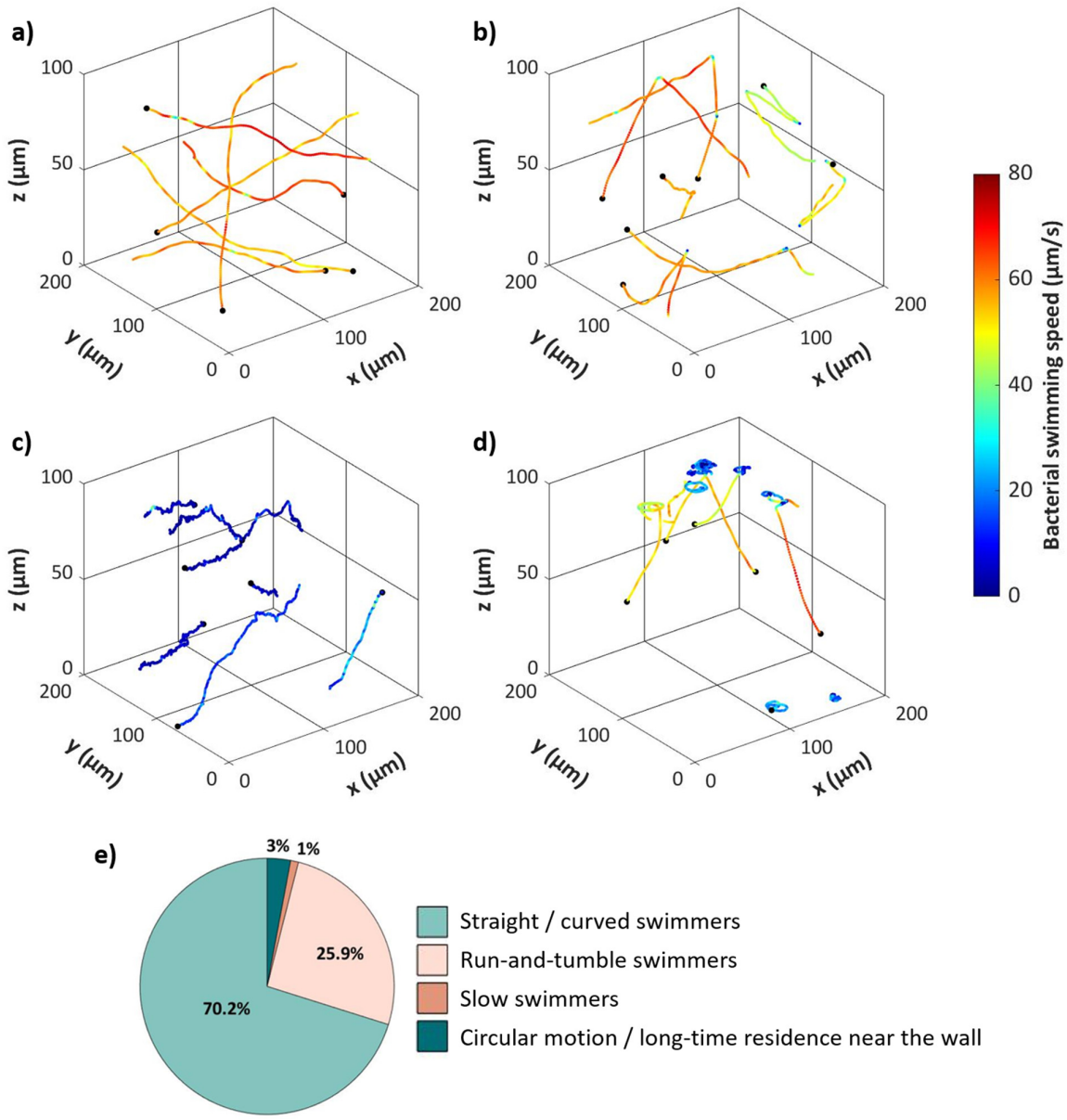


Fig. S5. Representative examples of three-dimensional swimming trajectories of the wild-type *S. oneidensis* MR-1 strain within a 180 × 180 × 100 µm³ observation volume, acquired under static conditions. Trajectories are color-coded according to the instantaneous swimming speed (see color bar on the right) and the starting point of each trajectory is indicated by a black dot. The capillary walls are located at z = 0 µm (bottom) and z = 100 µm (top). Sample trajectories illustrate distinct swimming behaviors: **(a)** long, straight or gently curved runs; **(b)** run-and-tumble dynamics, characterized by abrupt directional changes (θ > 50°); **(c)** slower, less directed swimming; and **(d)** near-wall circular motion or prolonged bacterial residence. **(e)** Pie chart showing the proportion of total motile bacterial trajectories (12,241) classified into these four categories.

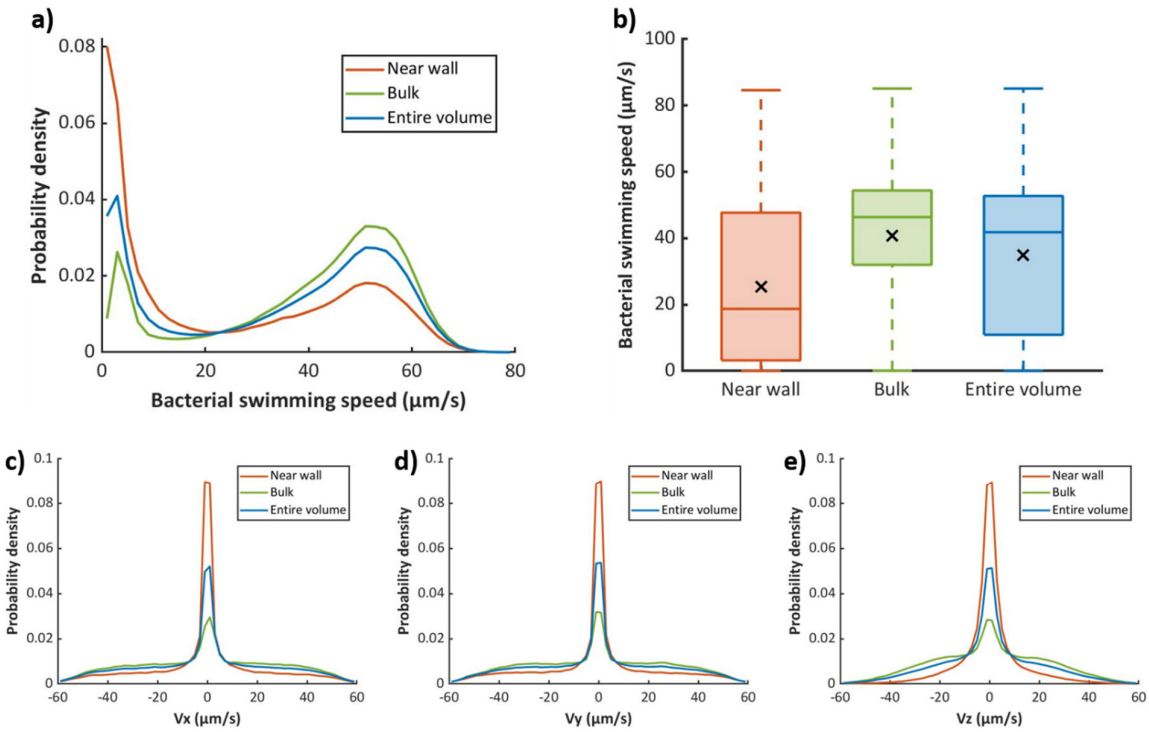


Fig. S6. (a) Bacterial swimming speeds distributions of motile *S. oneidensis* obtained in different regions of the capillary under static condition: near-wall regions (z < 10 µm and z > 90 µm), the bulk region ($z \in [0\,;90]$ µm) and the entire capillary volume. **(b)** Boxplots summarizing the swimming speed data for each region. The central line represents the median; boxes indicate the interquartile range, and the black cross represents the mean value. **(c–e)** Distributions of the velocity components associated with bacterial swimming speeds in the corresponding regions. Data were obtained from 6 independent experiments, with a total of 12,241 motile bacteria analyzed.

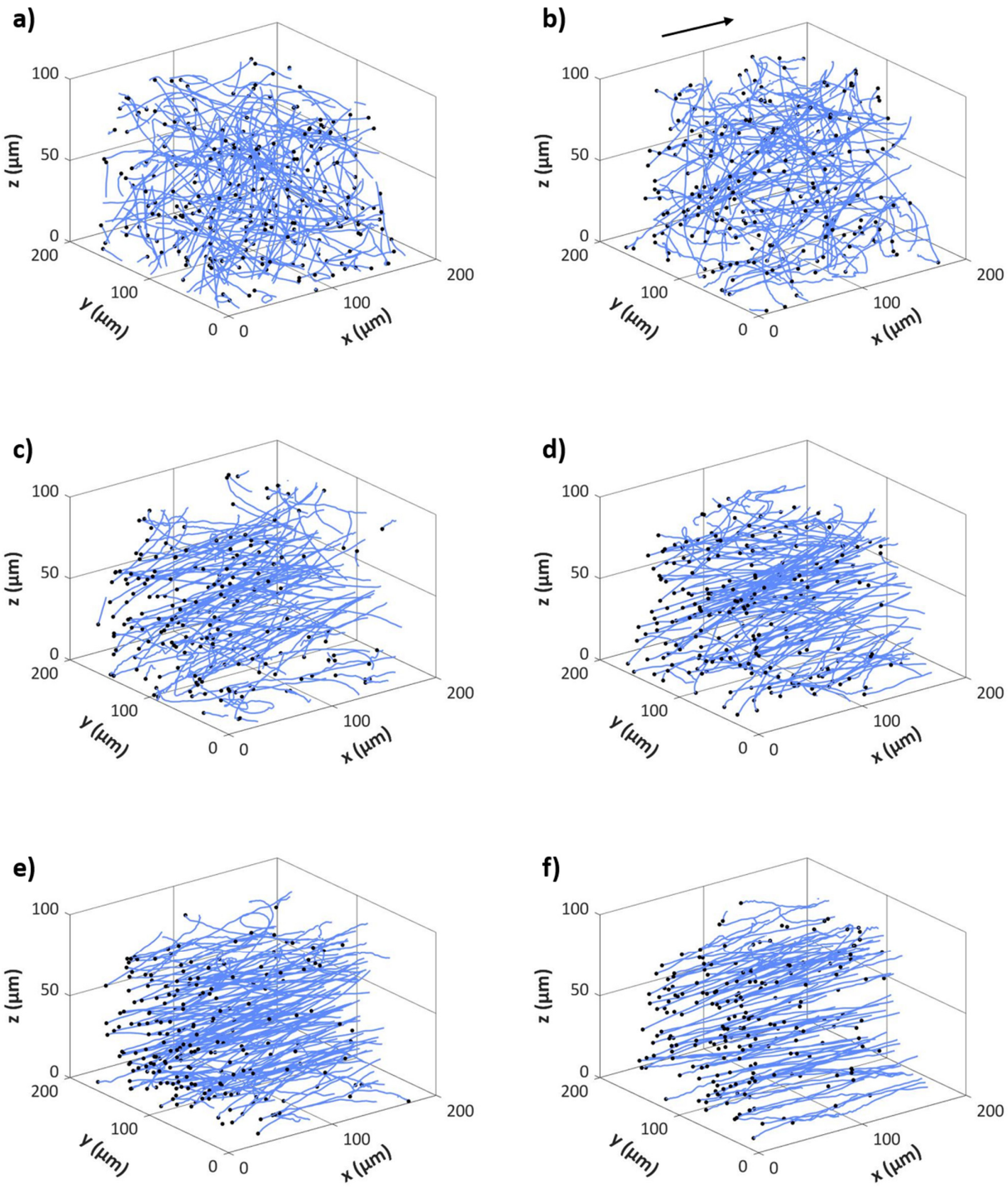


Fig. S7. Graph **(a)**, **(b)**, **(c)**, **(d)**, **(e)** and **(f)** are representative examples of three-dimensional trajectories (about 220) of motile wild-type *Shewanella oneidensis* MR-1 obtained for different flow Peclet number (a = 0, b = 8, c = 19, d = 31, e = 38, f = 77) within a 180 × 180 × 100 µm^3 volume. The capillary walls are located at z = 0 (bottom) and 100 µm (top). Flow direction is along the positive x-axis, as indicated by the black arrow in figure b.

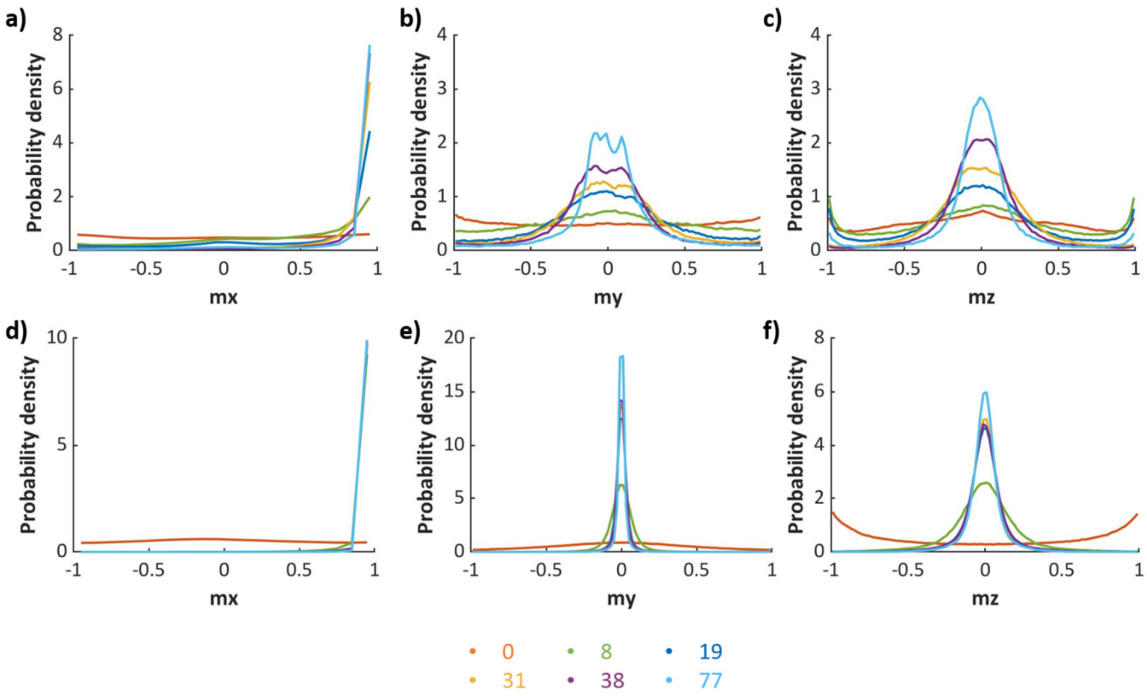


Fig. S8. Probability density of bacterial orientation in the x-direction **(a, d)**, the y-direction **(b, e)** and the z-direction **(c, f)** under applied flow Peclet number (0, 8, 19, 31, 38, 77) for the motile *S. oneidensis* WT population **(a, b, c)** and the Δfla mutant strain **(d, e, f)**. A total of 28,114 bacteria were analyzed for the motile WT population, and 84,103 for the Δfla mutant.

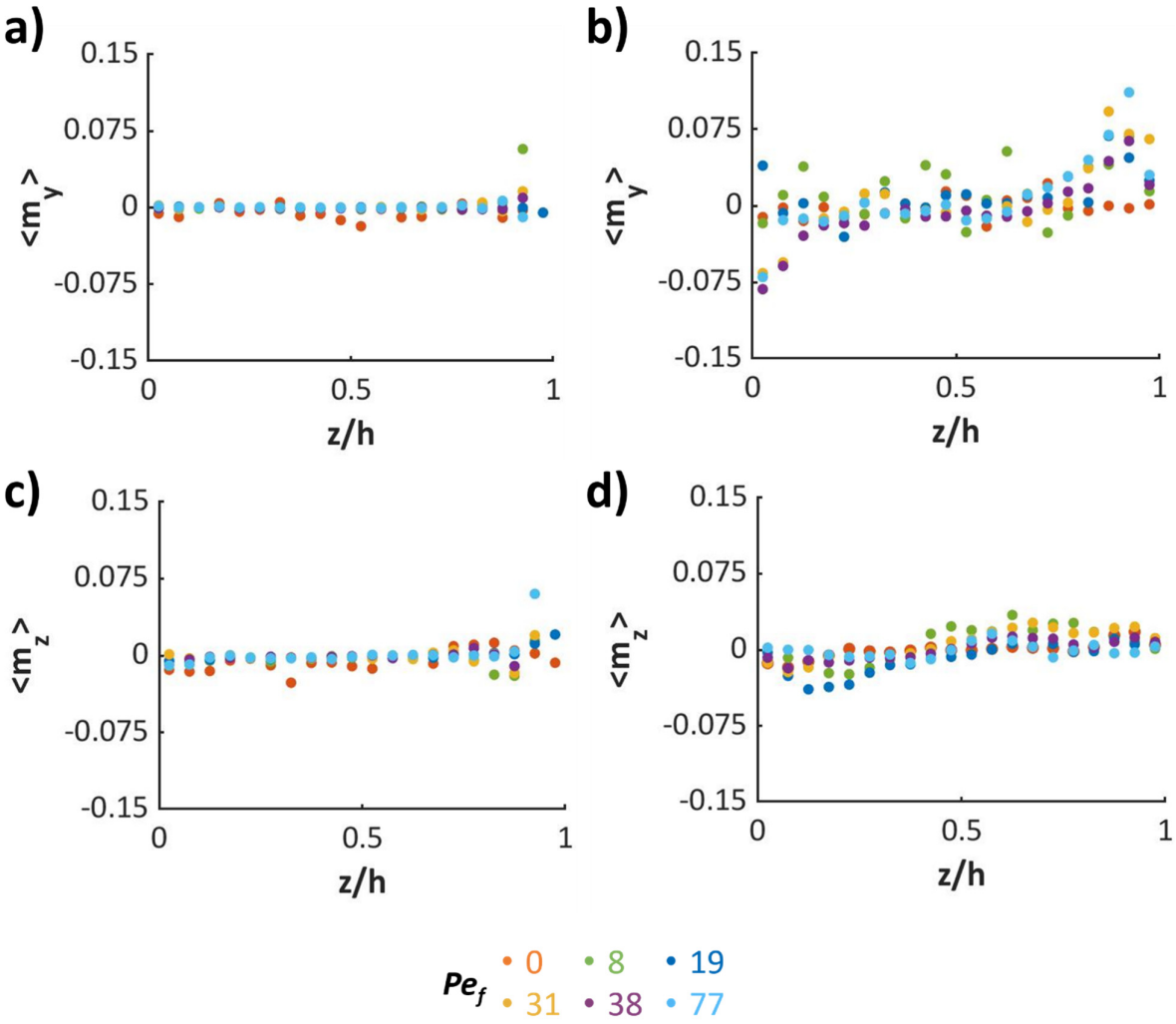


Fig. S9. (a,b) Plots showing the average y orientation (m_y) of the Δfla mutant **(a)** and the motile population of *S. oneidensis* MR-1 WT **(b)** as a function of the flow Peclet number and their position within the capillary, normalized by its height (z/h). **(c,d)** Plots showing the average z orientation (m_z) of the Δfla mutant **(c)** and the motile population of *S. oneidensis* WT **(d)** as a function of the flow Peclet number and their position within the capillary, normalized by its height (z/h). z/h=0 corresponds to the bottom wall and z/h=1 corresponds to the top wall.

A total of 28,114 bacteria were analyzed for the motile WT population, and 84,103 for the Δfla mutant.

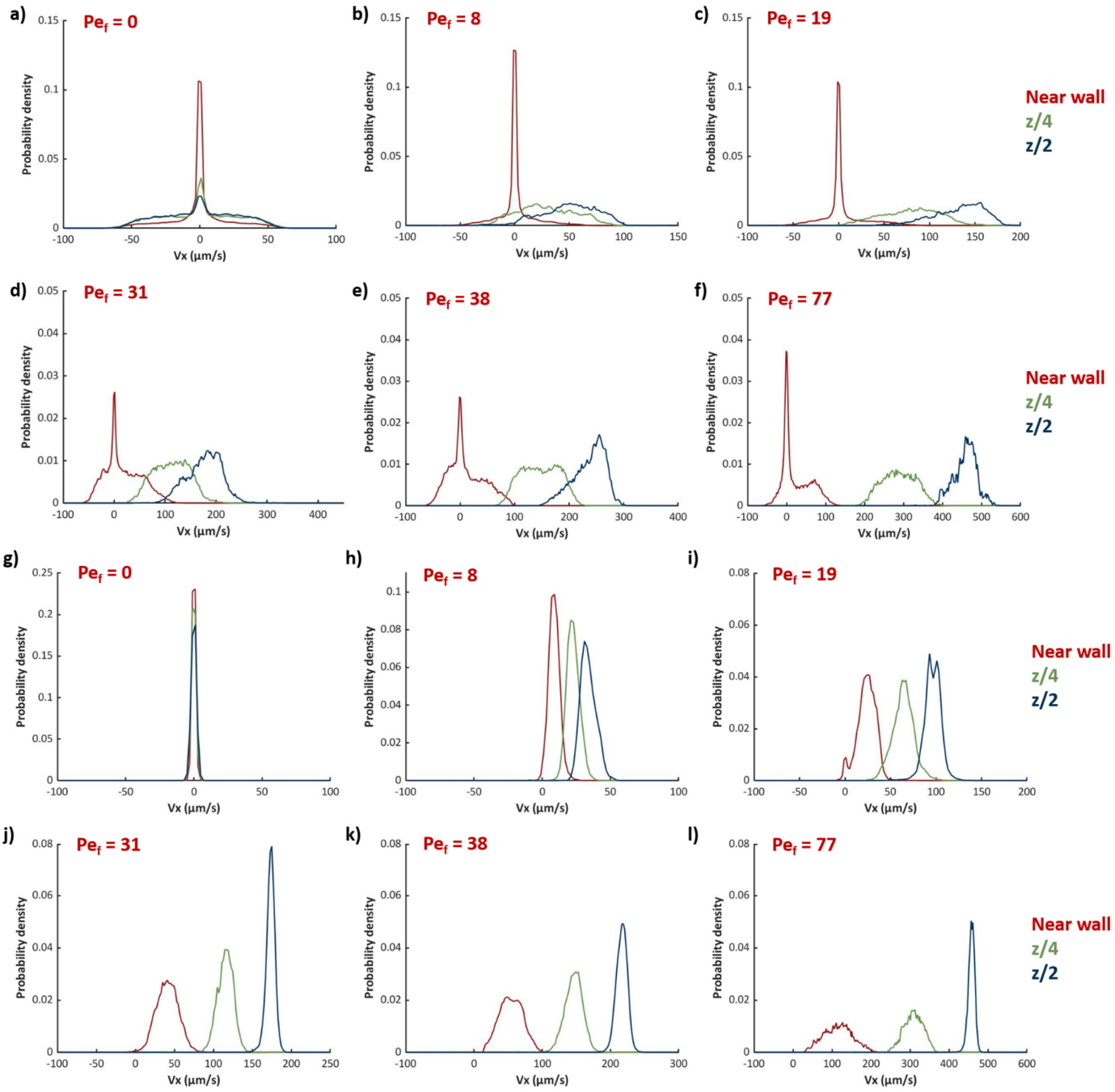


Fig. S10. Probability density of bacterial velocity component in the flow direction (V_x) for three distinct regions within the capillary: **(a)** near the walls (z < 5 µm and z > 95 µm) (dark red), **(b)** in the bottom and top quarter (z ϵ [20:25] and ϵ [75:80] (green) and **(c)** at the central region (z ϵ [45:55]) (blue) of the capillary. Results are shown for motile *S. oneidensis* MR-1 WT (a, b, c, d, e, f) and Δfla mutant (g, h, i, j, k, l) strains under applied flow Peclet number. A total of 28,114 bacteria were analyzed for the motile WT population, and 84,103 for the Δfla mutant.

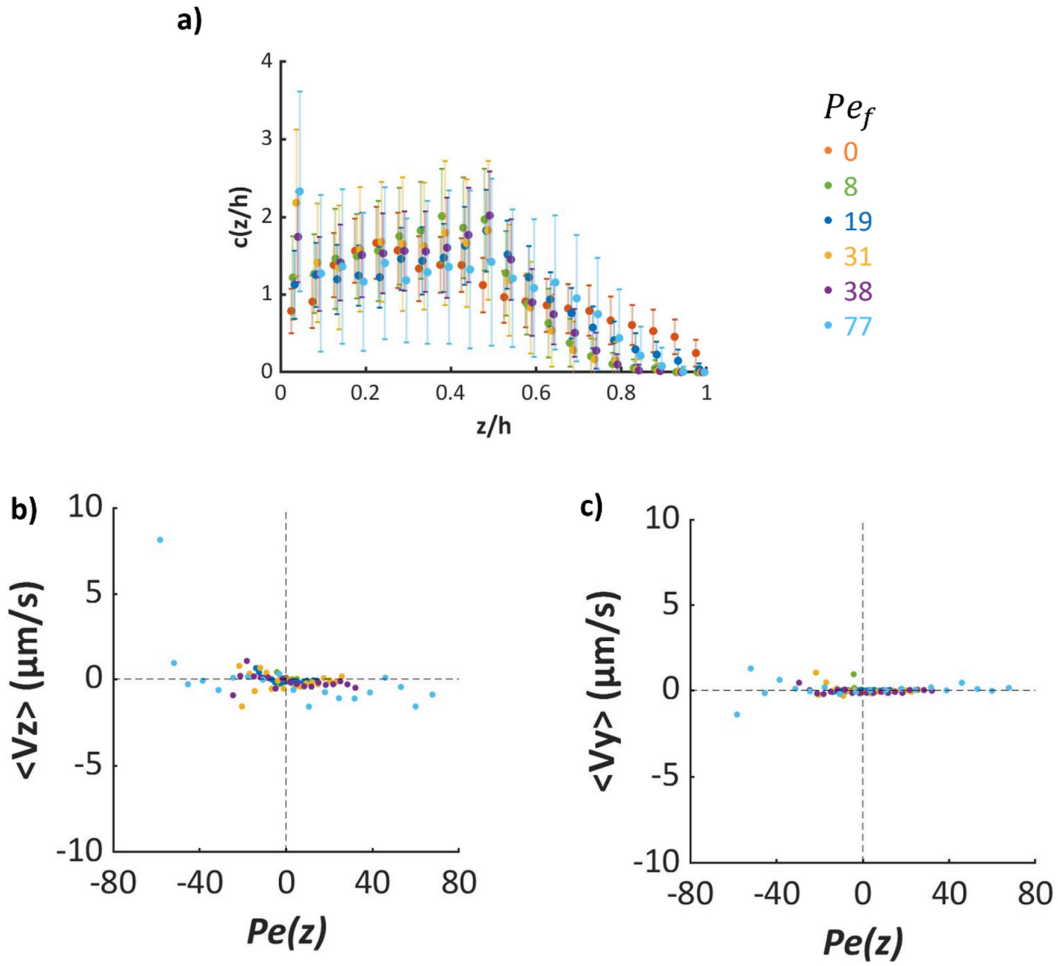


Fig. S11. (a) Vertical concentration profiles of *S. oneidensis* MR-1 Δfla mutant from the bottom wall as a function of the normalized distance z across the capillary height. Curves are color-coded by the corresponding flow Peclet number. **(b-c)** Mean bacterial velocities: V_z (µm/s) in panel (b) and V_y (µm/s) in panel (c) as a function of the applied local Peclet number (Pe_f) for the *S. oneidensis* Δfla mutant. A total of 84,103 bacteria were analyzed.

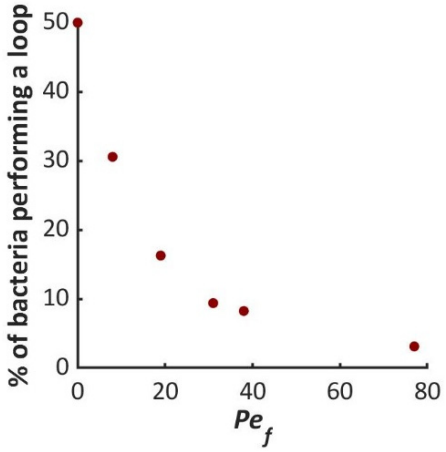


Fig. S12: Proportion of motile *S. oneidensis* MR-1 WT bacteria performing a loop during their trajectory over time, as a function of the applied local Peclet number (Pe_f). The total number analyzed was 28,114.

4 Influence du confinement sur les propriétés de transport

Les résultats soumis pour publication présentent l'influence de l'hydrodynamique sur le transport bactérien pour un confinement donné, correspondant à un capillaire de 100 µm de hauteur. Ce confinement est caractérisé par le nombre de Péclet de confinement : $Pe_s = \frac{v_0}{D_r h}$ (Ezhilan et Saintillan, 2015 ; Ganesh *et al*., 2023), où h est la hauteur du capillaire, v_0 la vitesse caractéristique de nage de *S. oneidensis* ($v_0 = 35$ µm/s), et D_r son coefficient de diffusion rotationnelle (D_r = 0,26 rad²/s), ces deux paramètres ayant été déterminés au cours de notre étude. Le confinement détermine le profil de cisaillement à l'intérieur du capillaire et, par conséquent, les conditions hydrodynamiques auxquelles les bactéries sont exposées, ce qui impacte directement leurs propriétés de transport. Par ailleurs, à mesure que le confinement augmente, les effets de paroi deviennent plus marqués. Ces effets sont connus pour modifier le comportement de nage (Berke *et al*., 2008 ; Elgeti *et al*., 2015 ; Kaya et Koser, 2012 ; Lauga *et al*., 2006 ; Mathijssen *et al*., 2019 ; Molaei *et al*., 2014) ainsi que la vitesse des bactéries à proximité des parois (Frymier *et al*., 1995 ; Lauga et Powers, 2009). L'influence du confinement a été étudiée, notamment chez *E. coli* dans des systèmes expérimentaux mimant des milieux poreux (Bhattacharjee et Datta, 2019 ; Biondi *et al*., 1998 ; Raza *et al.,* 2023 ; Liu *et al*., 2019). Étant donné que *S. oneidensis* se distingue par une nage balistique très persistante, nous avons cherché à évaluer l'effet du confinement sur cette motilité et son couplage avec l'écoulement. Cette section présente les résultats préliminaires obtenus, en condition statique, puis sous cisaillement. Ces résultats concernent la population motile de *S. oneidensis* WT.

4.1 Dynamique bactérienne en condition statique

Les propriétés de nage de la population motile ont été caractérisées en l'absence de flux pour trois conditions de confinement (200, 100 et 50 µm), correspondant respectivement à des nombres de Péclet de confinement (Pe_s) de 0,8 ; 1,6 et 3,2. Les analyses effectuées sont identiques à celles présentées dans l'article pour l'étude de la nage libre de *S. oneidensis* dans un capillaire de 100 µm. Ces données ont été reprises pour comparaison avec les autres confinements testés (200 et 50 µm).

Typologie des trajectoires bactériennes selon le confinement

La Figure 82 (a-c) présente une sélection de dix bactéries motiles obtenues au sein des différents confinements. Les quatre catégories de comportement identifiées pour le capillaire de 100 µm sont également rencontrées pour les deux autres confinements : bactéries se déplaçant par runs légèrement incurvés (bactéries 1 à 4), bactéries alternant runs et tumbles (bactéries 5 à 7), bactéries à faible vitesse (bactérie 8) et bactéries modifiant leur trajectoire proche de la paroi (bactéries 9 et 10). Cependant, des différences de proportions apparaissent selon le degré de confinement (Figure 82d). Pour le confinement le plus important (50 µm, Pe_s = 3,2), le pourcentage de bactéries alternant des runs avec changements d'orientation importants (> 50°) tend à égaler celui des bactéries se déplaçant par longs runs (44 % vs 51 %).

En revanche, pour les deux confinements plus faibles, cette proportion tend vers un ratio 30 % vs 70 %, les bactéries se déplaçant majoritairement par runs. Les catégories minoritaires conservent quant à elles des proportions similaires, indépendamment du confinement.

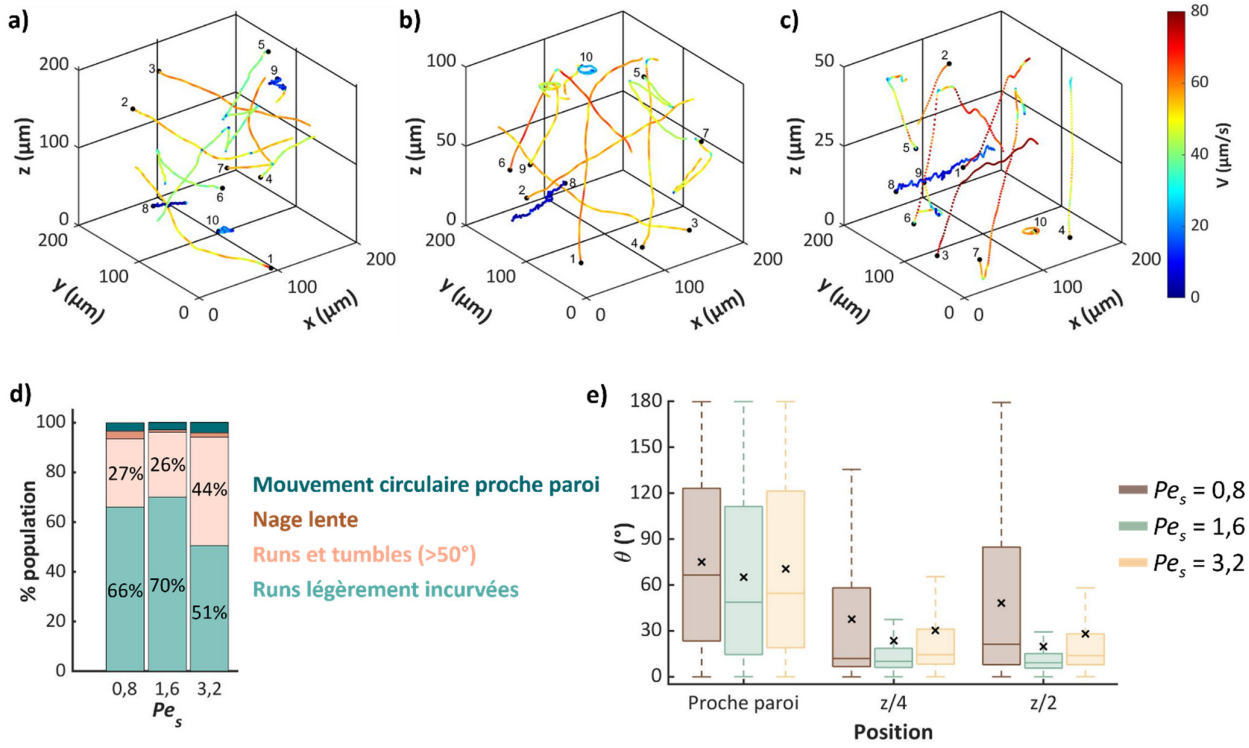


Figure 82. **(a–c)** Exemples représentatifs (N_b = 10) de bactéries motiles de *S. oneidensis*, colorées selon leurs vitesses instantanées, pour différents Pe_S : a) 0,8 ; b) 1,6 ; c) 3,2. **(d)** Diagramme en barres présentant, pour chaque Pe_S testé, les proportions de bactéries motiles (N_b = 17 171 ; 12 241 ; 12 122 pour Pe_S croissants), réparties selon les catégories de nage identifiées. **(e)** Boxplot des angles de réorientation θ en fonction de la position z au sein du capillaire (proche paroi, z/4 et z/2) et du Pe_S, établis à partir des mêmes effectifs de bactéries que dans (d).

Pour mieux comprendre l'augmentation des réorientations observée sous fort confinement, nous avons cherché à identifier dans quelles zones du capillaire elles se produisaient (Figure 82e). Trois zones ont été étudiées, proche de la paroi, au quart et à mi-hauteur du capillaire. L'analyse montre que les angles élevés apparaissent majoritairement à proximité de la paroi pour les trois confinements testés, avec une moyenne d'angle supérieure à 65°, et une large dispersion des angles. Ces angles importants sont associés aux effets de paroi, discutés au Chapitre 1 (paragraphe 2.3.3). Pour rappel, la proximité de la paroi génère des forces hydrodynamiques qui exercent un couple sur la bactérie, entraînant sa rotation et des trajectoires courbées le long de la surface. Ce comportement a été observé expérimentalement dans notre étude (bactérie 9-10, Figure 82), ainsi que dans d'autres travaux antérieurs (Elgeti *et al.*, 2015 ; Lauga *et al.*, 2006 ; Lauga et Powers, 2009). De plus, nous avons observé que les bactéries atteignant la paroi y restent très peu de temps avant de retourner dans le volume, souvent après une réorientation avec un angle important (trajectoires 6b et 7c de la Figure 82 par exemple).

Au sein du volume ($z/4$ et $z/2$), le comportement de réorientation observé est très différent de celui proche de la paroi, mais reste très similaire entre les deux positions testées. Pour les confinements les plus forts (Pe_s = 1,6 et 3,2), les comportements sont proches : la valeur moyenne des angles (environ 25°) est fortement réduite, facteur 2 par rapport à celle proche de la paroi et la dispersion est également plus faible. En revanche, pour le faible confinement (Pe_s = 0,8), bien qu'une réduction de la moyenne soit également observée par rapport à la position proche paroi, les distributions restent plus étendues que pour les deux autres confinements. Ces observations indiquent que les réorientations à angle élevé sont plus fréquentes dans le volume du capillaire de 200 µm que dans les autres. Nous attribuons ce constat à une probabilité plus importante de réorientation de la bactérie dans le capillaire de 200 µm. Pour mettre en évidence cet effet nous calculons le temps de persistance de nage des bactéries pour les 3 confinements (Figure 83).

Influence du confinement sur la persistance et la dynamique de nage

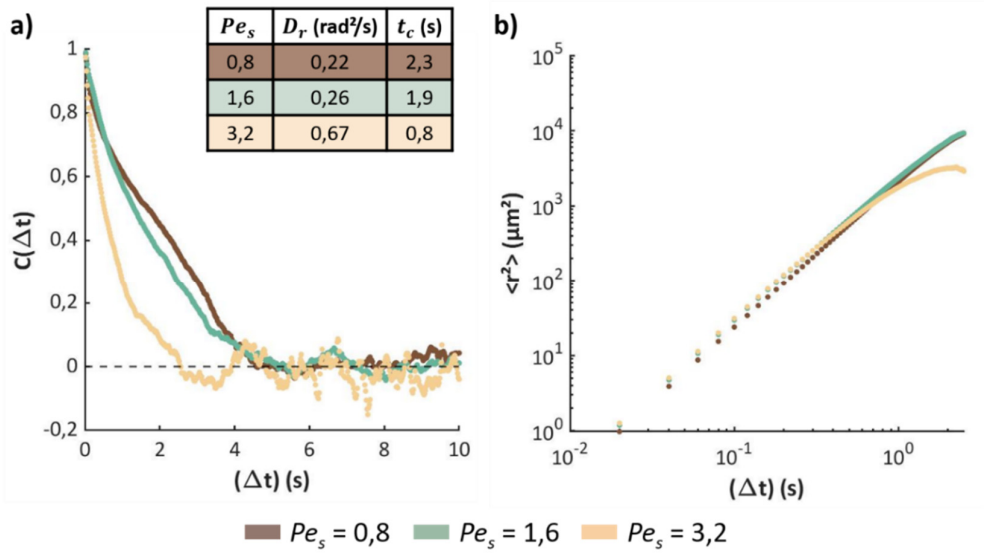


Figure 83. **a)** Moyenne de la fonction d'autocorrélation des orientations et **b)** Déplacement quadratique moyen (MSD) de la population motile de *S. oneidensis* au sein du capillaire pour différents Pe_s. L'insert à droite de la figure (a) présente les paramètres de persistance (t_c et D_r) obtenus. Le nombre de bactéries motiles analysées est N_b = 17 171 ; 12 241 ; 12 122, respectivement pour les Pe_s croissants étudiés.

La fonction d'autocorrélation des orientations (Figure 83a) montre une décroissance exponentielle plus prononcée pour le confinement le plus fort (Pe_s = 3,2), traduisant une perte d'orientation plus rapide. Pour les deux autres confinements, des cinétiques de décroissance relativement similaires sont observées. L'ajustement par une fonction exponentielle permet d'estimer le temps de persistance de nage de la bactérie. La valeur obtenue à fort confinement (Pe_s = 3,2) est 2,4 fois inférieure à celle du confinement intermédiaire, qui est elle-même 1,2 fois inférieure à celle du plus faible confinement. Cette forte diminution du t_c sous fort confinement se traduit par un coefficient de diffusion rotationnelle plus élevé (D_r = 0,67, soit un facteur 2,8), indiquant une persistance directionnelle réduite. Ce résultat est cohérent avec l'observation d'un plus grand nombre de tumbles chez la bactérie, indiquant une perte d'orientation

accrue par rapport aux bactéries se déplaçant majoritairement par runs, comme observé dans les deux confinements plus faibles. Ces observations sont également cohérentes avec l'analyse du déplacement quadratique moyen (MSD) (Figure 83b). Pour les trois confinements, les pentes initiales de 2 sur la représentation log-log du MSD en fonction du Δt indiquent un régime balistique. Les courbes se superposent et s'ajustent à une vitesse moyenne (v_{moyen}) de 47 µm/s environ. Pour le confinement le plus fort, on observe une diminution de la pente du MSD vers 1 seconde marquant le passage du mouvement balistique à un régime diffusif, phénomène absent dans les autres confinements. Ce passage au régime diffusif est cohérent avec le temps de persistance d'environ une seconde calculé précédemment ; au-delà de ce temps, la bactérie perd son orientation initiale, son mouvement devient diffusif, ce qui met en évidence l'effet du confinement sur la dynamique de la bactérie.

L'effet du confinement peut également être analysé en comparant l'épaisseur du capillaire h à la longueur de persistance de nage de la bactérie, notée l_p (Figure 84). Nous estimons cette longueur dans le cas du plus faible confinement (Pe_s = 0,8) : $l_p = v_{moyen} \times t_c = 47 \times 2{,}3 \approx 100$ µm.
Pour le capillaire de 200 µm, la bactérie peut nager et se réorienter dans le volume sans rencontrer de paroi. En revanche pour le capillaire de 100 µm (Pe_s = 1,6), la longueur de persistance est de même ordre de grandeur que la distance h entre les parois, ce qui augmente la probabilité de rencontre avec celles-ci. Le cas le plus défavorable correspond au confinement le plus fort (Pe_s = 3,2 ; h = 50 µm), pour lequel le rapport h/l_p est d'environ 0,5. Dans ce cas, la bactérie se réoriente plus fréquemment au niveau des parois qu'au sein du volume, et la probabilité de rencontre avec les parois est fortement augmentée.

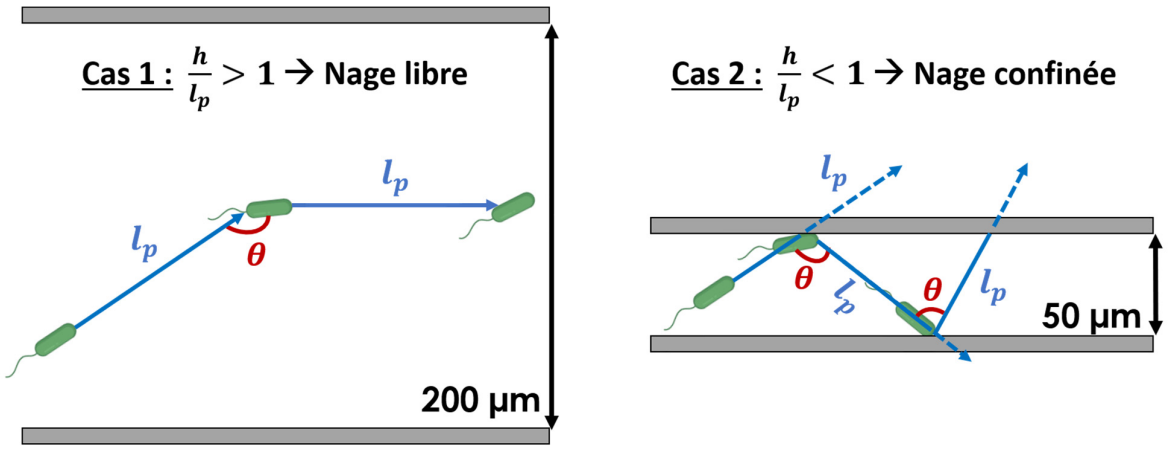


Figure 84. Schématisation de l'influence du confinement sur la réorientation des bactéries. Avec l'augmentation du confinement, la bactérie ne peut plus parcourir sa longueur de persistance l_p sans rencontrer une paroi, ce qui entraîne une réorientation θ.

Distribution des vitesses en fonction de la géométrie confinée

L'analyse des distributions de la vitesse instantanée, ainsi que de ses composantes selon les axes x, y et z, a ensuite été réalisée (Figure 85). L'observation d'une réduction significative de la vitesse instantanée à

proximité des parois dans le capillaire de 100 µm (résultats présentés en Fig. S6 de l'article soumis) nous a amenés à supposer que des distributions de vitesse globalement plus faibles pourraient être observées dans le cas d'un confinement plus important. En effet, dans ce dernier cas, une plus grande fraction de l'espace accessible aux bactéries serait affectée par le ralentissement induit par les parois, contrairement aux systèmes moins confinés où cet effet reste plus limité.

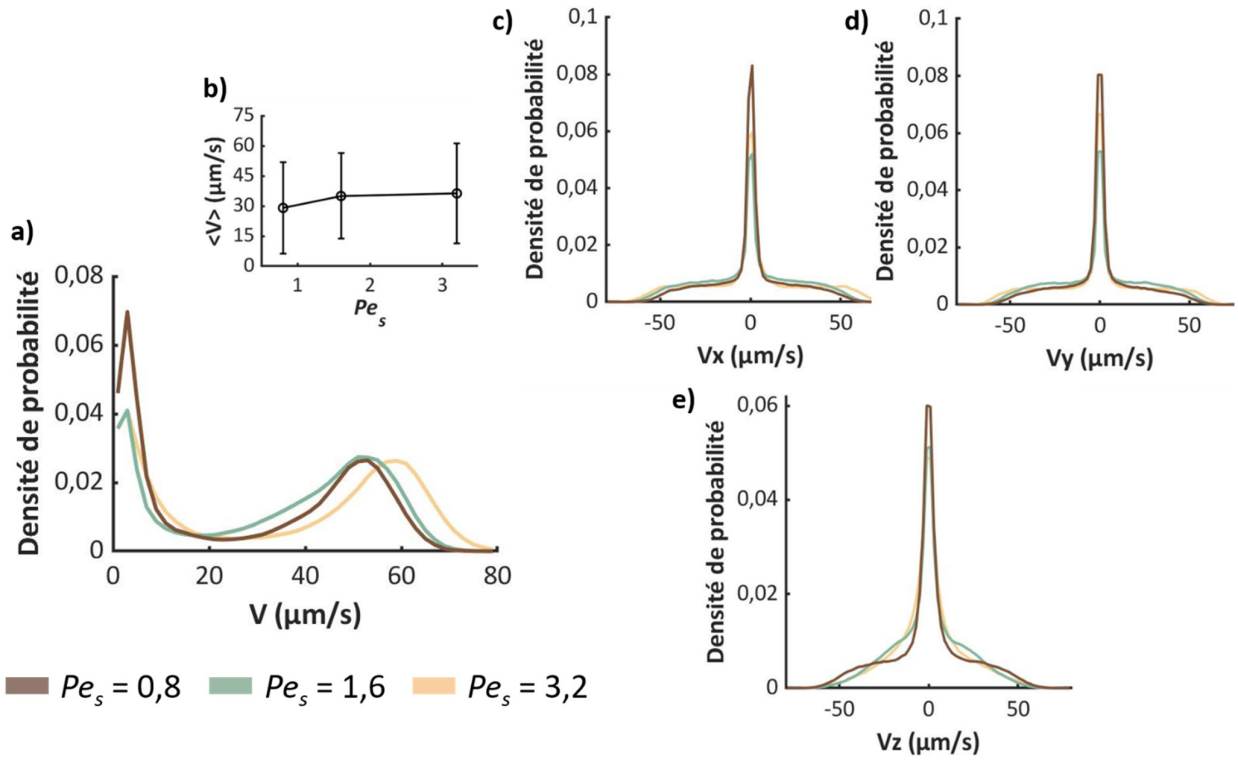


Figure 85. **a)** Fonction de densité de probabilité des vitesses instantanées des bactéries motiles de la souche MR-1 WT en fonction du Pe_s **b)** Moyenne et écart-type des vitesses instantanées en fonction du Pe_s **(c-e)** Fonctions de densité de probabilité des composantes de la vitesse en (c) x, (d) y et (e) z. Le nombre total de bactéries motiles analysées est N_b = 17 171 ; 12 241 ; 12 122, respectivement pour les Pe_s croissants étudiés.

Les résultats obtenus permettent toutefois de réfuter cette hypothèse (Figure 85 a,b). Globalement les distributions des vitesses instantanées sont relativement similaires pour les 3 confinements, avec des vitesses moyennes proches de l'ordre de 35 µm/s.

Nous nous sommes également intéressés à la distribution des composantes de vitesse (Figure 85 c-e). Pour le plus faible confinement (h = 200 µm, Pe_s = 0,8), les distributions des trois composantes sont similaires, reflétant une isotropie de la nage et par conséquent une absence de contrainte liée au confinement. Pour les confinements les plus forts, les composantes dans le plan parallèle aux parois (V_x, V_y) sont identiques à la nage libre (Pe_s = 0,8) reflétant une absence de contrainte dans ce plan. En revanche pour la composante de vitesse dans la direction des parois (V_z), on observe une déviation par rapport à la nage libre, avec une distribution moins homogène. Ce résultat met également en évidence un impact du confinement sur la nage des bactéries.

Profil de concentration bactérienne selon le confinement

La distribution des bactéries selon l'axe z a ensuite été analysée (Figure 86). Pour les trois confinements testés, une sur-concentration de bactéries à proximité des parois est observée. Cette accumulation a été rapportée expérimentalement (Berke *et al.*, 2008 ; Rusconi *et al.*, 2014) et numériquement (Chilukuri *et al.*, 2014 ; Ezhilan et Saintillan, 2015 ; Ganesh *et al.*, 2023), et s'explique par un effet « d'aspiration » des bactéries proche des parois, lié à la perturbation hydrodynamique générée par la nage (Clément *et al.*, 2016 ; Drescher *et al.*, 2011). Dans le volume du capillaire, la concentration en bactéries est plus faible mais relativement homogène, à l'exception du confinement le plus fort. On constate qu'à mesure que le confinement augmente, les profils de concentration tendent à s'homogénéiser : la variation de concentration entre la paroi et le centre du capillaire se réduit. Cet effet est surtout bien marqué pour le confinement le plus important (Pe_s = 3,2).

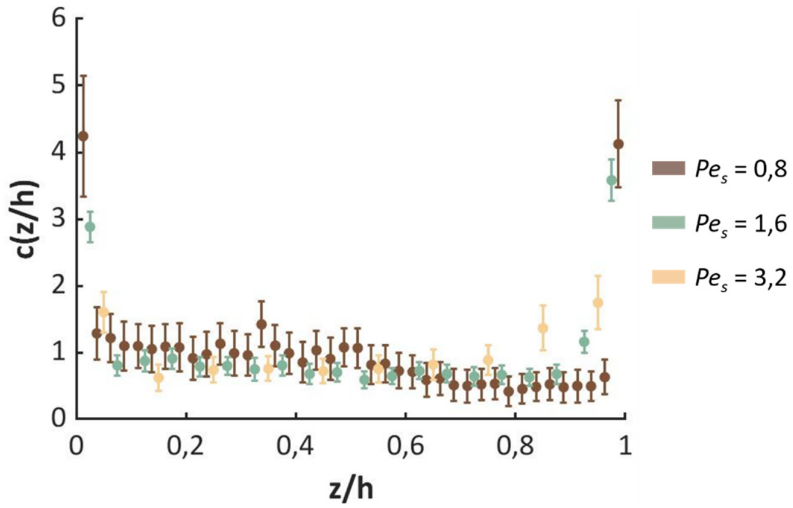


Figure 86. Profil de concentration selon l'axe z, normalisé par la hauteur h du capillaire, en fonction du Pe_s pour les bactéries motiles de la souche MR-1 WT. Le nombre total de bactéries motiles analysées est N_b = 17 171 ; 12 241 ; 12 122, respectivement pour les Pe_s croissants étudiés.

À partir des profils de concentration $c(z/h)$ nous pouvons estimer une épaisseur caractéristique de couche limite (δ) au sein de laquelle les bactéries s'accumulent. En définissant la couche limite comme la distance à la paroi pour laquelle la concentration atteint la concentration moyenne ($c(z/h = \delta) = 1$), on obtient pour chaque confinement, une épaisseur réelle z comprise entre 7 et 10 µm. Cette valeur est très similaire à celles trouvées par Molaei *et al*. (2014) pour *E. coli* (5,1µm).

De manière théorique, en reprenant les arguments du modèle de Saintillan (Ezhilan et Saintillan, 2015), soit un équilibre des flux diffusifs et convectifs des bactéries au niveau des parois : $\frac{D_t \times c}{\delta} \approx c \times v_0$, on obtient une estimation de l'épaisseur de la couche limite $\delta \approx \frac{D_t}{v_0}$. En prenant comme valeur de référence $v_0 = 35$ µm/s, et un coefficient de diffusion translationnelle $D_t \approx \frac{V_0^2 t_c}{3}$ on trouve $\delta \approx 25$ µm. Cette valeur de couche limite estimée est du même ordre de grandeur que celle mesurée, bien que 2 fois plus grande. Dans les deux cas, ces valeurs impliquent qu'à mesure que le confinement augmente, la couche limite

occupe une fraction croissante de l'espace disponible. Cela tend à lisser les forts gradients de concentration observés sous faible confinement et conduit à une répartition plus homogène des bactéries dans l'épaisseur du canal. En d'autres termes, lorsque le confinement devient important, les bactéries se trouvent pratiquement en permanence sous l'influence des parois peu importe leur position dans le canal.

4.2 Dynamique bactérienne sous cisaillement

L'influence du confinement a ensuite été étudiée sous écoulement, en reprenant les nombres de Péclet (Pe_f) évalués pour le capillaire de 100 µm (article). Cependant, les résultats pour le plus fort confinement (capillaire de 50 µm, Pe_s = 3,2) ne sont pas disponibles en raison de difficultés expérimentales rencontrées pour ce dernier et du manque de temps pour y remédier. Les résultats portent donc uniquement sur les Pe_s de 0,8 et 1,6 ; bien que des niveaux de confinement plus élevés auraient été souhaitables. La partie précédente, réalisée en condition statique, avait en effet mis en évidence des différences de comportement bactérien sous fort confinement, tandis que pour ces deux valeurs de Pe_s, peu de variations étaient observables. Il convient également de souligner que l'application d'un écoulement dans ces deux systèmes ne génère pas non plus de différences très marquées, comme on peut l'observer qualitativement sur la Figure 87 en comparaison avec la Fig. 4 de l'article soumis. De manière similaire au confinement intermédiaire (capillaire 100 µm), l'augmentation de l'intensité de l'écoulement entraîne une réduction de la tortuosité des trajectoires ainsi qu'une diminution de leur liberté d'exploration tridimensionnelle.

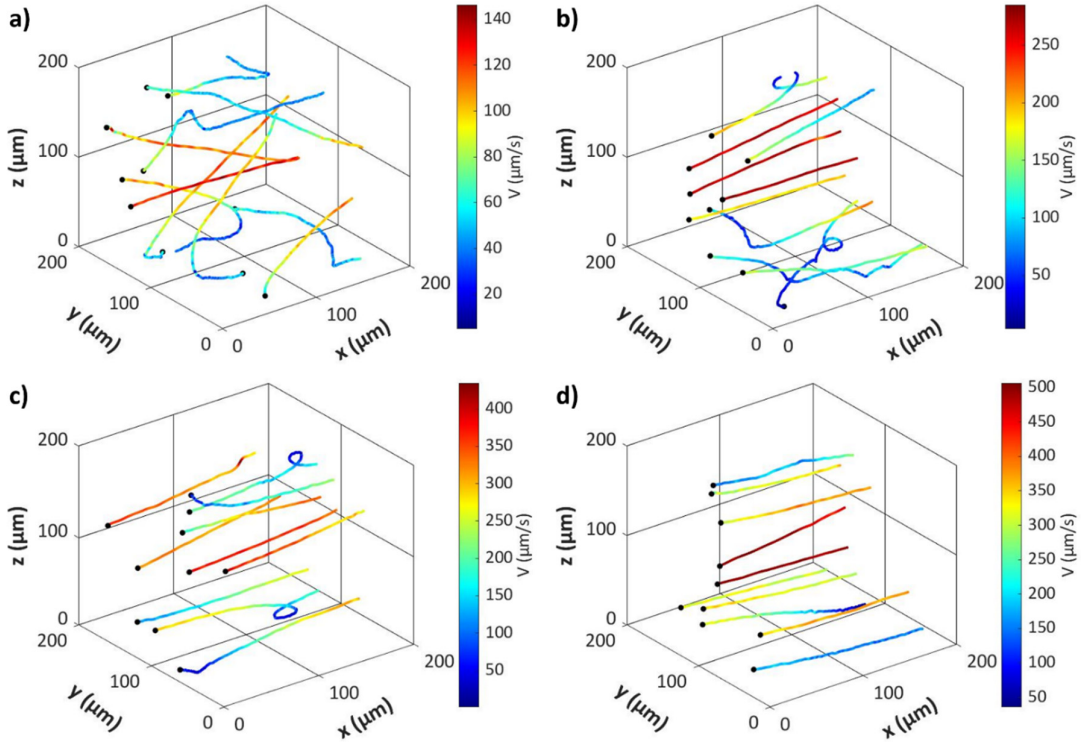


Figure 87. Exemples représentatifs (N_b = 10) de bactéries motiles de *S. oneidensis*, colorées selon leurs vitesses instantanées, pour différents Pe_f : a) 8 ; b) 19 ; c) 31 ; d) 38 et pour le plus faible confinement testé (capillaire 200 µm ; Pe_s = 0,8).

La présence d'un écoulement permet également l'émergence de comportements bactériens déjà discutés pour le capillaire de 100 µm, et repris ici afin d'examiner l'effet de ces deux confinements testés.

Rhéotactisme latéral

Parmi eux figure le rhéotactisme latéral dans le plan de la vorticité (direction y), lié à la chiralité des flagelles et dépendant du cisaillement, comme démontré expérimentalement dans de nombreuses études (Jing *et al.,* 2020 ; Junot *et al., 2019* ; Marcos *et al*., 2012 ; Mathijssen *et al*., 2019), y compris la nôtre (Figure 88).

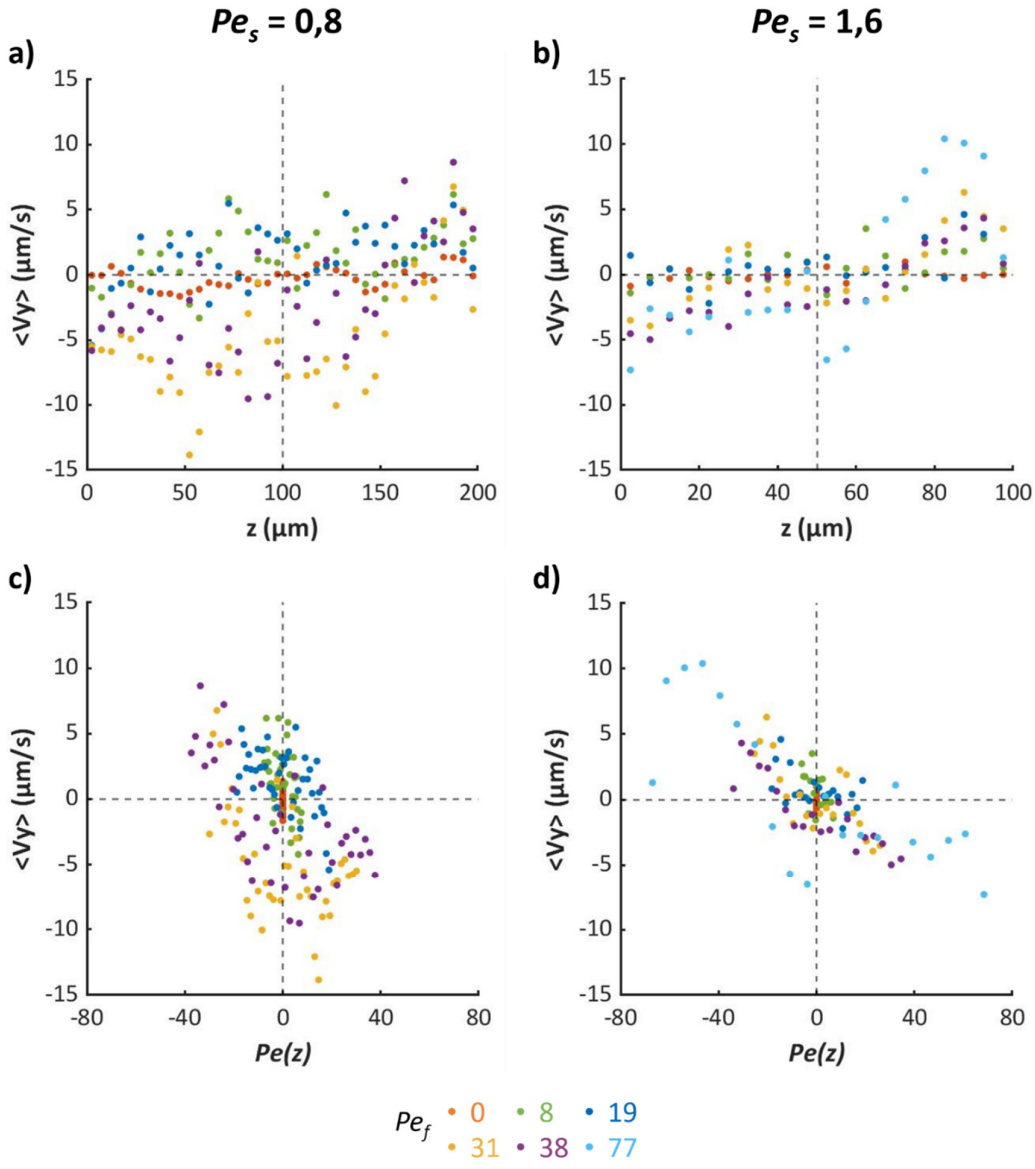


Figure 88. Évolution de $< Vy >$ (µm/s) de la population motile de *S. oneidensis* en fonction du Pe_f selon la position ***z*** au sein du capillaire (a-b) ou selon le cisaillement local imposé (c-d) pour les 2 confinements testés (N_b = 28 300 et 28 114 pour Pe_s croissants).

La Figure 88 (a,b) présente les vitesses latérales moyennes ($< V_y >$) mesurées à différentes positions z du capillaire pour les 2 confinements (Pe_s= 0,8 et 1,6). Les vitesses présentent une symétrie par rapport au

centre du capillaire (z/h = 0,5) qui correspond à la zone de l'écoulement où le taux de cisaillement s'annule et s'inverse. Nous observons également que la vitesse rhéotactique évolue linéairement avec la position ainsi qu'avec l'augmentation du Pe_f ce qui laisse penser que cette vitesse dépend du cisaillement local. Pour tenir compte de ces deux dépendances nous traçons sur la Figure 88 (c,d), la vitesse rhéotactique en fonction du nombre de Péclet local défini comme : $Pe(z) = \dot{\gamma}(z)/D_r$ où $\dot{\gamma}(z)$ est le taux de cisaillement local. Pour les deux confinements testés, nous observons bien un regroupement des points sur une courbe maitresse permettant d'affirmer que dans nos conditions expérimentales, la vitesse rhéotactique locale ne dépend que du gradient de vitesse local. Dans notre cas, pour *S. oneidensis* et le plus fort cisaillement testé, cette vitesse peut représenter jusqu'à 28 % de la vitesse de nage, ce qui est cohérent avec les ordres de grandeur rapportés pour *B. subtilis* (Marcos *et al.,* 2012) et *E. coli* (Jing *et al*., 2020) dans des conditions d'écoulement proches.

Concernant l'effet du confinement, nous ne nous attendions pas à observer de différences sur cette composante V_y étant donné que nous avons travaillé à des Pe_f équivalents, ce qui correspond à tester les mêmes valeurs de cisaillement local dans les deux capillaires. La symétrie par rapport au centre du capillaire, ainsi que les ordres de grandeur des vitesses rhéotactiques en fonction du Pe_f sont relativement proches, ce qui soutient cette hypothèse. Néanmoins, les résultats pour le confinement intermédiaire apparaissent plus nets, avec des tendances mieux définies. Une explication possible est une détection et un suivi moins précis des bactéries dans la partie supérieure du capillaire de faible confinement (h =200 µm), en raison des limites associées à la méthode du spectre angulaire, valide pour de faibles distances de propagation (~ 100 µm), soit 2 fois la taille de la hauteur du capillaire pour Pe_s = 0,8. Cette hypothèse est étayée par l'observation d'un nombre réduit de bactéries détectées dans la partie supérieure du capillaire par rapport à celle inférieure.

Distribution bactérienne et *shear trapping*

- *Distribution bactérienne*

Nous examinons à présent l'effet de l'écoulement et du confinement sur les profils de concentration dans le capillaire (Figure 89). Pour le confinement de 100 µm (Pe_s = 1,6), le profil est relativement symétrique, tandis que pour le confinement de 200 µm ($Pe_s = 0{,}8$), les profils sont plats et confondus au-delà de z/h = 0,5, à l'exception de la condition statique. Ce phénomène pourrait être lié à des limites de la méthode du spectre angulaire (hypothèse déjà évoquée) ou à une sédimentation des bactéries pendant l'expérience. Toutefois, si la sédimentation était responsable, elle devrait également se produire pour le confinement intermédiaire, d'autant plus que le temps caractéristique de sédimentation y est plus court : la hauteur du capillaire étant deux fois plus faible (T_s = 500 s pour Pe_s = 0,8 et $T_s = 250$ s pour Pe_s = 1,6 en considérant $h/2$ comme distance caractéristique). En raison de cette asymétrie expérimentale, nous avons choisi de limiter notre analyse à la première moitié du capillaire ($z/h \in$ [0 - 0,5]).

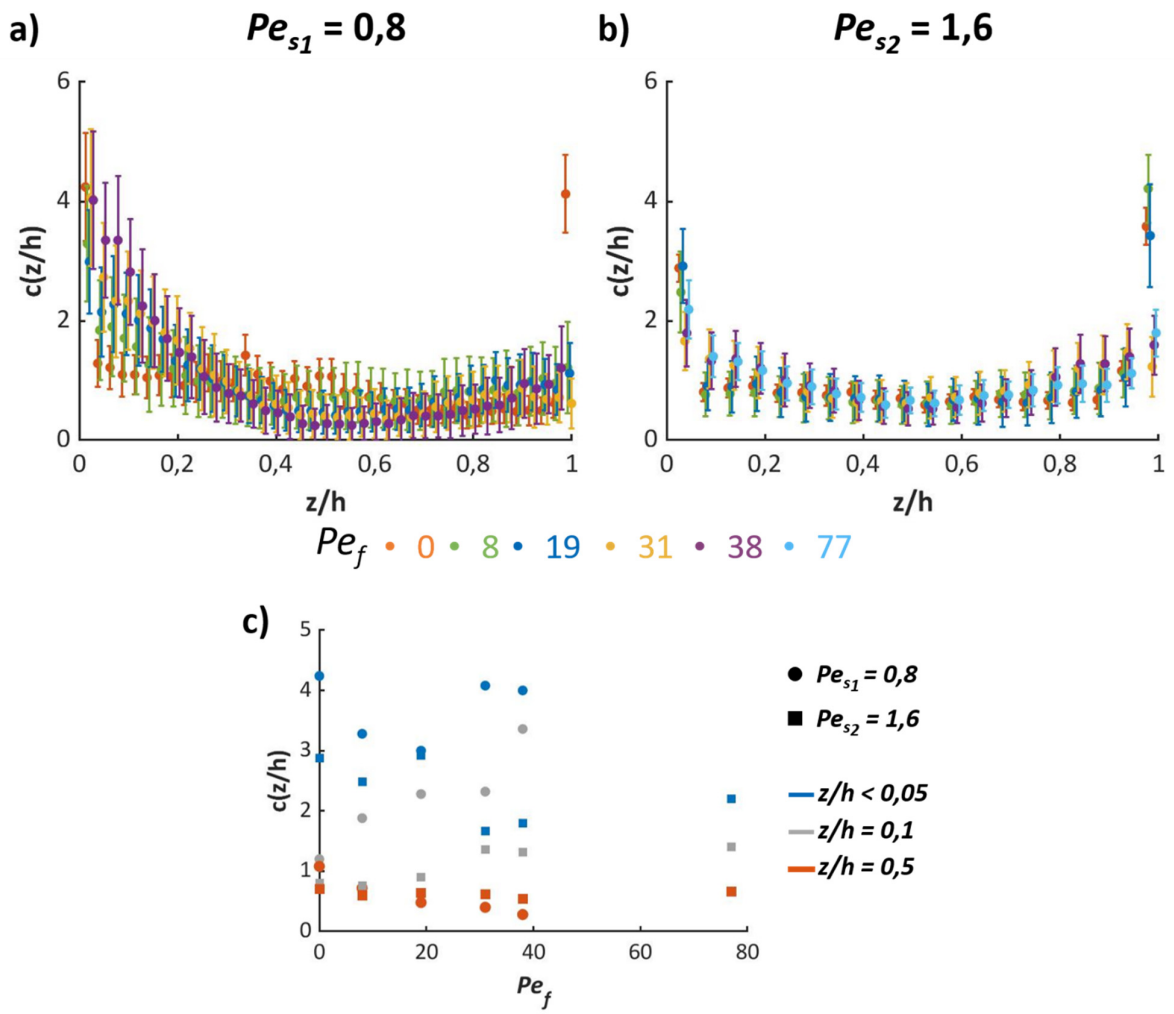


Figure 89. (a-b) Profil de concentration selon z/h en fonction du Pe_f pour les bactéries motiles de la souche MR-1 WT : a) Pe_s = 0,8, nombre de bactéries : N_b = 28 300 (réparties par Pe_f croissants : 17 171, 2 001, 3 782, 2 572, 2 774) et b) Pe_s = 1,6, N_b = 28 114 (réparties par Pe_f croissants : 12 241, 1 816, 1 991, 5 346, 4 192, 2 528). c) Évolution de la concentration à différentes positions du capillaire : proche paroi (z/h < 0,05) ; z/h = 0,1 et z/h = 0,5) pour les 2 valeurs de Pe_s étudiées.

Pour les deux confinements évalués, l'application d'un écoulement perturbe légèrement la distribution bactérienne par rapport au profil statique. En condition statique, la concentration est fortement localisée près de la paroi, avec une couche limite de l'ordre de 7 à 10 µm, avant de diminuer rapidement et de se stabiliser sur le reste du capillaire. Sous écoulement, pour l'ensemble des Pe_f évalués, cette diminution est moins abrupte et s'étend sur une distance pouvant atteindre 30 % de la hauteur du capillaire ($z/h \sim 0{,}3$) avant de retrouver un niveau de concentration comparable à celui observé en statique, ce qui suggère un épaississement de la couche limite. Cette tendance, synonyme d'une accumulation de bactéries au voisinage de la paroi, est d'autant plus marquée lorsque Pe_f augmente. Cette accumulation proche paroi s'accompagne d'un déficit relatif au centre du capillaire, avec des concentrations mesurées inférieures à celles observées en statique ; phénomène qui s'accentue également lorsque Pe_f augmente. À titre d'exemple, pour $Pe_s = 0{,}8$, la concentration au centre du capillaire est 4 fois plus faible à Pe_f = 38 qu'en

condition statique. Ces effets sont illustrés à la Figure 89c, où la concentration bactérienne est tracée à différentes positions du capillaire pour les deux confinements testés. Proche de la paroi (z/h < 0,05), nous observons globalement une diminution de la concentration, même si les valeurs sont un peu bruitées. À une distance z/h = 0,1, la concentration tend à augmenter avec le cisaillement, reflétant l'épaississement de la couche limite et une accumulation accrue dans la zone proche paroi. Au centre du canal, en z/h = 0,5, elle diminue à mesure que l'écoulement s'intensifie. Ces trois tendances sont observables pour les deux confinements testés ; bien que les écarts de concentration en fonction d'une position donnée semblent être un peu plus marqués pour le confinement le plus faible Pe_s = 0,8. Expérimentalement, cette zone de déplétion et l'influence du Pe_f sur cette dernière ont été mises en évidence expérimentalement pour la première fois par Rusconi *et al*. (2014), puis retrouvées dans de nombreux modèles théoriques dont celui d'Ezhilan et Saintillan (2015). Ce modèle sera discuté plus en détail par la suite afin de confronter simultanément les différents paramètres analysés dans cette partie.

- *Composante de vitesse V_z*

Pour comprendre l'origine des profils de concentration selon z, nous nous sommes intéressés à la composante de vitesse verticale moyenne ($< V_z >$) (Figure 90), qui renseigne directement sur la capacité de migration des bactéries au travers des lignes de courant. À partir d'un certain Pe_f (~ 19), la Figure 90 (a,b) met en évidence l'apparition de deux pics de vitesse d'amplitudes opposées et situés symétriquement autour du centre du capillaire : un pic de vitesse négative dans la moitié inférieure (z < 0,5) indiquant qu'en moyenne un flux de bactéries est dirigé vers la paroi inférieure et un pic positif dans la moitié supérieure (z > 0,5) du capillaire traduisant un flux de bactéries vers la paroi supérieure. Cela indique que, pour ces positions, les bactéries migrent pour s'éloigner du centre. Cette migration orientée vers l'extérieur conduit justement à la formation d'une zone de déplétion, la région comprise entre les deux pics, où la concentration bactérienne devient plus faible, comme observé dans les profils de concentration (Figure 89).

L'intensité de cette vitesse de migration augmente avec le Pe_f et l'on observe également une légère augmentation des vitesses maximales obtenues lorsque Pe_s diminue (d'un facteur 2 environ). De plus, il semblerait que la position de ces pics dépend de Pe_f, avec des différences en fonction du confinement. Dans le capillaire faiblement confiné (Pe_s = 0,8), la zone de déplétion tend à s'élargir lorsque Pe_f augmente alors que l'effet contraire est observé dans le capillaire plus confiné. Ces vitesses sont finalement tracées en fonction du nombre de Péclet local $Pe(z)$ afin de déterminer si cette zone de déplétion est gouvernée par les cisaillements locaux imposés (Figure 90 c,d). Les pics apparaissent pour des valeurs de Pe comprises entre 4 et 10, et ce de manière relativement similaire pour les différents Pe_f et Pe_s étudiés. Au-delà de cette plage, les vitesses $< V_z >$ observées décroissent rapidement vers une valeur proche de 0, aussi bien en direction des parois qu'au centre du capillaire.

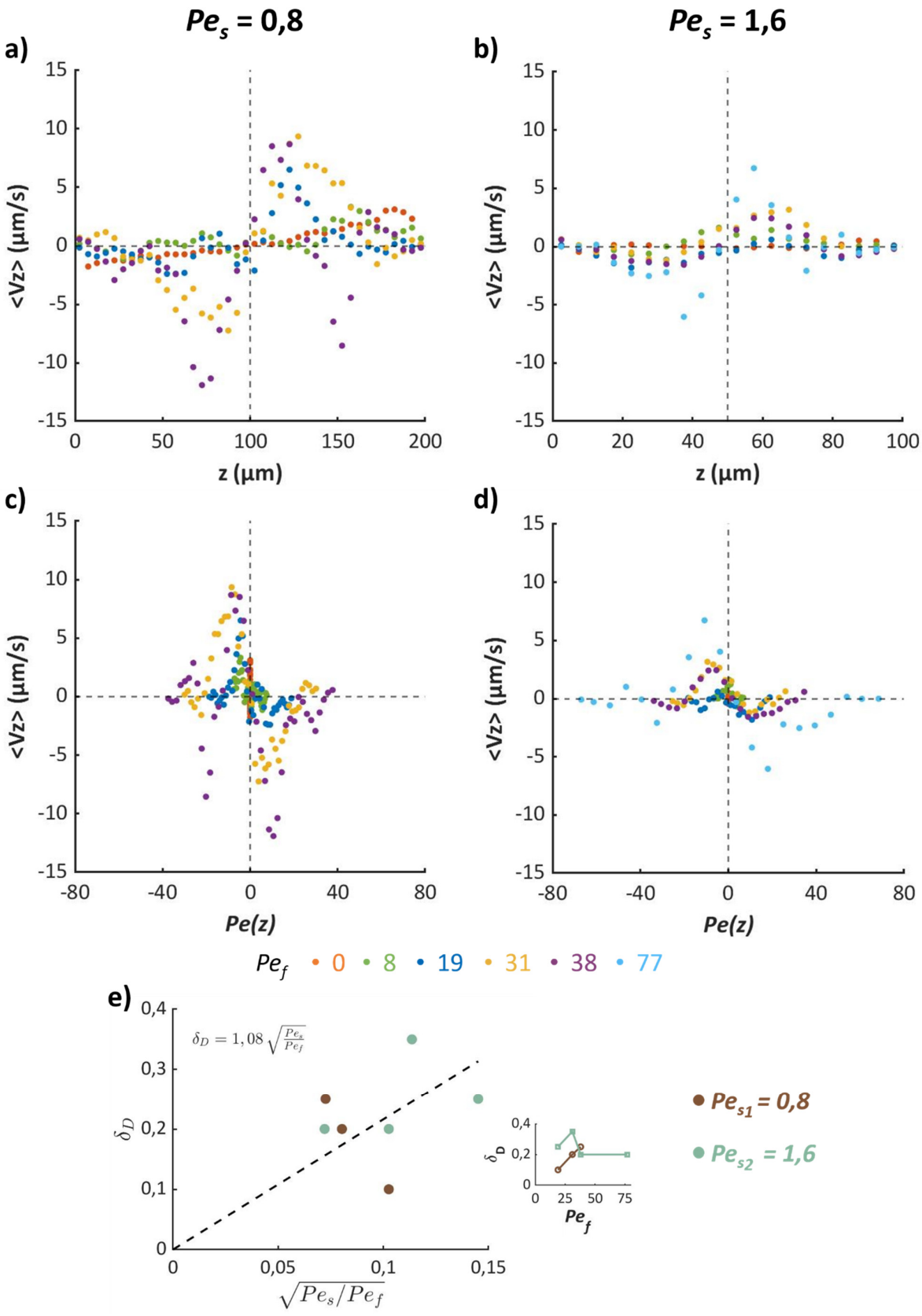


Figure 90. Évolution de $< V_Z >$ (µm/s) de la population motile en fonction du Pe_f selon la position z (a-b) ou le cisaillement (c-d). e) Épaisseur de la couche de déplétion δ_D (normalisée par h) en fonction de $\sqrt{Pe_s/Pe_f}$ ou de Pe_f.

Ces différentes observations, en lien avec les profils de concentration obtenus permettent d'identifier trois zones distinctes de transport bactérien au sein du capillaire, cohérentes avec les régions décrites dans les travaux théoriques de Ezhilan et Saintillan (2015). Ces zones sont illustrées Figure 91.

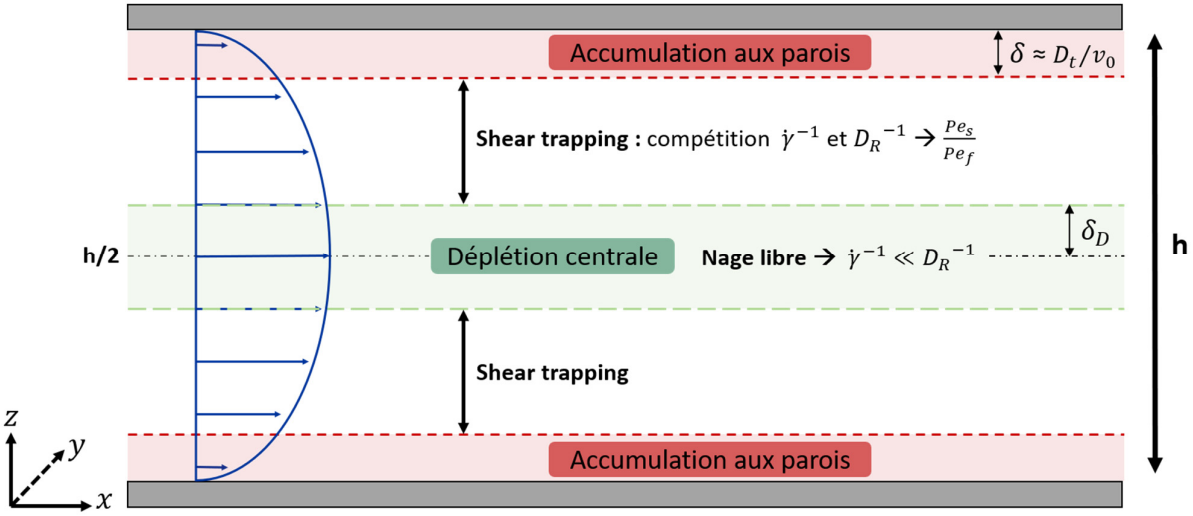


Figure 91. Schéma récapitulatif de la dynamique de distribution bactérienne attendue en présence d'un écoulement.

La première est la zone de déplétion centrale, située entre les 2 maxima de vitesse $\langle V_z \rangle$. Dans cette région, où le taux de cisaillement et donc les Péclets hydrodynamiques sont relativement faibles voir nuls : la diffusion rotationnelle domine l'orientation des bactéries ce qui conduit à une orientation aléatoire et donc une vitesse moyenne nulle. Ces dernières restent libres de modifier leur direction et de traverser les lignes de courant. En s'éloignant de cette zone centrale, elles entrent dans une région dite de *shear trapping*, localisée de part et d'autre de la zone de déplétion. Dans cette zone, le cisaillement augmente et oriente les bactéries de manière privilégiée dans la direction de l'écoulement. À mesure que l'on s'approche des parois, le taux de cisaillement devient prédominant : les bactéries ne parviennent plus à traverser les lignes de courant et restent confinées dans ces régions de fort cisaillement. Dans cette zone, la vitesse moyenne $\langle V_z \rangle$ est nulle : c'est le phénomène de high shear trapping. Ce piégeage local est absent en condition statique, ce qui explique les concentrations plus élevées observées sous écoulement qu'en condition statique (Figure 89 à z/h = 0,1 par exemple). Le *shear trapping* peut être défini par le rapport $Pe_s/Pe_f = v_0/h\dot{\gamma}$. Ce dernier compare le temps caractéristique d'alignement de la bactérie sous l'effet du cisaillement au temps nécessaire pour traverser le capillaire par nage (h/v_0). Lorsque ce rapport est petit : la bactérie s'aligne avec les lignes de courant plus rapidement qu'elle ne traverse le capillaire : il y a shear trapping. Lorsqu'il est élevé au contraire, la bactérie traverse le capillaire plus vite qu'elle ne s'aligne avec l'écoulement : le shear trapping est absent.

Enfin la troisième zone identifiée correspond à la couche limite proche de la paroi, région d'accumulation bactérienne. Dans cette zone, les bactéries interagissent fortement avec la paroi et évoluent au sein d'une couche d'épaisseur limite. Cette accumulation est bien documentée dans la littérature, aussi bien expérimentalement que théoriquement. Elle résulte d'interactions hydrodynamiques (Berke *et al*., 2008 ; Clément *et al*., 2016 ; Drescher *et al*., 2011) entre les bactéries et la surface (phénomène d'aspiration à la paroi) ou d'effets d'orientations nématiques, comme proposé par Ezhilan et Saintillan (2015), avec certains de leurs résultats repris pour comparaison en Figure 92. Cette comparaison est réalisée car, à notre connaissance, excepté l'étude de Rusconi *et al*. (2014), aucune autre n'a mis en évidence cette zone de déplétion au centre du canal. Les travaux théoriques d'Ezhilan et Saintillan (2015) permettent ainsi de confronter nos observations à leur modèle prédictif des mécanismes en jeu.

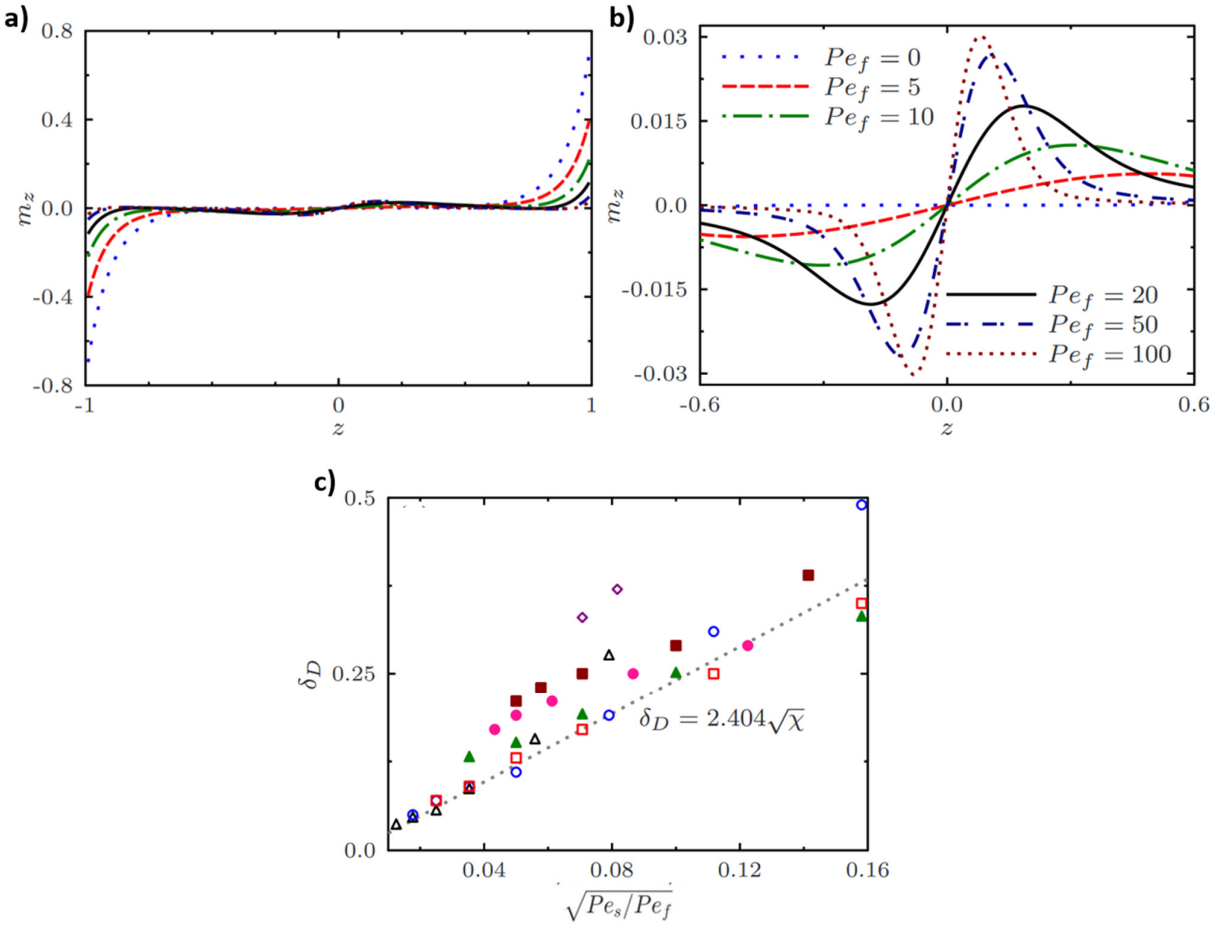


Figure 92. Résultats issus de la modélisation d'Ezhilan et Saintillan (2015). (a-b) Profil de polarisation moyenne selon z ($< m_z >$) pour différents Pe_f et Pe_s = 0,25, considéré dans l'ensemble du canal (a) ou uniquement dans la zone éloignée des parois (b). c) Épaisseur de la couche de déplétion δ_D (normalisée par h) en fonction de $\sqrt{Pe_s/Pe_f}$.

Leurs résultats sont présentés pour la composante de polarisation en z ($m_z = \frac{V_z}{V}$), plutôt qu'en termes de vitesse verticale (V_z) comme nous l'avons fait. Néanmoins, les deux approches apportent une information

équivalente sur la migration des bactéries vers les parois. Sur l'ensemble du capillaire (Figure 92a), leurs résultats théoriques prédisent une forte polarisation à proximité des parois : la paroi supérieure présente une composante positive et la paroi inférieure une composante négative. Cela indique que les bactéries orientées près de la paroi supérieure pointent préférentiellement vers le haut, et celles proches de la paroi inférieure vers le bas. L'accumulation aux parois prédite par leur modèle découle de cette forte polarisation. Dans leur modèle théorique, cette dernière est expliquée non pas par des interactions hydrodynamiques bactéries / paroi mais par un équilibre entre le flux de diffusion translationnel normal à la paroi : ($D_t \frac{\partial \Psi}{\partial z}$) et un flux convectif lié à la nage des bactéries ($v_0\ cos\theta\ \Psi$).

$$D_t \frac{\partial \Psi}{\partial z} = v_0\ cos\theta\ \Psi \qquad (1a)$$

Où Ψ est la concentration en bactérie et θ est l'angle que fait la bactérie avec la normale à la paroi.
Cette condition indique que si une bactérie s'oriente vers une paroi ($\cos\theta \neq 0$), la diffusion doit créer un gradient de densité Ψ qui équilibre la composante de nage orientée vers la paroi ; d'où les conditions aux limites suivantes :

$$\text{si } \cos\theta > 0\ alors\ \left.\frac{\partial \Psi}{\partial z}\right|_{z=h} > 0 \qquad (1b)$$

$$\text{si } \cos\theta < 0\ alors\ \left.\frac{\partial \Psi}{\partial z}\right|_{z=0} < 0 \qquad (1c)$$

Dans le premier cas (équation 1b), une bactérie orientée vers la paroi supérieure impose un gradient positif de Ψ à la paroi : la densité augmente en s'approchant de la paroi, d'où l'accumulation dans cette région. De manière symétrique, le même comportement est observé à proximité de la paroi inférieure. Ce mécanisme constitue l'explication de l'accumulation aux parois avec une polarisation non nulle.

Nos résultats expérimentaux confirment l'accumulation des bactéries à proximité des parois (Figure 89). En revanche, les vitesses $< V_z >$ mesurées ne révèlent aucune polarisation perpendiculaire aux parois dans cette région (Figure 90), avec en effet une composante moyenne proche de zéro. Cette valeur nulle peut résulter de deux comportements distincts à la paroi : soit les bactéries proches de la paroi ne présentent aucune composante de vitesse selon z et se déplacent de manière parallèle à la paroi sans jamais s'orienter verticalement vers elle. Soit un équilibre dynamique se met en place : le nombre de bactéries orientées vers la paroi est compensé par un nombre équivalent de bactéries qui s'en éloignent, ce qui générerait une valeur moyenne nulle. Dans les deux cas, le comportement attendu d'après le mécanisme nématique proposé par Ezhilan et Saintillan (2015) n'est pas observé expérimentalement. Cela signifie que l'accumulation aux parois que nous observons résulte d'autres mécanismes, tels que des interactions hydrodynamiques avec la paroi.
En revanche, au centre du canal (Figure 92b), leur modèle prédit un comportement similaire à celui que nous observons expérimentalement (Figure 90), avec l'apparition d'une zone de déplétion délimitée par deux pics de vitesse symétriques autour du centre du canal (z=0 dans leur représentation). Comme nos

résultats, l'intensité de ces pics augmente avec Pe_f, traduisant une migration plus marquée lorsque l'écoulement s'intensifie. Leur modèle prédit également un rapprochement progressif de ces pics vers le centre du canal lorsque Pe_f augmente, ce qui traduit une réduction de la zone de déplétion sous fort écoulement. Sur ce dernier point, nos résultats sont moins tranchés.

La zone de déplétion a été examinée de manière plus quantitative (Figure 90e pour nos données expérimentales et Figure 92c au cours de leur travaux) en mesurant la distance entre les deux pics qui délimitent cette zone. D'après leur modèle, la largeur de la zone de déplétion δ_D devrait évoluer linéairement avec $\sqrt{\frac{Pe_s}{Pe_f}}$ en raison de la compétition entre diffusion rotationnelle et alignement par cisaillement. Ce scaling est observé de manière plus ou moins satisfaisante dans leur étude, avec un domaine de validité pour des conditions de faible Pe_s (< 0.25) et de fort Pe_f (> 50). Dans notre cas, nos valeurs de Pe_s sont plus élevées et nos Pe_f plus faibles pour la majorité des mesures, ce qui peut expliquer que le scaling proposé par leur modèle ne s'ajuste pas à nos données (Figure 90e). Des mesures supplémentaires auraient été nécessaires pour tester plus précisément cette relation. Pour donner un ordre de grandeur, dans notre étude, cette zone de déplétion est d'épaisseur normalisée δ_D/h comprise entre 0,1 et 0,35 soit une épaisseur de déplétion d'environ 10 à 25 µm pour les 2 confinements testés.

Les orbites actives de Jeffery-Betherton

Finalement l'observation d'orbites de Jeffery actives au cours de notre étude nous a amenés à considérer l'effet du confinement sur leur dynamique. La Figure 93 présente l'ensemble des orbites obtenues pour les deux Pes_s étudiés et l'ensemble des Pe_f testés. Pour les deux confinements, nous observons une diminution de la taille des boucles lorsque l'intensité de l'écoulement augmente. Cette tendance est quantifiée Figure 94, où la taille des boucles est réduite d'un facteur 6,5 lorsque Pe_f est multiplié d'un facteur 10 environ. Cette diminution est identique pour les deux confinements testés, suggérant que le confinement n'influence pas directement l'amplitude des orbites. Nous observons également que la région du capillaire dans laquelle ces orbites apparaissent tend à se restreindre lorsque Pe_f augmente.

De plus, nous notons que cette région occupe une fraction de volume plus importante pour le confinement le plus élevé testé ($Pe_s = 1{,}6$). Cela pourrait suggérer que, pour des gradients de cisaillement équivalents, un confinement plus fort augmente la probabilité qu'une bactérie adopte des trajectoires les rapprochant des parois, ce qui pourrait accroître ses chances d'interagir avec elles et de s'y maintenir.

L'apparition de ces trajectoires bactériennes en looping fournit un élément d'interprétation pour essayer d'expliquer les valeurs moyennes $< V_z >$ nulles proche paroi que nous observons. Une bactérie réalisant une orbite effectue un aller-retour vertical, en alternant des phases où sa composante vitesse en z est positive et d'autre négative. Dans ces conditions, la moyenne temporelle sur sa trajectoire est nulle, ce qui pourrait expliquer l'absence de polarisation verticale nette observée expérimentalement près des parois.

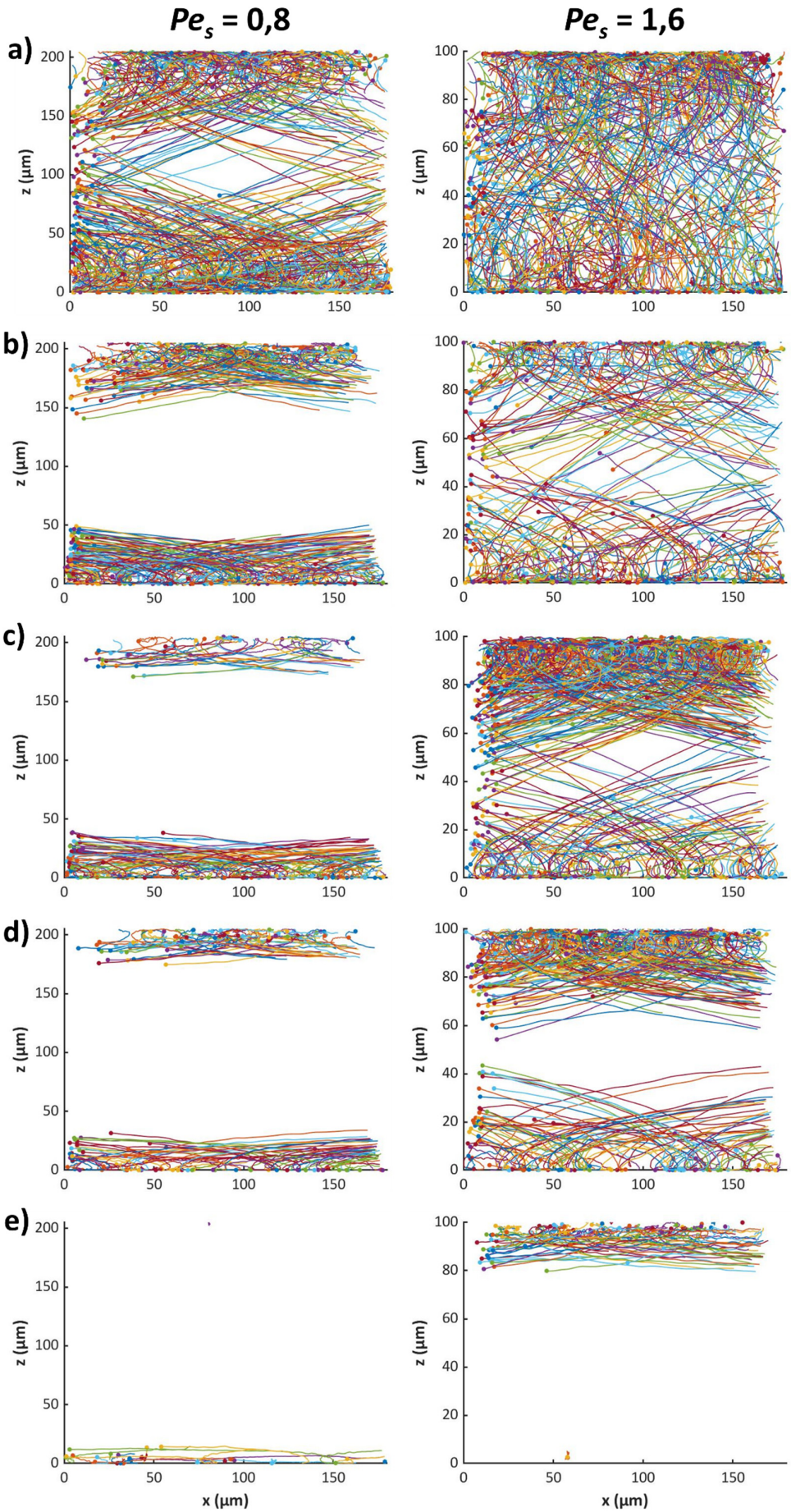


Figure 93. Orbites actives de Jeffery-Betherton pour Pe_f : a) 8, b) 19, c) 31, d) 38 et e) 77, et deux Pe_s

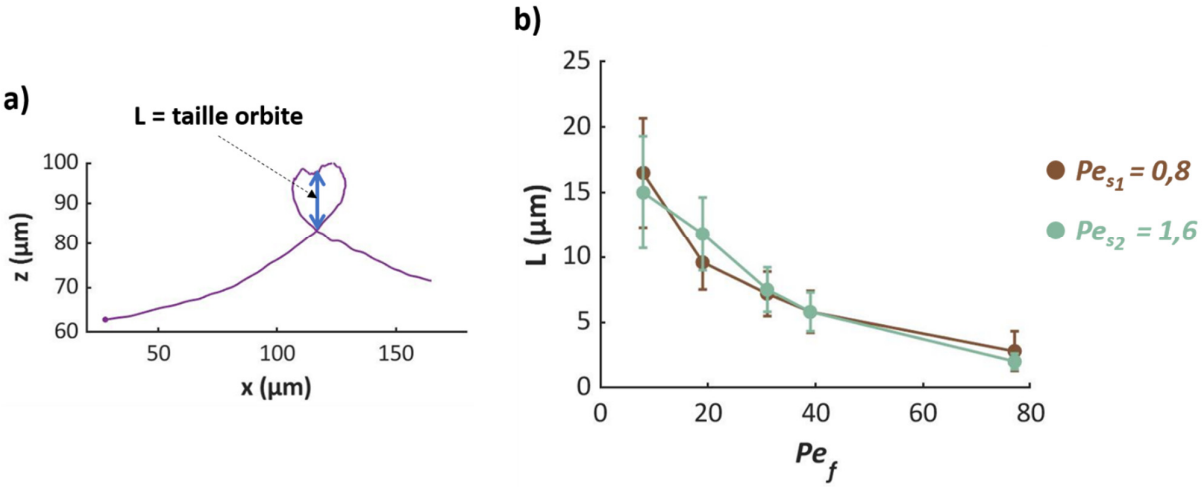


Figure 94. a) Définition de la taille des orbites. b) Taille moyenne des boucles des orbites de Jeffery-Betherton en fonction du Pe_f et pour les deux Pe_s testés. Les points représentent la moyenne de 30 mesures (15 par paroi) et les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

Conclusions

Au cours de ce chapitre, nous avons cherché à répondre aux objectifs suivants : d'une part, mettre en place une méthode de microscopie holographique en conditions d'écoulement pour suivre les bactéries en 3D au sein de notre système expérimental ; rappelons qu'un tel suivi représente un véritable défi technique et que peu de données expérimentales sont disponibles. D'autre part, caractériser la nage libre de *S. oneidensis* en l'absence d'écoulement et étudier sa dynamique de transport lorsqu'elle est soumise à un cisaillement. Les paragraphes suivants résument les principaux résultats obtenus :

- La microscopie holographique en conditions d'écoulement a été mise en place au laboratoire. Nous avons pu tester des cisaillements à la paroi de 20 s^{-1} (vitesse d'écoulement maximale ≈ 1 000 µm/s), qui sont des conditions comparables à celles de la seule autre étude réalisée sous flux en holographie (Molaei et Sheng, 2016) et avec des concentrations bactériennes similaires, supérieures à celles généralement rencontrées dans la littérature en condition statique.
- Cette méthode nous a permis de classer les bactéries selon leur type de transport (convection, diffusion, motilité), et d'accéder à leur dynamique individuelle en mesurant les vitesses des bactéries dans les trois composantes, leurs orientations dans le volume ainsi que leurs angles de réorientation. À l'échelle populationnelle, elle nous a donné accès à la distribution des bactéries dans le volume ainsi qu'à différents paramètres de transport, tels que le caractère balistique de la nage et le temps de persistance.
- La dynamique de nage libre de *S. oneidensis*, une bactérie monotriche peu étudiée pour ce critère, a été caractérisée au cours de ce travail. Elle présente une vitesse moyenne relativement élevée (≈35

µm/s) et effectue de longs runs rectilignes ou légèrement courbés, avec un temps de persistance d'environ 2 s.

- Par ailleurs, notre étude a montré que le confinement avait un impact sur cette nage libre, notamment en réduisant le temps de persistance de nage, en lien avec des probabilités plus fréquentes de rencontres et de réorientations induites par les parois. Le confinement contribue également à homogénéiser le profil de concentration des bactéries au sein du volume.

- Sous écoulement, l'analyse des trajectoires bactériennes a révélé une modification marquée de leur typologie : à mesure que le cisaillement augmente, les trajectoires deviennent progressivement plus rectilignes, avec une perte de tortuosité et une diminution des angles de réorientation, et deviennent plus unidirectionnelles dans le sens de l'écoulement, ce qui limite leur capacité à explorer leur volume de manière isotrope.
- Une analyse quantitative de différents comportements bactériens sous cisaillement, généralement difficilement accessibles, a pu être réalisée :
  - Un rhéotactisme latéral, lié à la chiralité des flagelles, dont l'amplitude augmente avec le cisaillement local.
  - Des trajectoires en forme de looping, correspondant aux orbites actives de Jeffery-Bertheton, dont la taille et la fréquence sont contrôlées par le cisaillement.
  - Une zone de déplétion en bactéries au centre du capillaire qui résulte directement de la capacité de la bactérie à traverser les lignes de courant et à se retrouver piégée dans les zones dites de *shear trapping*, où le cisaillement aligne les bactéries dans le sens du flux, ce qui contribue au léger épaississement de la couche limite de la paroi que nous avons mesuré. Ce phénomène de déplétion, prédit par certains modèles, notamment celui de Saintillan (Ezhilan et Saintillan 2015) n'avait jusqu'à présent été observé expérimentalement que par Rusconi *et al*. (2014).

CHAPITRE 5 :

INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE SUR L'EXPRESSION DES GÈNES DE *S. oneidensis* EN PHASE PLANCTONIQUE

Introduction

Dans les chapitres précédents, nous avons mis en place une approche plurifactorielle, combinant à la fois la physique du flux et son impact sur l'adhésion et le transport. Cette approche nous a permis d'étudier, à l'échelle individuelle, l'influence du stress hydrodynamique sur la capacité des bactéries à adhérer aux parois et sur leur dynamique de transport dans un volume. Pour parvenir à une compréhension plus complète des phénomènes considérés, il est essentiel d'intégrer également l'analyse de la réponse biologique à ce stress.

Dans le présent chapitre, nous nous sommes ainsi attachés à déterminer si la cellule perçoit le flux, si ses fonctions biologiques en sont affectées, et si elle est capable ou non de mettre en œuvre des réponses adaptées.

Dans ce contexte, notre étude poursuit l'objectif suivant :

(1) Évaluer l'influence du taux de cisaillement sur l'expression des gènes de *Shewanella oneidensis* souche sauvage, dont le génome est entièrement séquencé (Heidelberg *et al.*, 2002), **à l'aide d'une approche transcriptomique globale.** Un système fluidique a été mis en place, garantissant une exposition homogène de l'ensemble des cellules pendant la durée de traitement définie. Les cellules bactériennes ont été soumises à trois taux de cisaillement distincts (0, 125 et 1250 s^{-1}) et à trois durées d'exposition (20, 60 et 120 minutes), afin de capturer à la fois les réponses bactériennes précoces et les réponses plus tardives au cisaillement.

À notre connaissance, notre étude compte parmi les premières à explorer l'effet du stress hydrodynamique sur le transcriptome bactérien (moins d'une dizaine de publications disponibles au cours des dix dernières années) et constitue l'une des rares à adopter une approche aussi globale, examinant l'ensemble des variations d'expression génique.

Au cours de cette investigation, nous avons cherché à déterminer dans quelle mesure les conditions hydrodynamiques influencent l'expression des gènes bactériens, tant d'un point de vue quantitatif, en termes de gènes différentiellement exprimés, que biologique, en identifiant les principales fonctions impactées et en tentant de caractériser la réponse globale ainsi que les éventuelles stratégies d'adaptation mises en œuvre par la cellule bactérienne soumise au stress hydrodynamique.

Les résultats obtenus sont structurés en deux sections :

- La première est d'ordre méthodologique. Elle présente la mise en place et la caractérisation d'une méthode d'extraction d'ARN bactérien dans le laboratoire où aucune procédure standard n'était encore disponible. Cette dernière a nécessité une optimisation afin d'être adaptée à la souche étudiée et afin de répondre aux critères requis pour l'envoi des échantillons en séquençage.

- La seconde section constitue le cœur du chapitre et analyse l'influence du taux de cisaillement sur le transcriptome des bactéries planctoniques. Les résultats sont présentés sous la forme d'un article scientifique en préparation, avec une soumission envisagée au premier trimestre 2026 dans le journal BMC Genomics.

1 Implémentation et optimisation d'une méthode d'extraction d'ARN adaptée à *S. oneidensis*

Afin d'analyser l'expression des gènes de *Shewanella oneidensis* soumis à un stress hydrodynamique, une étude a été menée en amont dans le but de sélectionner une méthode d'extraction d'ARN total adaptée. Celle-ci visait à garantir l'obtention d'échantillons répondant aux critères d'intégrité (RIN), de pureté (rapports d'absorbance A_{260nm}/A_{280nm} et A_{260nm}/A_{230nm}) et de rendement, requis pour le séquençage transcriptomique réalisé par le prestataire Novogene. Pour rappel, ces paramètres sont détaillés au Chapitre 2 (paragraphe 7.2) et les seuils recommandés par Novogene sont les suivants : une quantité minimale de 300 ng d'ARN total, un RIN strictement supérieur à 6, ainsi que des rapports A_{260nm}/A_{280nm} et A_{260nm}/A_{230nm} supérieurs à 2. Les paragraphes suivants présentent les principaux résultats obtenus ainsi que les problématiques rencontrées au cours de cette phase préliminaire.

1.1 Choix de la méthode d'extraction

Suite à une étude bibliographique sur les méthodes d'extraction d'ARN couramment utilisées chez *Shewanella oneidensis* et autres bactéries à Gram négatif, notre choix initial s'est porté sur le kit « Quick-RNA™ Miniprep » de Zymo Research, dont le protocole est détaillé au Chapitre 2 (paragraphe 7.1.1). Les résultats obtenus avec ce kit (n=6), présentés Figure 95 (condition P1) indiquent une extraction d'ARN de faible qualité. En effet, malgré des quantités supérieures à 300 ng (NanoDrop), les RIN sont systématiquement inférieurs à 3 et les profils de migration obtenus (exemple Figure 95a, 1er profil) ne présentent pas de bandes ribosomiques distinctes, mais plutôt une bande diffuse dans la partie basse du gel, caractéristique de produits dégradés.

Ces résultats, obtenus de manière reproductible, soulèvent des interrogations quant à la quantité d'ARN de bonne qualité effectivement extraite. Différentes hypothèses peuvent être envisagées : 1) une dégradation de l'ARN au cours de l'extraction (temps de traitement trop long, trop agressif, contamination par des RNases, etc) ou 2) une lyse cellulaire incomplète conduisant à une extraction partielle de l'ARN total : certaines bactéries étant connues pour posséder une paroi relativement résistante aux conditions de lyse standard (détergents). Bien que cela n'ait pas été formellement démontré pour *S. oneidensis*, de nombreuses études travaillant avec cette espèce ont recours à des méthodes d'extraction plus agressives (TRIzol, acide phénolique), ou modifient les protocoles commerciaux en y intégrant des traitements

enzymatiques ou mécaniques. Ces choix méthodologiques peuvent suggérer une possible résistance de la bactérie à la lyse cellulaire, ce qui nous a conduits à modifier, voir remplacer totalement, le protocole du kit. Les alternatives suivantes ont été testées :

- L'ajout d'une lyse enzymatique, à l'aide de la protéinase K (condition P2) ou du lysozyme, seul (condition P3) ou combiné à un traitement mécanique (condition P4), en amont de la lyse chimique proposée par le kit d'extraction. L'objectif étant de faciliter la rupture de la paroi cellulaire bactérienne afin d'améliorer l'efficacité de la lyse et, par conséquent, le rendement d'extraction.
- Enfin, à la suite d'échanges avec des professionnels de la plateforme EpiRNA-Seq (Epitranscriptomique et Séquençage, Université de Lorraine), la méthode du *hot acid phenol*, (protocole Chapitre 2 paragraphe 7.1.2), a été considérée (condition P5).

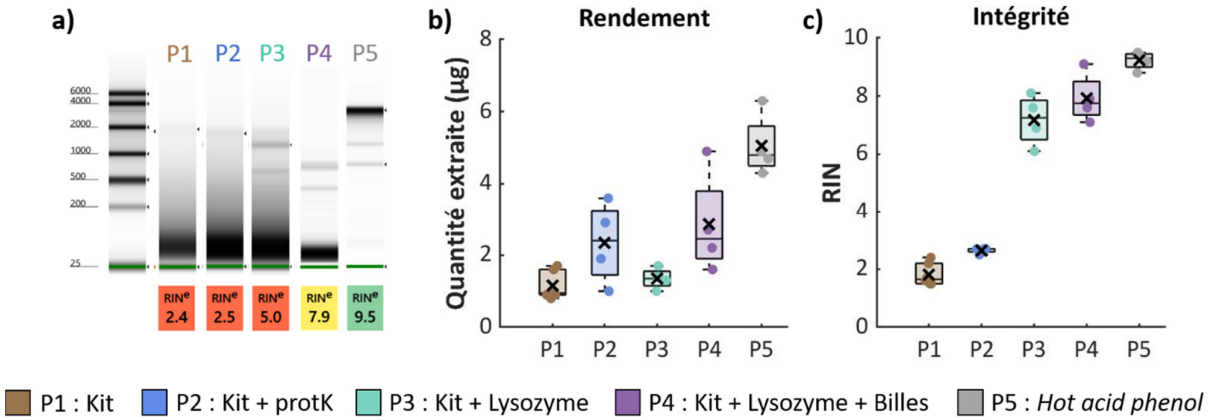


Figure 95. Comparaison (a) des profils de migration (Tapestation), (b) du rendement (µg) et (c) de l'intégrité (RIN) des ARN extraits à partir de culots bactériens frais (1 mL de suspension bactérienne en phase stationnaire d'une culture O/N, DO ≈ 0,54) en fonction des différents protocoles testés. Les résultats proviennent de 4 réplicats indépendants par condition, sauf pour P1 (n=6).

L'implémentation de ces différents protocoles a permis d'améliorer à la fois les rendements d'extraction d'ARN (Figure 95b) et la qualité des ARN obtenus. Les profils de migration (Figure 95a) montrent des bandes ribosomiques de plus en plus distinctes à mesure que l'on progresse dans les protocoles testés, ce qui s'accompagne d'une augmentation des indices d'intégrité (RIN) (Figure 95c) : acceptables à partir des conditions P3 à P5. Les résultats obtenus avec les traitements complémentaires au kit (conditions P2 à P4) tendent à confirmer une relative résistance de *S. oneidensis* aux méthodes de lyse classiques. Parmi les enzymes testées, l'ajout de lysozyme seul (P3) ou en combinaison avec un traitement mécanique (P4), améliore les performances d'extraction du kit, contrairement à la protéinase K (P2), dont l'effet reste limité. Le lysozyme cible spécifiquement le peptidoglycane, composant majeur de la paroi bactérienne, à la différence de la protéinase K dont l'action est non spécifique et dirigée contre l'ensemble des protéines. On peut donc supposer que le lysozyme a permis de désorganiser plus efficacement la paroi de *S. oneidensis*, facilitant ainsi l'accès aux acides nucléiques.

Néanmoins, le protocole P5 (extraction *hot acid phenol*), s'est révélé le plus performant, tant en termes de rendement (facteur 4,4 par rapport à P1) que de qualité (facteur 5 par rapport à P1), avec des RIN systématiquement supérieurs à 8,5 et des profils de migration présentant peu, voire pas de produits de dégradation. Cette performance peut s'expliquer par une lyse plus rapide et complète, associée à une inactivation immédiate des RNases (action combinée d'un solvant dénaturant et du traitement thermique). Cette double action permet une libération optimale des ARN tout en limitant leur dégradation au cours de l'extraction. Bien que ce protocole soit plus contraignant, en raison de sa durée d'exécution et de la manipulation de réactifs plus dangereux, il répond à nos critères de rendement et de qualité, d'où son adoption pour l'ensemble des extractions ultérieures. Le seul point limitant reste l'apparition systématique, observable sur le profil 5 (Figure 95a) d'une bande de très haut poids moléculaire, dont l'élimination, qui fait l'objet du paragraphe suivant, est nécessaire pour envisager un envoi en séquençage.

1.2 Présence persistante d'un ADN contaminant

Nous émettons l'hypothèse que ce fragment de haut poids moléculaire correspond à de l'ADN génomique, non éliminé au cours de l'extraction. En condition acide, l'ADN est censé précipiter lors de la séparation de phase avec l'acide phénolique (pH = 4,3), ce qui entraîne son transfert vers l'interface ou la phase organique, alors que l'ARN reste dans la phase aqueuse. L'hypothèse d'une recontamination opérateur lors de l'extraction a été écartée : en effet, l'analyse de 10 µL prélevés dans la partie supérieure de la phase aqueuse à chaque étape confirme la persistance de ce fragment, ce qui exclut un transfert accidentel depuis l'interface (Figure 96a). L'acide phénolique a été remplacé ; l'hypothèse étant qu'il était dégradé ou de pH altéré, ce qui empêchait la précipitation correcte de l'ADN. La durée et force de centrifugation ont été prolongées, en supposant que les conditions initiales étaient insuffisantes pour le transfert efficace de l'ADN vers l'interface. L'étape de séparation phénolique a également été répétée, présumant que la quantité d'ADN était telle qu'elle saturait la phase de séparation et ne pouvait être complètement précipitée. Néanmoins à chaque fois, la bande de haut poids moléculaire persiste, ce qui nous a amené à nous interroger sur la nature réelle de ce fragment. Un traitement à la RNase a permis d'écarter la présence d'un ARN de haut poids moléculaire ou agrégé, tout en confirmant que le matériel considéré comme ARN ribosomique en était bien (Figure 96b). Enfin, un traitement à la DNase a permis l'élimination totale de ce fragment, confirmant sans ambiguïté qu'il s'agit bien d'ADN génomique (Figure 96c).

L'observation de ce fragment parfois en une, deux (Figure 96 a,b) ou trois bandes nettes (Figures 96c) peut suggérer qu'il appartient à l'ADN plasmidique de *S. oneidensis* (possède un plasmide circulaire de 161 613 bp), pour lequel nous pourrions émettre l'hypothèse que sa configuration plus compacte (notamment sous sa forme superenroulée) réduit son accessibilité aux solvants, ce qui complique sa précipitation. Des digestions enzymatiques ciblées ont été réalisées, mais les résultats, non concluants, n'ont pas été approfondis et ne seront pas abordés ici.

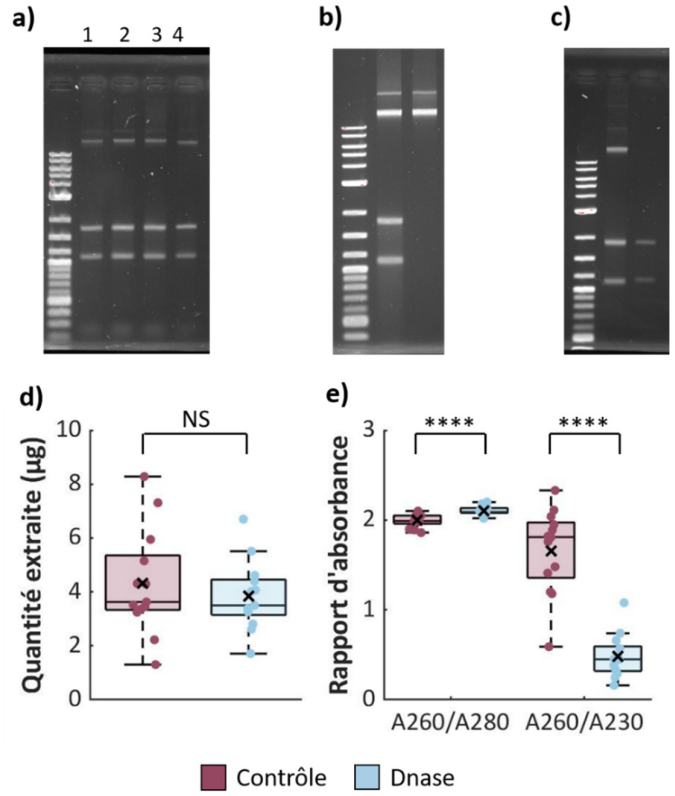


Figure 96. Analyse des extraits d'ARN obtenus. a) Gel d'électrophorèse de 10 µL prélevés à chaque étape de l'extraction *hot acid phenol* : 1) après la première étape 2) après la séparation de la deuxième phase, 3) après la troisième étape et 4) extrait final). (b-c) Résultat du traitement à la Rnase (b) ou à la Dnase (c) sur un extrait ARN obtenu. (d-e) Comparaison du rendement (µg) et de la pureté des ARN extraits avant et après traitement à la Dnase. Les ARN ont été extraits à partir de culots bactériens frais (1 mL de suspension bactérienne de la culture O/N en phase stationnaire de croissance, DO ≈ 0,54). Les résultats correspondent à 12 réplicats indépendants avant et après traitement. (NS = non significatif, **** = p value < 0,0001 ; test de Mann-Whitney).

Une attention particulière a été portée au traitement DNase afin de s'assurer qu'il ne provoque ni dégradation ni perte conséquente des ARN extraits. Les critères de quantité et de pureté des ARN (rapports d'absorbance) ont été mesurés avant et après le traitement sur 12 échantillons (Figure 96 d,e). Aucune différence significative (p = 0,579) n'a été observée dans la quantité totale d'ARN extraite, confirmant que le traitement appliqué ne dégrade pas les ARN, et soulignant au passage la faible proportion d'ADN contaminant présente initialement. Une amélioration notable du rapport d'absorbance A_{260nm}/A_{280nm} après traitement est notée, ce qui reflète directement le retrait de l'ADN contaminant et permet d'atteindre le seuil de 2 requis pour le séquençage.

En revanche, une diminution importante et significative (facteur 3,5 en moyenne) du ratio A_{260nm}/A_{230nm} est observée après traitement DNase. Cette baisse s'explique par la présence de l'enzyme DNase, bien que thermiquement inactive, au sein de nos échantillons. Diverses stratégies de purification ont été testées pour retirer la protéine et améliorer la pureté des extraits, néanmoins le compromis gain pureté et perte de rendement était défavorable. Nous avons donc conservé le protocole tel quel, c'est-à-dire extraction *hot acid phenol* suivie d'un traitement DNase sans retrait de l'enzyme.

Ce choix est rendu possible du fait que nos extraits sont destinés à une ribodéplétion (réalisée par le prestataire de séquençage), incluant automatiquement des étapes de purification supplémentaires. Un test préliminaire de séquençage, comparant des échantillons traités, avec ou sans retrait de l'enzyme, a d'ailleurs permis de valider cette approche.

1.3 Validation de la méthode de conservation du culot bactérien

L'ARN étant particulièrement sensible, il est préférable de commencer l'extraction immédiatement après l'échantillonnage. Dans notre étude, cette approche n'était pas réalisable sur le plan technique : nous devions prélever trois échantillons à quatre moments distincts sur une période de deux heures, alors qu'il faut au minimum trois heures pour extraire huit à douze échantillons. S'inspirant de la littérature, la décision a été prise de congeler instantanément les culots bactériens. Directement après l'échantillonnage et une étape de centrifugation, les culots ont été immergés dans de l'éthanol absolu congelé à -80°C, puis conservés à cette température pendant au maximum un jour avant extraction. L'objectif était de stopper l'activité biologique, d'inhiber les RNases et de préserver l'intégrité de l'ARN. Cette étape de congélation a été validée par la mise en évidence de son absence d'impact sur la qualité et quantité des extraits d'ARN, par comparaison directe de six échantillons extraits directement après prélèvement (échantillons frais) ou après 24h de congélation. Les résultats sont présentés à la Figure 97, la méthode d'extraction est identique à celle validée précédemment.

Aucune différence significative n'a été observée entre les ARN obtenus après extraction directe ou après 24h de congélation (Figure 97) : la quantité d'ARN ($p = 0,699$), l'intégrité (RIN, $p = 0,699$) ainsi que les ratios de pureté A_{260nm}/A_{280nm} ($p = 0,623$) et A_{260nm}/A_{230nm} ($p = 0,794$) restent équivalents. Cette absence d'effet valide cette stratégie de congélation pré-extraction.

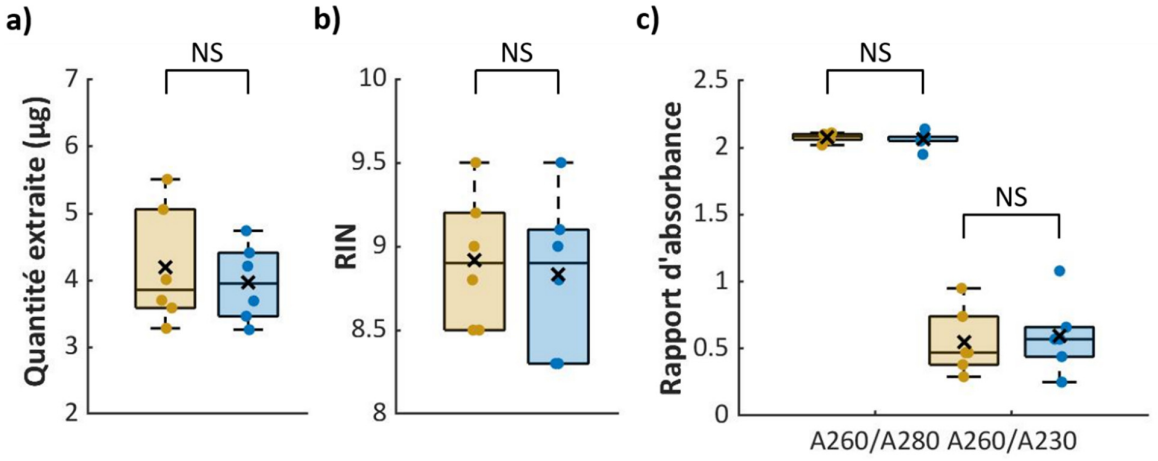


Figure 97. Évaluation (a) du rendement (µg), (b) de l'intégrité (RIN) et (c) de la pureté (rapports A_{260nm}/A_{280nm} et A_{260nm}/A_{230nm}) des ARN extraits à partir de culots bactériens, avec ou sans congélation préalable à -80°C pendant 24h (1 mL/échantillon de la culture O/N de la suspension bactérienne en phase stationnaire de croissance, DO ≈ 0,54). Les résultats sont issus de 6 réplicats biologiques indépendants par condition. (NS = non significatif ; test de Mann-Whitney).

2 Influence du taux de cisaillement sur l'expression des gènes de *Shewanella oneidensis*

Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article scientifique en préparation, avec une soumission envisagée à BMC Genomics. Toutes les références citées figurent dans le chapitre « Références bibliographiques ».

Time-dependent transcriptomic response of *Shewanella oneidensis* to hydrodynamic forces

Lucie Klopffer[a,b], Frédérique Changey[a], Christophe Merlin[a], Nicolas Louvet[b], Laurence Mathieu[c*]

[a] Université de Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000 Nancy, France ; [b] Université de Lorraine, CNRS, LEMTA, F-54000 Nancy, France ; [c] EPHE, PSL, UMR CNRS 7564, LCPME, F-54000 Nancy, France

*Corresponding author : **Laurence Mathieu** ; LCPME, 9 Avenue de la Forêt de Haye, BP 20199, F-54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France ; laurence.mathieu@univ-lorraine.fr

Abstract

Fluid flow is a ubiquitous feature of many bacterial habitats, strongly influencing bacterial transport, surface colonization and biofilm formation. Despite extensive characterization of hydrodynamics effects on these processes, the cellular response of planktonic, free-living bacteria to shear stress remains poorly understood. In this context, we performed a comprehensive transcriptomic analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 exposed to three shear rates in parallel: static (0 s^{-1}), intermediate (125 s^{-1}) and high (1250 s^{-1}). Gene expression was monitored for all the shear at three time points (20, 60 and 120 minutes) to capture both short- and long-term responses. Our results reveal that shear stress triggers a coordinated adaptive response, with transcriptional remodeling strongly dependent on both shear intensity and time. The highest shear rate elicited the most pronounced response, with 184 genes differentially expressed after 120 minutes. These transcriptional changes were characterized by (1) metabolic reprogramming towards energy production, including upregulation of oxidative phosphorylation pathways and multiple catabolic processes, such as the TCA cycle, amino or fatty acid degradation, (2) a global slowdown of transcriptional and translational activities, reflected by downregulation of key transcriptional factors (such as σ^{70}), alongside upregulation of ribosome hibernation-promoting factors, and (3) an early upregulation of flagellar assembly genes. Together, these changes indicate that shear stress triggers an energy reallocation strategy that prioritizes survival and motility over growth, enabling the bacteria to escape or seek surfaces to cope with hydrodynamic constraints. This study provides one of the first genome-wide insights into bacterial response to shear flow and demonstrates that hydrodynamic shear acts as a global environmental cue with profound impacts on microbial physiology and behavior in dynamic fluid environments. These findings emphasize the importance of considering fluid flow when investigating bacterial behavior.

Keywords: hydrodynamic shear stress, mechanical stress response, planktonic bacteria, global transcriptomics, *Shewanella oneidensis*

Introduction

Fluid flow is a ubiquitous feature of bacterial habitats, ranging from soils and aquifers to rivers and host-associated environments (Conrad and Poling-Skutvik, 2018; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Rusconi and Stocker, 2015; Wheeler *et al.*, 2019). It shapes the local chemical environment through convective and diffusive transport of nutrients, signaling molecules, and toxins, while simultaneously exerting mechanical forces that directly influence bacterial behavior. Consequently, flow has been extensively studied for its effects on bacteria, notably with regard to bacterial colonization and biofilm formation.

Flow strength is indeed a key factor governing bacterial transfer to surfaces. Convective transport enhances the probability of cell-surface encounters (Alves *et al.*, 2020; Bakker *et al.*, 2002; Busscher and Van Der Mei, 2006; Krsmanovic *et al.*, 2021), while the mechanical forces associated with flow modulate bacterial motility both in bulk fluid and near-surface regions (Berke *et al.*, 2008; Clément *et al.*, 2016; Junot *et al.*, 2019; Kaya and Koser, 2012; Lauga, 2016; Mathijssen *et al.*, 2019; Molaei *et al.*, 2014; Rusconi *et al.*, 2014). Once bacteria reach a surface, adhesion itself is also affected by flow. Shear can alter the residence time of bacteria at the wall (Klopffer *et al.*, 2024; Lecuyer *et al.*, 2011) and modulate the forces between cells and surfaces, either reinforcing adhesion through catch-bond-like mechanisms (Dufrêne and Persat, 2020; Procopio Evagrio George *et al.*, 2006; Thomas *et al.*, 2002) or promoting detachment when shear stress becomes excessive (Bakker *et al.*, 2002; Boks *et al.*, 2008b; Busscher and Van Der Mei, 2006; Chang *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2011). Flow further influences the spatial organization of bacteria at the surface (Korber *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2011b; Saur *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2021; Young, 2006), which in turn significantly shapes the subsequent architecture of developing biofilms (Persat *et al.*, 2014; Rossy *et al.*, 2019; Santore, 2022; Secchi *et al.*, 2020). At later stages, hydrodynamics continues to affect mature biofilms by regulating nutrient and oxygen supply (Pereira *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 1999; Thomen *et al.*, 2017), biofilm thickness, compactness, 3D-structure (Mathieu *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022), erosion (Chambless and Stewart, 2007; Wang *et al.*, 2022) and the amount and composition of the extracellular polymeric substance (EPS) matrix (Hou *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2012; Lemos *et al.*, 2015).

However, while global effects of flow are well characterized on the biofilm structure, how individual bacterial cells perceive and respond to shear stress remains poorly understood. Recent studies suggest that fluid flow can act as a mechanical cue, with bacteria sensing shear stress and adjusting gene expression and signaling accordingly. For instance, in enterohemorrhagic *Escherichia coli*, expression of the locus of enterocyte effacement (LEE) virulence factors is upregulated under increasing shear and host-associated conditions, promoting adhesion (Alsharif *et al.*, 2015). Similarly, for *Pseudomonas aeruginosa*, high shear and surface attachment increase cyclic-di-guanosine monophosphate (c-di-GMP) levels (Rodesney *et al.*,

2017), and the recently identified *fro* operon is also induced in response to flow and surface contact (Sanfilippo *et al*., 2019), both contributing to enhanced bacterial adhesion and the transition from planktonic to sessile lifestyle. These findings demonstrate that attached bacteria are mechanosensitive to fluid flow. Nevertheless, these studies provide only a partial understanding of cellular responses to shear stress, as they focused on a limited subset of genes and functions.

Comprehensive transcriptomic approaches are required to capture the global cellular response to flow. Recently, Ramachandran *et al*. (2024) performed a genome wide-transcriptomic analysis showing that free-swimming *Pseudomonas aeruginosa* cells transcriptionally respond to shear flow. Their work provided important insights into how mechanical forces shape bacterial physiology. However, their analysis primarily addressed specific environmental factors, such as quorum sensing and oxygen gradients generated under flow.

In this context, our research aimed to provide a broader overview of the effect of wall shear rate on the global transcriptomic response of planktonic, free-living bacteria under continuous shear stress. To achieve this, bacteria were exposed to three shear rates (0, 125 and 1250 s^{-1}) for 20, 60, and 120 minutes, allowing us to capture both short and long-term transcriptomic responses. We used *Shewanella oneidensis* (Lemaire *et al.*, 2020; Paulick *et al*., 2009; Venkateswaran *et al*., 1999), a hydro telluric Gram-negative Proteobacterium that is a facultative anaerobe, motile via a polar flagellum, and capable of versatile respiratory pathways, as a model organism. Its fully sequenced genome (Heidelberg *et al.*, 2002) makes it an ideal candidate to investigate how shear stress impacts biological functions and cellular adaptation mechanisms. This study clearly demonstrates that hydrodynamic stress triggers a specific bacterial response, which appears to be multifunctional and indicative of a survival adaptation strategy. It involves a general slowdown of cellular activities, accompanied by increased energy production to support adaptation, primarily through motility, and survival.

Materials and Methods

Shewanella oneidensis strain and inoculum preparation

Experiments were performed using *Shewanella oneidensis* MR-1 as a model strain (Teal *et al*., 2006). Prior to assay, *S. oneidensis* from a glycerol stock at -80°C was recovered onto Lysogeny Broth Lennox (LB, Sigma-Aldrich L3022) agar plates. After 2 days incubation at 30°C, several isolated colonies of *S. oneidensis* were used to inoculate a 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of sterile 10-fold diluted LB medium ($LB_{1/10}$). After this overnight preculture (30°C, 160 rpm), the bacterial suspension (OD ≈ 0.6) on stationary growth phase was centrifuged (3000 × g for 5 min) and resuspended in fresh $LB_{1/10}$ medium to reach a final concentration close to $1.9 \pm 0.8 \times 10^9$ cells/mL as measured by flow cytometry (Klopffer *et al.*, 2024). This inoculum, referred to as T0 min, was used for the assays.

Experimental system and hydrodynamic treatment

The experimental setup consisted of six parallel Teflon tubing circuits, each 155 cm in length representing a working volume of 4 mL. Each of them was connected in a closed-loop configuration to a sterile hemolysis tube containing 4 mL of bacterial suspension. Two peristaltic pumps were used, each supplying three independent circuits operating at a defined flow rate (Fig. 1). This configuration enabled the simultaneous application of two distinct hydrodynamic conditions (one per pump), with continuous recirculation of the entire volume over time ensuring uniform exposure of all cells to the imposed hydrodynamic conditions. Hydrodynamic conditions were imposed at controlled flow rates (Q) of 2.9 and 29 mL/min. In parallel, three additional sterile hemolysis tubes, not connected to any tubing circuits, served as static controls (Q = 0 mL/min). The wall shear rate $\dot{\gamma}_w$ generated by the applied flow rate was estimated using the laminar flow approximation for cylindrical tubing (Bruus, 2007):

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4Q}{\pi R^3} \quad (1)$$

Where Q represents the flow rate and R is the inner radius of the tubing (R = 0.8 mm). This yielded wall shear rates of 0, 125 and 1250 s^{-1}, with corresponding wall shear stresses of 0, 0.125 and 1.25 Pa. These values are within the range of typical wall shear stresses experienced by bacteria in many natural or lab-scale flow environments (Chang *et al*., 2020; Chen *et al.*, 2019; Fernandes *et al*., 2021; Mathieu *et al*., 2014; Saur *et al*., 2017). Prior to each experiment, all tubing components were thoroughly cleaned using the following protocol: SDS (0.1% for 30 min at 1 mL/min), ultrapure water (30 min at 1 mL/min), HCl (0.1 M for 30 min at 1 mL/min), followed by a final rinse with ultrapure water (30 min at 1 mL/min). A new set of tubing and hemolysis tubes was used for each biological replicate.

The bacterial inoculum prepared as described above was divided into twelve 4 mL aliquots in sterile hemolysis tubes (Fig. 1). For each shear stress condition, the tubing of the three circuits connected to the dedicated peristaltic pump was inserted directly into the suspension tubes (one per circuit) and the pumps were turned on to apply the desired flow rate. Control samples (0 s^{-1}) were maintained under static condition. All operations were performed under a laminar flow hood. Samples corresponding to each hemolysis tube were collected for each shear condition (0, 125 and 1250 s^{-1}) at four time: 0 (immediately after splitting), 20, 60 and 120 minutes. Flow cytometry monitoring confirmed the absence of bacterial proliferation within the system throughout the 2-hour experiment (Table S1), ensuring that observed transcriptomic changes were due mainly to shear stress and not bacterial growth. At each time point, 1.5 mL of culture was withdrawn, centrifuged (3000 × g, 4min, 4°C), rinsed with RNase-free water, and centrifuged again. The resulting bacterial pellets were immediately flash frozen using pre-chilled absolute ethanol at -80°C and stored at the same temperature for a maximum of 24 hours prior to RNA extraction. A preliminary study (Fig. S1) confirmed that this preservation protocol had no measurable impact on RNA yield, purity or integrity (as assessed by the RNA Integrity Number (RIN)). Three independent biological replicates were performed.

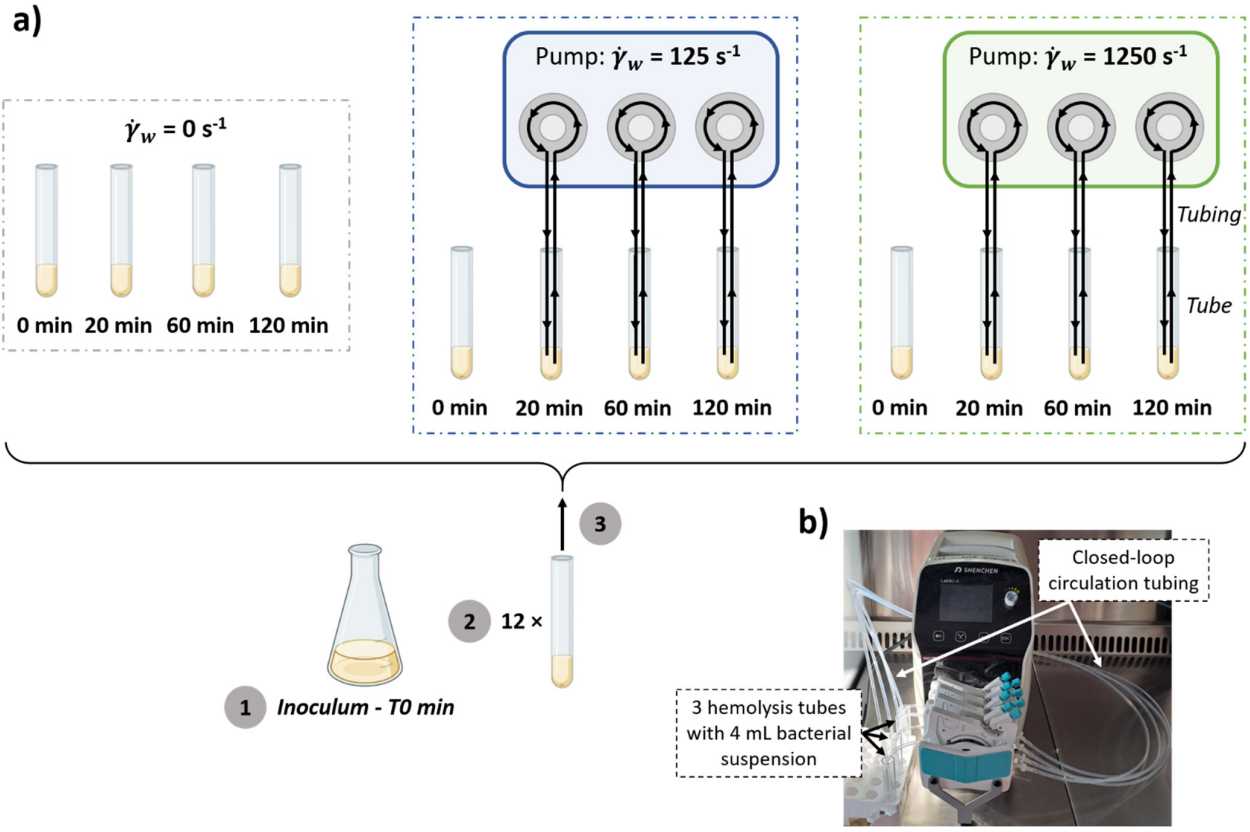


Fig. 1. a) Schematic diagram of the experimental setup. Following inoculum preparation (step 1), the bacterial suspension was divided into twelve 4-mL hemolysis tubes (step 2), with four tubes assigned to each shear rate (0, 125, and 1250 s^{-1}) (step 3). For each shear rate, one tube was used per incubation time (0, 20, 60 and 120 min). The 0-minute sample was collected immediately after step 2. The shear rate was controlled by flow rate using a peristaltic pump. B) Photograph of the peristaltic pump with three independent circuits for a single shear rate.

RNA Isolation

Total RNA was extracted from the cells using the hot phenol acid method. Briefly, frozen bacterial pellets were resuspended in 400 µL of AE buffer (50 mM sodium acetate, pH 5.2; 10 mM EDTA, pH 8.0) and 40 µL of 10 % SDS. After vortexing, 440 µL acidic phenol (pH 4.3 ± 0.2; Sigma-Aldrich) was added, followed by vigorous mixing and incubation at 65°C for 4 min. Samples were rapidly cooled on dry ice for 3 min, then centrifuged at 14,000 × *g* for 10 min. The recovered aqueous phase was mixed with an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, pH 8.0), then vortexed and centrifuged (14,000 × g, 10 min, 22°C). The resulting aqueous phase was collected and extracted with an equal volume of chloroform, vortexed, and centrifuged again under the same conditions. RNA in the recovered aqueous phase was precipitated by adding 40 µL of 3 M sodium acetate, 1 mL of 95 % ethanol and 1 µL of GlycoBlue™ (Invitrogen), followed by incubation at -80°C for 30 min. After centrifugation (14,000 × g, 30 min, 4°C), the RNA pellet was washed with 500 µL of 80 % ethanol, dried (5 min, 37°C), and resuspended in 40 µL of nuclease-free water.

Residual genomic DNA was removed by RNase-free DNase I treatment (New England Biolabs) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was measured using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), and RNA quality was assessed with an Agilent TapeStation 4150 (Agilent Technologies). All RNA extracts had concentrations exceeding 500 ng and RIN values above 8.5 (Fig. S2).

RNA Sequencing

RNA samples were sent to Novogene Europe (Novogene GmbH) for sequencing. Prior to sequencing, Novogene conducted quality control on the samples and prepared directional prokaryotic mRNA librairies with ribosomal RNA removal. Sequencing was performed on an Illumina NovaSeq X Plus platform, generating paired-end reads of 150 bp (PE150). Novogene also provided quality control on the raw sequencing data to ensure data integrity before subsequent bioinformatic analyses.

Bioinformatics analysis

Data analysis was performed using Galaxy Europe (https://usegalaxy.eu). Quality control (QC) of the raw sequencing data was first carried out using the FastQC tool (0.74 version). Single-end reads were then trimmed to remove linkers and adapters using the Trimmomatic tool (Galaxy Version 0.39 + galaxy2). The resulting trimmed FASTQ files were subsequently mapped to the *Shewanella oneidensis* reference genome (GCA_003241225) using the HiSat2 alignment tool (Galaxy Version 2.2.1 + galaxy1) with default parameters. The obtained SAM (Sequence Alignment/Map) files were then used for read quantification with htseq-count (Galaxy Version 2.0.5+ galaxy0), using the reference genome annotation file (GFF3, Ensembl) for gene counting. The final matrix containing the 1,971 expressed genes was used as input for all downstream statistical analyses in R, with Principal Component Analysis (PCA) as the initial exploratory step. Additionally, a PERMANOVA analysis based on Bray-Curtis dissimilarity was conducted to assess the impact of shear rate and time on gene expression, with a significance threshold of p-value < 0.05.

Differentially expressed genes (DEGs) were identified using DESeq2 in R, applying the criteria of $|\log_2$ fold change$|$ >1.5 and a false discovery rate (FDR)-adjusted P value < 0.05. All samples were compared to the bacterial suspension at the initial time point (T0 min) corresponding to each shear condition. Preliminary analysis (Fig. S3) confirmed no statistically significant differences between the three T0 samples (one per shear condition) obtained from the inocula, thereby validating their use as equivalent baselines.

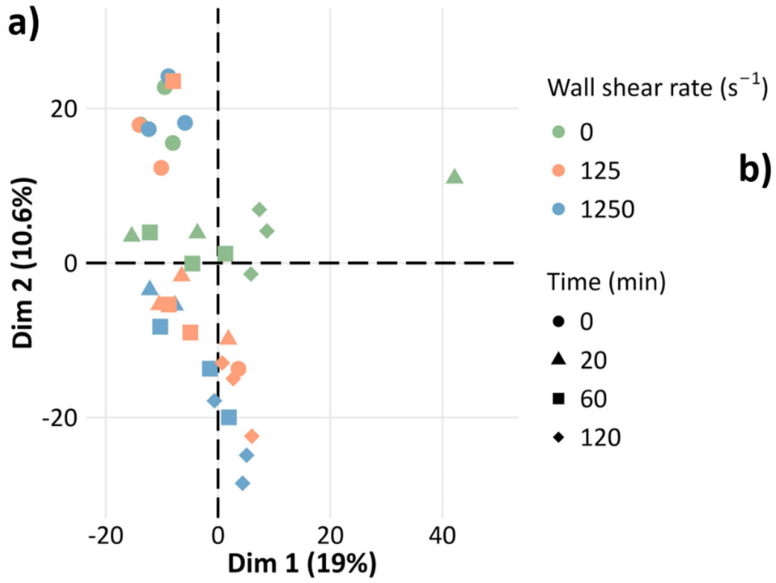
To explore the biological significance of the DEGs, COG IDs were assigned to all expressed genes using the eggNOG-mapper tool (http://eggnog-mapper.embl.de/). Functional enrichment analysis of COG categories was performed on the identified DEGs using Fisher's exact test in R, with a p-value threshold of < 0.05. Finally, the clusterProfiler R package (http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html) was used to identify enriched KEGG pathways within the DEGs, using a significance cut-off of p-value < 0.1.

Results

Combined effects of shear and time on gene expression

Principal component analysis (PCA) (Fig. 2a) revealed that nearly 30 % of the variation in gene expression could be explained by these two factors, highlighting their contribution to transcriptional variation. Indeed, at the beginning of the experiment (T0 min) regardless of shear, the gene expression level profiles of the initial bacterial inocula were closely clustered (with the exception of one replicate), suggesting that the *Shewanella* populations shared a quite similar transcriptional content, and consequently close physiological state. However, as time progressed and across all shear rates, population's clusters gradually diverged. Notably, a clear distinction was observed in gene expression levels under static conditions compared to those under flow (125 and 1250 s^{-1}), with the effect becoming more pronounced over time. This suggests a distinct effect of shear regardless of its intensity, as well as a temporal evolution in gene expression, even in the absence of flow. These findings highlight the importance of considering the combined effects of time and hydrodynamic conditions, as well as accounting for the inherent temporal drift of the inoculum. For this latter reason, the initial inoculum (T0 min) was used as a reference point throughout the study.

PERMANOVA analysis (Fig. 2b) supported these observations, revealing significant effects of shear rate ($p = 0.002$), time ($p = 0.001$), and their interaction ($p = 0.008$). Time was the main explanatory factor, accounting for 32 % of the total variance, followed by the interaction between time and shear (19 %), and shear rate alone (15 %). The remainder of this study will focus on further quantifying the contributions of these factors and assessing their biological significance.



b)

Factor	R^2	p-value
Wall shear rate	0.13	0.002
Time	0.32	0.001
Interaction	0.19	0.008

Fig. 2. a) Principal Component Analysis (PCA) of gene expression levels in *S. oneidensis* suspensions subjected to three different shear rates (color-coded) and sampled at multiple time points (indicated by different shapes). All 1,971 genes expressed during the experiment were included in the analysis. b) Statistical table showing PERMANOVA results (Bray-Curtis distance) testing the effects of shear, time, and their interaction on gene expression. Includes R^2 (variance explained) and p-values (significance levels).

Significant transcriptional variation of DEGs under hydrodynamic stress

Differential gene expression analysis revealed significant transcriptional changes under most conditions, except at the intermediate shear rate (125 s^{-1}) after 60 minutes (Fig. 3 a-b). Additionally, with the exception of this shear rate, the number of upregulated genes consistently exceeded that of downregulated ones, with an average ratio of about 1.7. This trend toward gene activation may reflect the early steps of an adaptive response to the applied experimental conditions. Clear differences in the number of differentially expressed genes (DEGs) were observed according to both shear rate and exposure time (Fig. 3b). Under static conditions, transcriptional changes were pronounced and time dependent, with 60 DEGs at 20 minutes and around 100 after 120 minutes. This indicates a significant transcriptional remodeling over time, which is likely attributable to the bacterial physiological changes that naturally occurred during the 2-hour static conditions. In contrast, and regardless of the time point considered, transcriptomic evolution was much milder at the intermediate shear rate (125 s^{-1}), showing on average about 3.5 times fewer DEGs, while the high shear rate (1250 s^{-1}) triggered a stronger response, with 1.5 to 2-fold more DEGs.

When comparing static and 1250 s^{-1} conditions (Fig 3c), although some DEGs were shared (on average 23 % for all times), the majority of DEGs under high shear were unique (on average 64 %). Moreover, although the transcriptional response at 125 s^{-1} was less significant, it shares 86 % and 77 % of its DEGs at 20 and 120 minutes, respectively, with those observed at 1250 s^{-1}. This suggests that even moderate shear may initiate part of the shear-specific transcriptional response observed at higher forces. However, at this intermediate shear level, the absence of differential expression for certain genes unique to the high shear rate (1250 s^{-1}) may reflect a threshold effect of shear stress. Two hypotheses could explain this observation. First, the stress level may be too low to induce a significant transcriptional remodeling. Second, the stress induces a transcriptional response, but weaker than those at 1250 s^{-1} that fails to reach the 1.5-fold threshold for considering the expression as differential.

The heatmap of log_2 fold-change expression patterns across conditions (Fig. S4) provides stronger support for the second hypothesis, showing that most genes differentially expressed at 1250 s^{-1} follow a gradual increase or decrease in expression with rising shear rates, with intermediate levels observed at 125 s^{-1}. For instance, motility related genes in *S. oneidensis* (see green rectangle C Fig. S4), particularly those involved in flagellar biosynthesis, are significantly upregulated at 1250 s^{-1} and also exhibit elevated expression under intermediate shear compared to static conditions, indicating a positive correlation between shear intensity and expression level. However, the first hypothesis previously mentioned is also supported in some cases. For example, some genes in the leucine degradation pathway (black rectangle A, Fig. S4), which are differentially expressed only at 1250 s^{-1} show slightly higher expression at 0 s^{-1} than at 125 s^{-1}.

To identify functions and pathways significantly impacted by hydrodynamics, differential gene enrichment analyses were performed, respectively COG and KEGG pathway enrichment.

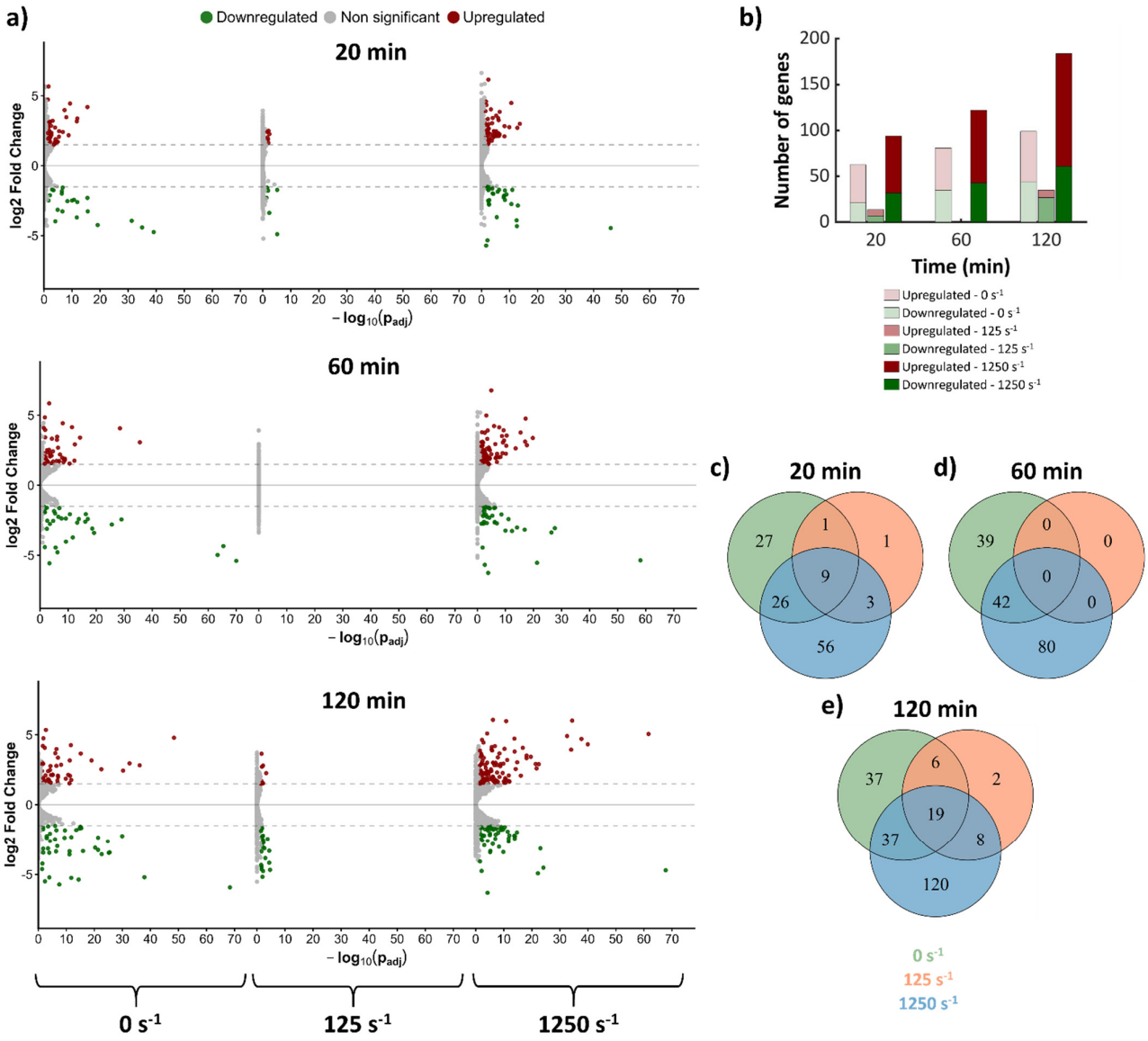


Fig. 3. a) Volcano plots, b) Number, c-e) Venn diagrams of differentially expressed genes (DEGs) in *S. oneidensis* suspensions exposed to shear rates of 0, 125 and 1250 s^{-1} at different time, each compared to its respective inoculum at T0 min. DEGs were defined by a $|\log_2 \text{Fold Change}| > 1.5$ and a p-value < 0.05. Each condition included three biological replicates.

COG Enrichment Analysis of DEGs

The enrichment of functional categories (COG) across all conditions is represented as odds ratios (Fig. 4), which indicate the overrepresentation of each COG category among the differentially expressed genes (DEGs), compared to their proportion in the background set, i.e. the 1,971 genes with an expression (Fig. S6). Enrichment of upregulated genes is represented by positive values, while enrichment of downregulated genes is represented by negative values. Although not all enrichments reach statistical significance (Fig. S5), the observed patterns suggest that the bacterial biological response to the

experimental environment is likely multifunctional, affecting a broad range of intrinsic cellular functions, with 65 % of COG categories impacted across all conditions.

For upregulated genes, a general trend of enrichment is observed in COG categories related to transport and metabolism, particularly *Lipid transport and metabolism* across all conditions, although the effect is more pronounced under shear. *Nucleotide transport and metabolism* shows early enrichment (at 20 minutes) for all shear, particularly at the intermediate shear rate (125 s^{-1}). Additionally, *Amino acid transport and metabolism* and *Coenzyme transport and metabolism* appear enriched only under shear, with the latter showing a rapid response. A second major trend is the enrichment of some upregulated genes dealing with the *Energy production and conversion* category, which is significant over time for all conditions. Additionally, the *Postranslational modification, protein turnover, and chaperones* category shows later enrichment (120 minutes), with a strong response observed at the intermediate shear rate (odds ratio = 16). Finally, and more sporadically, specific responses to high shear include early enrichment of genes involved in *Motility*, as well as genes related to *Defense mechanisms* and *Cell cycle control, cell division, and chromosome partitioning*.

Regarding categories of downregulated genes, i.e. those over-represented among genes whose expression decreases, the *Inorganic ion transport and metabolism* category is significantly enriched across all tested conditions (at least at one time point), with a greater effect under static conditions. We also observe enrichment of downregulated genes in category *Carbohydrate transport and metabolism*, with a marked effect at the experiment beginning (20 minutes). Interestingly, this is the only pathway for which cells downregulate transport and metabolism, which is also in accordance with the enrichment of downregulated genes in the *Energy production and conversion* category. This pattern suggests a probable adaptation to the changing environment, as perturbations in energy metabolism may impair metabolic capacity and normal physiological function of bacteria. The presence of both up and downregulated genes involved in energy metabolism further indicates a regulatory circuit aimed at maintaining energy at a proper level for cell survival.

Other enriched categories include *Intracellular trafficking, secretion and vesicular transport*, as well as *Motility*. The latter is somewhat unexpected given that a positive effect of shear on flagellar biosynthesis was observed (Fig. S4). However, these genes were not always considered as significantly differentially expressed under our thresholds, which may explain their absence from the upregulated enrichment. It is also worth noting that flagellar genes are not the only ones in this category. For example, genes encoding the type IV pilus assembly proteins PilM and PilT (*SO_0281* and *SO_3351*) are part of this COG category and show either significant downregulation or a decreasing expression trend over time, across all tested conditions. Finally, we note a specific enrichment of the downregulated genes involved in *Transcription* at 125 s^{-1}.

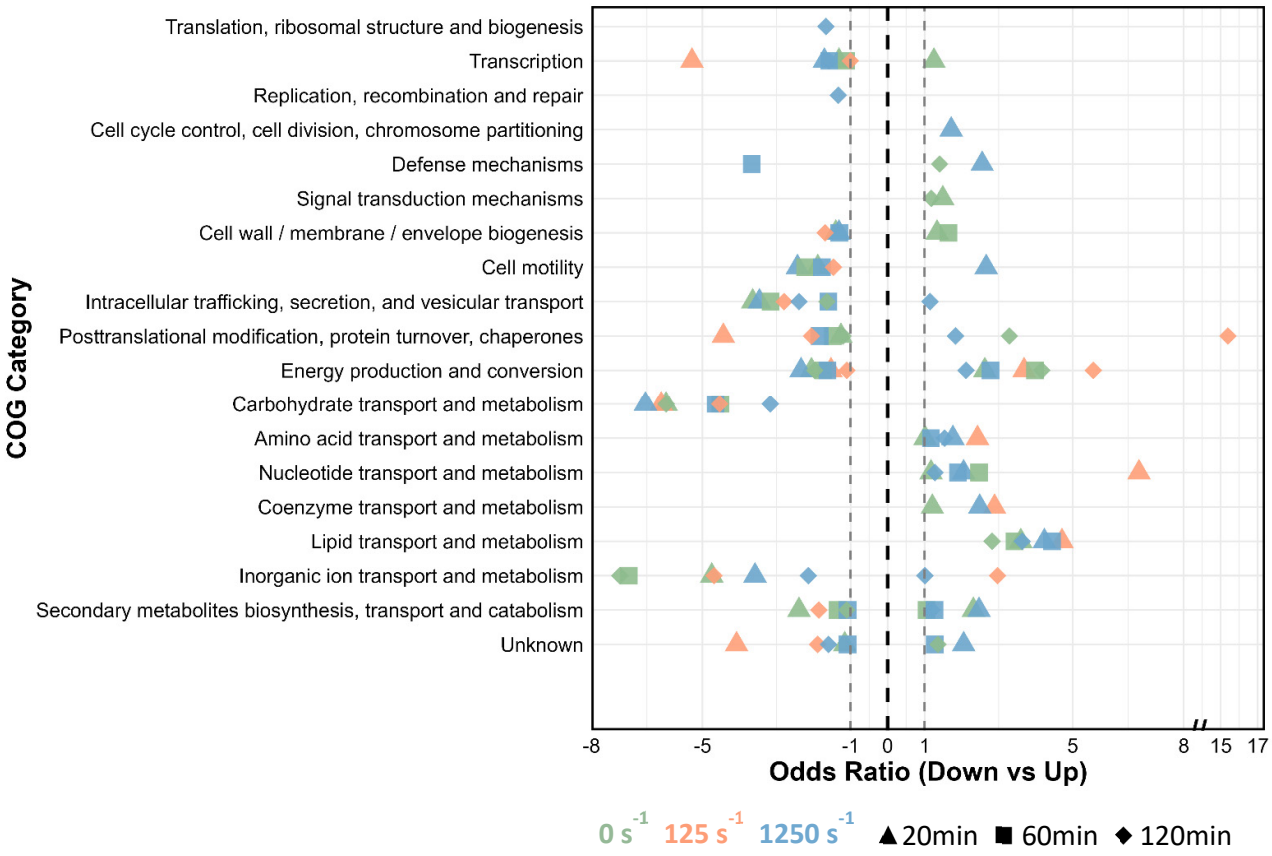


Fig. 4. COG category enrichment of differentially expressed genes (DEGs), identified by comparing each condition to its respective inoculum at 0 min, across all shear rate (color) and time points (shape). The x-axis represents the odds ratio: positive values indicate over-representation among upregulated DEGs, negative values among downregulated DEGs. Only categories with odds ratios beyond ±1 are shown.

KEGG Pathway Enrichment Analysis of DEGs

COG enrichment analysis suggested that the applied experimental conditions impact bacterial metabolism. To further investigate this effect and identify specific metabolic pathways involved, the obtained DEGs were subjected to KEEG pathway enrichment analysis (Fig. 5).

For upregulated genes (Fig. 5a), and according to our criteria (adjusted p-value < 0.1 and at least two DEGs per pathway), the 15 most enriched pathways across all tested conditions were *valine, leucine and isoleucine degradation*, *carbon metabolism*, *propanoate metabolism*, *microbial metabolism in diverse environments*, *butanoate metabolism*, *other carbon fixation pathways, glycolysis / gluconeogenesis*, *RNA degradation*, *citrate cycle*, *pyruvate metabolism*, *oxidative phosphorylation*, *fatty acid metabolism*, *flagellar assembly*, *two-component systems*, and *biosynthesis of cofactors*. At 125 s^{-1}, the transcriptional response was less pronounced compared to those in the initial inoculum (T0 min), suggesting conditions closely resemble the inoculum state with minimal transcriptional adjustments.

Alternatively, this shear may induce less stress on the exposed bacteria and therefore did not significantly activate a detectable physiological response. In contrast, under static conditions, significant transcriptional remodeling and metabolic divergence were observed, likely indicating that the absence of flow causes more stress on bacterial physiology. Indeed, sedimentation may have occurred in static conditions, which could have led to potential nutrient depletion and oxygen limitation, conditions that are mitigated under flow. Additionally, the most pronounced response occurred at the highest shear rate (1250 s^{-1}), where all examined pathways showed significantly greater enrichment, reflected by an increased number of DEGs compared to static or intermediate shear conditions. This suggests substantial metabolic reprogramming in *S. oneidensis* under high shear exposure, likely reflecting elevated energy demands for growth, survival or coping with mechanical stress. Such adaptation may also facilitate escape from shear stress or enhance surface colonization under flow.

For downregulated genes (Fig. 5b), ten pathways were identified, although with fewer DEGs and lower statistical significance. These include the *pentose phosphate pathway*, *carbon metabolism*, *pyruvate metabolism*, *glycolysis / gluconeogenesis*, *microbial metabolism in diverse environments*, *biosynthesis of secondary metabolites*, *biosynthesis of amino acids*, *nucleotide metabolism*, and *two-component systems*. A temporal effect was observed. Some pathways, such as *carbon metabolism*, *pyruvate metabolism*, *glycolysis/gluconeogenesis*, and *microbial metabolism in diverse environments*, showed an early decrease in expression (20 minutes), with partial recovery observed over time across all hydrodynamic conditions. In contrast, other pathways such as the *pentose phosphate pathway* showed a progressive decline in expression over time. Hydrodynamic conditions also impacted the transcriptional response. Notably under high shear, a decreased expression of the genes regulating *two-component systems* and *nucleotide metabolism* was observed, an effect absent or less pronounced under static conditions. *Amino acid biosynthesis* also exhibited an immediate decrease under shear stress.

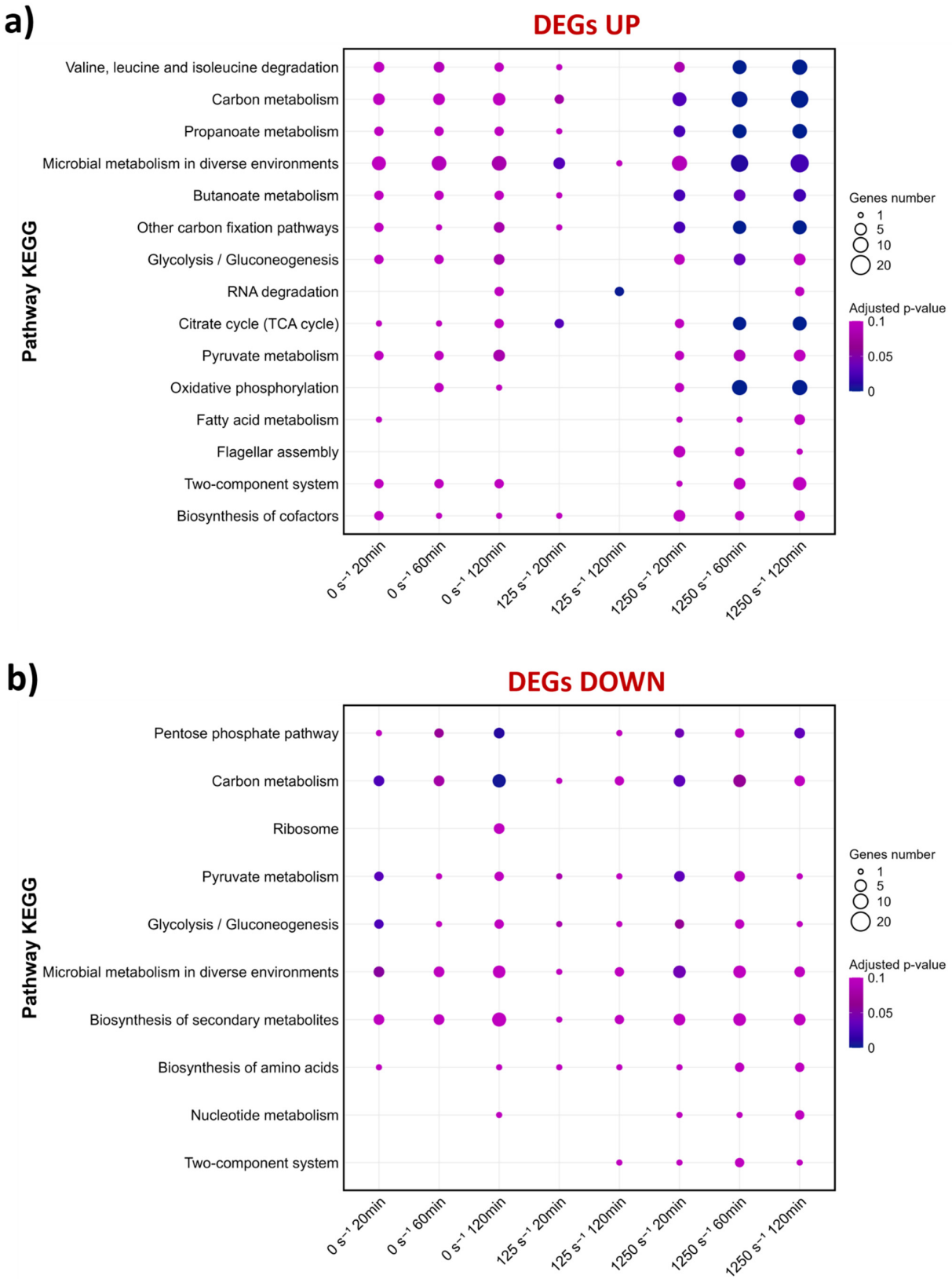


Fig. 5. KEGG pathway enrichment for genes that are upregulated (a) or downregulated (b) across all tested conditions. Each point represents the number of genes enriched in a pathway, and is colored according to the statistical significance of the enrichment. The pathways shown are the top 15 or 10 most frequently and significantly enriched across individual condition-specific analyses.

Global trends observed under shear conditions

COG and KEGG enrichment analyses, combined with gene-by-gene investigation, allowed us to categorize the DEGs and provided deeper insights into the bacterial response to shear stress, particularly under high shear conditions. To capture a comprehensive view of all transcriptional changes under flow, a global overview of gene expression after 2 hours under static and at 1250 s^{-1} is provided in Fig. S7 and S8, respectively. Taken together, several key trends emerged from these analyses, which are presented below.

- **Metabolic reprogramming favoring energy production**

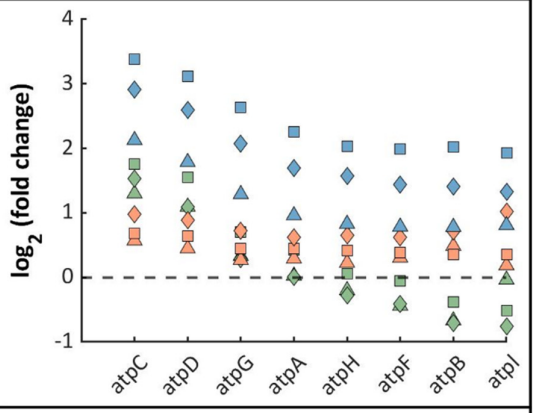
The oxidative phosphorylation pathway was markedly upregulated under high shear flow (1250 s^{-1}), with all eight subunits of the F-type ATP synthase complex (Table 1) (Kühlbrandt, 2019) exhibiting an additional increase of approximately 1-3 log_2 fold change compared to the static condition. Peak expression levels were reached after one hour of exposure to high shear. Intermediate shear rate elicited gene expression levels between those observed under high and zero shear, except for *atpC* and *atpD*. In contrast, approximately 50 % of these genes were downregulated under static conditions. This indicates a significant impact of high shear on the energy metabolism of *S. oneidensis*, further supported by the upregulation of electron transport chain genes (Kaila and Wikström, 2021), in particular those encoding cytochrome Cbb3-type oxidase (*ccoP*, *ccoQ* and *ccoN*) (Durand *et al.*, 2018; Rauhamäki *et al.*, 2012), with log_2 fold-change levels approximately four times higher than those observed under static conditions.

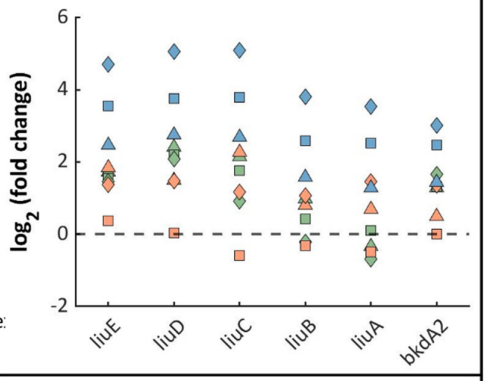
This modulation of energy metabolism under high shear is also associated with changes in central metabolism (Table 1). Notably, six of the seven genes involved in leucine catabolism (Diaz-Perez *et al*., 2016) were upregulated within 20 minutes of stress exposure, displaying a pronounced time-dependent increase, with an approximate twofold higher log_2 fold change at 120 minutes compared to 20 minutes. Although similar upregulation trends of these genes are observed under other conditions, their magnitude is reduced, with average log_2 fold changes roughly halved. The activation of leucine catabolism is a recurrent phenomenon as it permits the maintenance of bacterial metabolism in the absence of other carbon sources, i.e. a kind of recycling mode for cells. In our case, it is the distal pathway (LIU pathway) that was activated (Díaz-Pérez *et al*., 2007; Díaz-Pérez *et al.*, 2016; Serrazanetti *et al*., 2011). It is recognized as being of significant importance for bacterial metabolism in environments where resources are scarce (Alonso-Sáez *et al.*, 2010). In particular, the final reaction of this pathway, encoded by the *liuE* gene, results in the production of acetyl-CoA and acetoacetate that can be channeled to tricarboxylic acids cycle (TCA) to synthetize other biomolecules when the precursors do not meet cellular requirements. So it is not surprising that concomitantly, genes associated with the TCA cycle (Muñoz-Elías *et al.*, 2006) also showed consistently increased or similar expression levels under high shear conditions. Upregulation was also observed in fatty acid degradation such as propanoate, butanoate, and branched-chain fatty acids (*icfE*, *fadJ*, *acnD* and *prpB*) via the 2-methylcitrate cycle (Zheng *et al*., 2020), as well as amino acid catabolism linked to the TCA cycle (*liuF*, *liuG* and *ivdE*), indicating a broad activation of energy-yielding pathways in response to shear stress.

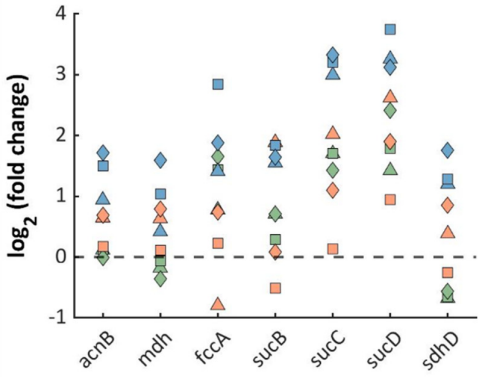
Table 1. DEGs associated with energy production and conversion in *S. oneidensis*

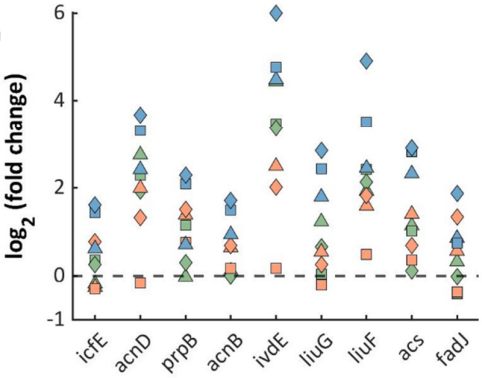
0 s^{-1} 125 s^{-1} 1250 s^{-1} ▲20min ■60min ◆120min

Locus tag	Name	Product	Log_2 Fold Change
ATP synthase			
SO_4746	*atpC*	ATP synthase F1 epsilon subunit AtpC	
SO_4747	*atpD*	ATP synthase F1 beta subunit AtpD	
SO_4748	*atpG*	ATP synthase F1 gamma subunit AtpG	
SO_4749	*atpA*	ATP synthase F1 alpha subunit AtpA	
SO_4750	*atpH*	ATP synthase F1 delta subunit AtpH	
SO_4751	*atpF*	ATP synthase F0 B subunit AtpF	
SO_4753	*atpB*	ATP synthase F0 A subunit AtpB	
SO_4754	*atpI*	ATP synthase assembly protein AtpI	
Leucine degradation			
SO_1893	*liuE*	3-hydroxymethylglutaryl-CoA lyase LiuE	
SO_1894	*liuD*	methylcrotonyl-CoA carboxylase biotin-binding subunit LiuD	
SO_1895	*liuC*	methylglutaconyl-CoA hydratase LiuC	
SO_1896	*liuB*	methylcrotonyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit LiuB	
SO_1897	*liuA*	isovaleryl-CoA dehydrogenase LiuA	
SO_2340	*bkdA2*	3-methyl-2-oxobutanoate dehydrogenase comple E1 component beta subunit BkdA2	
TCA cycle			
SO_0432	*acnB*	aconitate hydratase B	
SO_0770	*mdh*	NAD dependent malate dehydrogenase Mdh	
SO_0970	*fccA*	periplasmic fumarate reductase FccA	
SO_1931	*sucB*	2-oxoglutarate dehydrogenase complex succinyl-CoA:dihydrolipoate S-succinyltransferase E2 component SucB	
SO_1932	*sucC*	succinyl-CoA synthase beta subunit SucC	
SO_1933	*sucD*	succinyl-CoA synthase alpha subunit SucD	
SO_4778	*sdhD*	succinate dehydrogenase membrane anchor subunit SdhD	
Other degradation pathways			
SO_0075	*icfE*	long-chain-fatty-acid--CoA ligase IcfE	
SO_0343	*acnD*	2-methyl citrate dehydratase Fe-S dependent Acı	
SO_0345	*prpB*	2-methylisocitrate lyase PrpB	
SO_0432	*acnB*	aconitate hydratase B	
SO_1680	*ivdE*	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase IvdE	
SO_1891	*liuG*	acetyl-CoA:acetoacetate-CoA transferase beta subunit LiuG	
SO_1892	*liuF*	acetyl-CoA:acetoacetate-CoA transferase alpha subunit LiuF	
SO_2743	*acs*	acetyl-coenzyme A synthetase AcsA	
SO_3088	*fadJ*	anaerobic fatty oxidation complex alpha subunit FadJ	









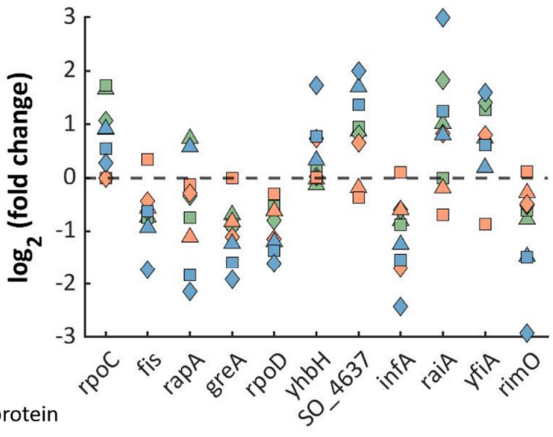
- **Global slowdown of transcription and translation**

First, genes linked to the ribosomal machinery (structure and function) showed shifts in their expression (Table 2). Indeed, the transcriptional regulator *rpoD*, which encodes the primary sigma factor σ^{70} that directs RNA polymerase to most housekeeping promoters (Balleza *et al*., 2009; Browning and Busby, 2004; Helmann, 2019), was downregulated under all tested conditions. This decrease of expression was particularly significant at high shear rate (1250 s^{-1}) across all time points, whereas under static conditions it was only observed at 120 minutes. Similarly, *rpoC* expression (encoding the β' subunit of RNA polymerase (Murakami, 2015; Murakami and Darst, 2003) also decreased under flow conditions compared to static, except at the final time point. Additional transcription regulators exhibited progressive decreases in expression over time, with greater reductions occurring at higher shear rates. These include the nucleoid-associated regulator *fis* (Bradley *et al.*, 2007; Browning and Busby, 2004; Nilsson *et al*., 1990), the RNA polymerase recycling factor *rapA* (Jin *et al.*, 2011) and the transcription elongation factor *greA* (Borukhov *et al*., 2005). In parallel, changes in the expression of genes related to translation were also detected. For instance, *infA*, which encodes translation initiation factor IF-1 (essential for the fidelity and proper assembly of the translation initiation complex (Cummings and Hershey, 1994; Laursen *et al*., 2005) and *rimO,* encoding a methylthiotransferase that modifies ribosomal protein S12 to enhance ribosomal accuracy (Anton *et al.*, 2008), were both downregulated, with a more pronounced effect under high shear rates. Meanwhile, genes linked to the ribosomal machinery as *rpsJ*, *rplC* and *rplD,* three genes encoding components of the 30S and 50S ribosomal subunit proteins (Fu *et al*., 2013) exhibited a greater decrease in expression compared to the inoculum over time for all tested conditions.

Table 2. DEGs involving regulators of transcription and translation

0 s^{-1} 125 s^{-1} 1250 s^{-1} ▲20min ■60min ◆120min

Locus tag	Name	Product	Log$_2$ Fold Change
Transcriptional and Translational Regulators			
SO_0225	*rpoC*	DNA-directed RNA polymerase beta' subunit RpoC	
SO_0393	*fis*	global transcriptional activator Fis	
SO_0575	*rapA*	RNA polymerase-associated helicase RapA	
SO_1191	*greA*	transcription elongation factor GreA	
SO_1284	*rpoD*	RNA polymerase sigma-70 factor RpoD	
SO_3962	*yhbH*	Ribosome Hibernation-Promoting Factor / Sigma-54 Modulation protein YhbH	
SO_4637	SO_4637	two component transcriptional regulator Winged helix family	
SO_2625	*infA*	translation initiation factor IF-1 InfA	
SO_3403	*raiA*	ribosome-associated inhibitor A RaiA	
SO_3422	*yfiA*	ribosomal associated cold shock response protein YfiA	
SO_4072	*rimO*	ribosomal protein S12 methylthiotransferase RimO	



Additionally, the expression levels of genes involved in translation and stress response also exhibited modifications. For instance, genes encoding ribosome-stabilizing factors such as *raiA* and *yfiA*, which protect non-translating 70S ribosomes from degradation under stress conditions (Lang *et al.*, 2021; Matzov *et al*., 2019; Prossliner *et al*., 2018), were upregulated over time under all flow conditions, particularly for *raiA* (log_2 fold change = 3) at high shear. Interestingly, this is concomitant with the upregulation of the hibernation promoting factor (HPF) encoded by *yhbH* (Prossliner *et al*., 2018), at 120 minutes under high shear. This small acidic protein binds to ribosomes during dormant /stationary phases and causes conformational changes to the ribosome, which results in dimerization of two ribosomes to form an inactive 100S form (Akiyama *et al.*, 2017; Ueta *et al*., 2008). Together, these findings suggest a coordinated cellular shift towards reduced transcriptional and translational activity.

- **Iron regulation, polyamine biosynthesis and bacterial homeostasis**

Our study indicates that shear seemed to negatively influence iron absorption and transport compared to those of the inoculum. Indeed, key components of the iron uptake, as several TonB-dependent genes and the inner membrane protein *exbB*, were strongly downregulated across all tested conditions, with a more pronounced effect observed under static conditions. This includes *SO_4743* and *SO_3914*, both TonB-dependent siderophore receptors, which showed expression levels ranging from -2.5 to -5.7 under static conditions, compared to a milder downregulation between -0.1 and -1.5 under high shear rates. Similarly, the expression of *hmuA*, a TonB-dependent heme-receptor, was also decreased in all conditions, with a significant decrease of approximately 5 log_2 fold change under static conditions and only minor downregulation under high shear (log_2 Fold Change = -1.1 on average). In the same heme-uptake network, *hmuX* and *hmuZ* (heme iron utilization proteins), and *hmuB, hmuC*, and *hmuD*, which encode the substrate-binding, permease, and ATPase components of the ABC-type hemin uptake system, are also transcriptionally downregulated, with a slightly more pronounced effect under static condition across all time points tested. Similarly, genes involved in ferrous iron transport and iron–sulfur cluster assembly, including *feoB* and *erpA*, were also downregulated with no substantial differences between shear conditions. Conversely, other transcriptional signals of iron acquisition and transport were highly overexpressed under shear. Markedly, *speF* which encodes an ornithine decarboxylase involved in putrescine biosynthesis (Wang *et al*., 2020b) is the gene displaying the highest induction observed in this study (log_2 fold change of 6.8 under high shear which is 2 to 3 units higher than in static conditions). And this is coordinated with strong upregulation of the expression of *putA* (average log_2 fold change = 2), *pubA* and *pubC,* encoding a TonB-dependent siderophore receptor and the siderophore (putrebactin) biosynthesis, respectively.

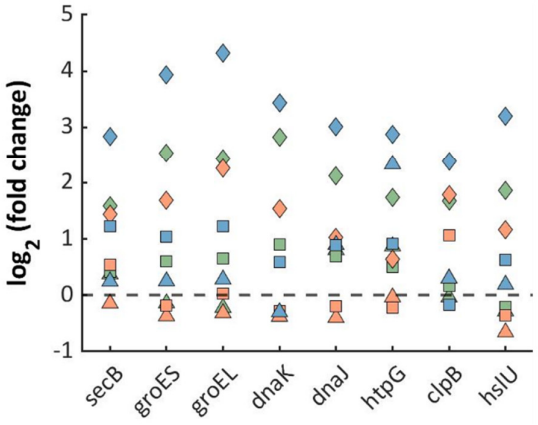
- **Chaperone induction increases over time, enhanced by hydrodynamic stress**

COG enrichment analysis (Fig. 4) revealed an increase in the *Posttranslational modification, protein turnover, chaperones* category after 120 minutes across all flow conditions. Several key chaperone-encoding genes, including *secB*, *groES*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ*, *htpG*, *clpB* and *hslU*, were significantly upregulated at this later time point (120 minutes) (Table 3). These genes interact in the signaling network that regulates the cellular stress response, coordinating protein folding, preventing aggregation, and facilitating the refolding or degradation of misfolded proteins (Fatima *et al*., 2021; Hayes and Dice, 1996; Hendrick and Hartl, 1995; Lund, 2009; Sala *et al*., 2014). This transcriptional upregulation was shear dependent: lower expression was observed under intermediate shear, higher expression under static conditions, and the strongest induction under high shear, where $\log_2$ fold changes exceeded 3 and reached up to 4, particularly for *groES* and *groEL*.

Table 3. DEGs associated with chaperone proteins

0 s^{-1} 125 s^{-1} 1250 s^{-1} ▲20min ■60min ◆120min

Locus tag	Name	Product	$\log_2$ Fold Change
Chaperone proteins			
SO_0052	*secB*	protein export chaperone SecB	
SO_0703	*groES*	10 kDa chaperonin GroES	
SO_0704	*groEL*	60 kDa chaperonin GroEL	
SO_1126	*dnaK*	chaperone protein DnaK	
SO_1127	*dnaJ*	chaperone protein DnaJ	
SO_2016	*htpG*	heat shock chaperone HtpG	
SO_3577	*clpB*	stress-induced multi-chaperone system component ClpB	
SO_4163	*hslU*	ATP-dependent chaperone	



- **Activation of the flagellar assembly machinery**

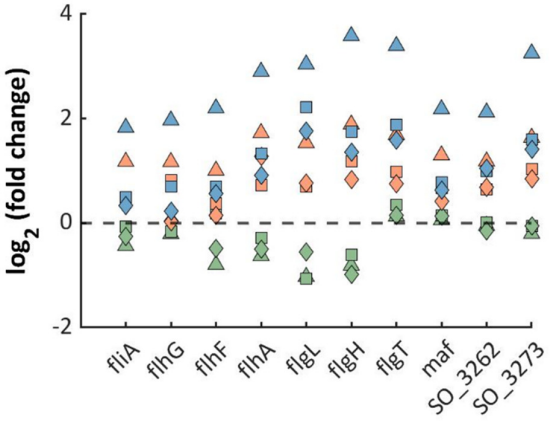
Genes involved in flagellar biosynthesis and regulation (Kaplan *et al., 2019;* Lou *et al., 2025;* Melamed *et al*., 2023; Mondino *et al*., 2022; Sun *et al*., 2022) were significantly upregulated under shear flow conditions (Table 4), particularly after 20 minutes. These included the sigma factor FliA (*fliA*), known to control the expression of late stage flagellar genes, as well as genes encoding GTPases involved in flagellar number and polar localization regulation (*flhF* and *flhG*), and a component of the type III export apparatus *flhA*. Structural and assembly-related genes, including *flgH*, *flgL*, and *flgT* (which encode components of the basal body, hook-filament junction, and outer membrane ring, respectively) were also upregulated. Accessory motility / flagellar modification (maf for example) were also expressed. Although expression of these genes decreased over time under shear flow (by approximately 1.5 to 2 in $\log_2$ fold change), their levels remained higher than those in the initial inoculum throughout the experiment, and were comparable to those

observed under intermediate shear rate, which likewise decrease over time. This temporal pattern under shear flow suggests rapid and early activation of the flagellar system following stress application. The decrease may reflect that the bacteria had already established functional flagella by that time, thanks to the early activation. In contrast, under static conditions, these genes were downregulated relative to the inoculum baseline, although the decrease did not reach statistical significance (log_2 fold change < -1.5).

Table 4. DEGs related to flagellum assembly

0 s^{-1} 125 s^{-1} 1250 s^{-1} ▲20min ■60min ◆120min

Locus tag	Name	Product	Log_2 Fold Change
Flagellar assembly			
SO_3210	*fliA*	RNA polymerase sigma-28 factor for flagellar operon FliA	
SO_3211	*flhG*	Flagellar polar localization control system FlhF inhibitory APTase FlhG	
SO_3212	*flhF*	Flagellar polar localization control system flagellar assembly determinant GTPase FlhF	
SO_3213	*flhA*	Flagellar export protein FlhA	
SO_3239	*flgL*	Flagellar hook-associated protein FlgL	
SO_3243	*flgH*	Flagellar L-ring protein FlgH	
SO_3258	*flgT*	Flagella assembly protein FlgT	
SO_3259	*maf*	Motility accessory factor Maf	
SO_3262	SO_3262	TPP-dependent enzyme involved in flagella modification	
SO_3273	SO_3273	Motility accessory factor Maf family	



- **Environment perception**

Two-component systems generally act as bacterial signal transduction mechanisms, typically composed of a sensor histidine kinase that detects external stimuli and a response regulator that modulates gene expression accordingly (Alvarez and Georgellis, 2023; Capra and Laub, 2012; Stock *et al.*, 2000). Several were detected in this study. Among them, *phoB*, known for its role in phosphate stress response (Bruna *et al.*, 2024), exhibited significant downregulation under high shear conditions. *arcA*, a two-component signal transduction system from the OmpR family involved in the control of aerobic respiration and oxidative stress response (Brown *et al.*, 2022; Loui *et al.*, 2009), showed significant downregulation at both tested shear rates (125 and 1250 s^{-1}), with an average log_2 fold change of -1.8, while its expression under static conditions was similar to that of the initial inoculum. Three additional two-component systems, whose functions are not fully understood, were also identified (*SO_4622*, *SO_4637*, *SO_4638*). *SO_4622* was upregulated exclusively under static conditions at all time points tested (average log_2 fold change = 2.4), *SO_4637* exclusively under high shear conditions (average log_2 fold change = 1.8), and *SO_4638* was significantly upregulated only at 20 minutes under both static and high shear conditions.

Discussion

Fluid flow is a common feature of many bacterial habitats (Conrad and Poling-Skutvik, 2018; Hall-Stoodley *et al.*, 2004) and strongly influences key processes such as attachment and biofilm formation (Busscher and Van Der Mei, 2006; Chang *et al*., 2020; Krsmanovic *et al.*, 2021; Lecuyer *et al.*, 2011). Despite extensive characterization of hydrodynamics effects on these processes, the cellular response of planktonic, free-living bacteria to shear flow remains poorly understood and documented. Only a few previous transcriptomics studies have explored the impact of hydrodynamics on attached (Gödeke *et al*., 2012; Rodesney *et al*., 2017; Sanfilippo *et al*., 2019) or planktonic pioneer cells (Ramachandran *et al*., 2024). However these studies predominantly focused on a limited subset of genes or functions, or analyzed mixed attached and planktonic populations over prolonged durations (Dingemans *et al.*, 2016). Using *Shewanella oneidensis* as a model, our transcriptomic investigation is one of the first that examine global gene expression under three shear conditions: static (no flow), intermediate (125 s^{-1}), and high (1250 s^{-1}) at three time points (20, 60 and 120 min), thereby capturing both short and long-term responses. Unlike some transcriptomic experimental approaches, our setup ensures uniform exposure of all bacterial cells to the specified hydrodynamic conditions throughout the treatment duration, enabling a confident attribution of observed transcriptional changes to shear stress. Cells exposed to the highest shear rate exhibited the greatest number of differentially expressed genes across all time points, with effects consistently stronger compared to other shear conditions. Although many of the observed responses are nonspecific and reflect universal cellular functions, bacteria not only sense this mechanical constraint but also actively adjust their biological functions to cope with it.

Before examining shear-specific responses, let's focus first on the physiological state of the inoculum (T0 min), which inevitably have influenced transcriptional patterns. The inoculum was prepared from a 14h-stationary-phase culture, likely exhibiting a stringent response due to nutrient limitation (Dworkin, 2023; Irving *et al*., 2021; Urwin *et al*., 2024; Zhu and Dai, 2023) and possibly pH stress from accumulated metabolic byproducts (Farrell and Finkel, 2003; Kanjee *et al*., 2011; Mouery *et al.*, 2006). Its resuspension in fresh $LB_{1/10}$ medium at the assay's start probably induced broad transcriptional changes such as reactivation of metabolic and transport functions that may be altered due to stationary phase. Indeed, several observations consistent across shear conditions and time points could be attributed to the "inoculum effect". For instance, as shown in Fig. S4 (green rectangle D), a pronounced downregulation of many genes involved in iron acquisition and utilization was detected under all conditions. This indicates that these genes were highly expressed in the inoculum in stationary phase, likely to optimize iron uptake, an essential nutrient (Andrews *et al*., 2003) that had been progressively depleted in the overnight preculture. It is probable that resuspension in fresh medium contributed to this pronounced downregulation observed under shear conditions, as the bacteria at the start of the assays encountered a new nutrient-rich environment with accessible iron ($LB_{1/10}$ approximately contains 1.7 µM (Yang *et al*., 2008)), which may

have induced rapid remodeling in uptake and transport mechanisms. Similarly, the downregulation of both *ahpC*, *ahpF* and *katB* genes much stronger in static than hydrodynamic conditions suggests that the inoculum cells may have experienced significant oxidative stress (Imlay, 2015; Qiu *et al*., 2006), consistent with a stationary-phase physiology. The high iron demand at this stage could therefore be interpreted as part of the bacterial strategy to cope with this stress (Cornelis *et al*., 2011; Frawley and Fang, 2014) and resuspension in fresh medium would then help alleviate this constraint.

Nevertheless, these interpretations should be nuanced. Although bacterial cells in stationary phase are undeniably subjected to multiple stressors, the lack of differentially expressed canonical genes associated with the stringent response (e.g., *RelA*, *SpoT,* σ^S) (Dworkin, 2023; Irving *et al*., 2021; Urwin *et al*., 2024) between T0 min and subsequent time points, suggest that the inoculum was not under distress. Additionally, the high expression at T0 min of genes involved in carbohydrate metabolism such as *edd* and *zwf* of the Entner-Doudoroff Pathway (El Husseini *et al*., 2024) further supports the hypothesis that the inoculum of *S. oneidensis* is composed of metabolically active and physiologically intact cells. Although defining an ideal reference condition is inherently complicated, given that controls are influenced by the bacterial population's history, these observations validate our choice of inoculum. Moreover, detection of genes differentially expressed exclusively under high shear condition, along with the amplified transcriptional responses observed under strong flow, clearly indicates that the patterns are attributable to shear effects rather than inoculum related issues.

Under high shear, central metabolism was markedly affected. As previously discussed, bacteria strongly activated their energy metabolism, boosting ATP production through the upregulation of ATP synthases and components, in particular cytochrome c, of the respiratory chain. This indicates an increased energetic demand in response to high shear stress and evidences that cells under shear are metabolically active, especially in pathways related to aerobic respiration. In addition, cells predominantly engaged catabolic pathways, preferentially degrading internal resources such as amino acids and fatty acids, rather than investing in the biosynthesis of new cellular components. This shift towards catabolism underscores a cellular prioritization of immediate energy generation over growth and biomass production. In addition, various genes (*dnaK*, *dnaJ*, *groES*, *groEL*) encoding chaperones, classical stress-related proteins (Leaphart *et al*., 2006) were also up-regulated, suggesting that they play a role in the shear tolerance or the regulation of adaptation to hydrodynamics. Even if direct comparison is biased, similar metabolic adjustments have previously been reported under other stress conditions and other bacteria, such as NaCl shock (Liu *et al*., 2005; Yu *et al*., 2024) or hydrostatic pressure (Amrani *et al*., 2014). This hypothesis is reinforced by a partial slowdown of both transcription and translation, including for instance reduced expression of the primary sigma factor (σ^{70}) and activation of factors promoting ribosome stabilization. This strategy is commonly observed in bacteria facing adverse conditions (Helena-Bueno *et al.*, 2024; Helmann, 2019; Prossliner *et al*., 2018; Theng *et al*., 2020) and reflects a transient slowdown in global biosynthetic activity, allowing

recycling and reallocation of energy resources towards stress adaptation and survival. Several molecular observations further support the hypothesis of an active adaptive response to high shear. The upregulation of genes belonging to multiple two-component regulatory systems suggests that cells may sense the imposed mechanical stress and activate relevant transcriptional programs. In addition, the concurrent induction of numerous chaperone protein genes indicates a more general perception of stress, which may facilitate the activation of targeted adaptive mechanisms.

Counterintuitively, the activation of energy-capacity metabolism observed under shear may support energy-intensive adaptive behaviors such as motility. Indeed, despite the overall reduction in major cellular activities (protein synthesis for example), genes involved in flagellar assembly were upregulated, particularly under high shear conditions. This induction occurred rapidly and was detectable as early as 20 minutes after shear application; it then decreased slightly over time. This increase in expression may reflect the fact that the inoculum at T0 min contained few or no flagellated bacteria, and that shear application stimulated their biosynthesis. This interpretation is consistent with recent work showing that under nutrient-limited conditions (stationary phase for instance) which might apply to our case, bacteria may eject their flagella from the cell body, leaving a relic at the inner membrane site where the flagellum had been (Ferreira *et al*., 2019). It is also consistent with our own holographic motility measurements (results not shown) which indicate that once the inoculum was recovered (T0 min), a waiting period (~ 30 min) was required to obtain a population with a sufficiently high percentage of motile cells (> 70%). The question now is why, under flow, these genes are up-regulated and possibly flagella synthesized, whereas under static conditions no significant difference from the inoculum is observed. On one hand, the imposed stress may have caused physical damage or disassembly of flagella as already described (Carrillo-Mora *et al*., 2025; Paradis *et al*., 2017; Turner *et al*., 2012), and analogous to effects reported under other mechanical stresses such as centrifugal forces (Rosu and Hughes, 2006). In that scenario, bacteria would need to reinvest energy in synthesizing new functional flagella or recycling damaged components. Inspired by the work of Ferreira *et al.* (2019), we could hypothesize that only the flagellar regions exposed to the flow (flagellin, hook, and junction) are degraded or removed, while the basal components anchored in the inner membrane remain intact for future flagellum assembly, allowing only the exposed components to be synthesized. This is consistent with our DEGs expression data, which show upregulation of only these components, including the L-ring, located at the outer membrane and thus also close to the flow.

Conversely, while not discounting the previous hypothesis, bacteria may actively redirect resources towards flagellar assembly as part of a “stress escape” strategy. In this scenario, to improve survival, cells prioritize motility in order to relocate to more favorable microenvironments, away from physical constraints. Such adaptive responses have already been reported under conditions of nutrient limitation

(Colin *et al*., 2021; Honda *et al.*, 2022; Zhao *et al*., 2007), low temperature (Kloska *et al*., 2020) , predation (Matz and Jürgens, 2005), oxygen (Krekeler *et al*., 1998), confinement (Tokárová *et al.*, 2021; Yin *et al*., 2022; Tian *et al*., 2024), among others. Because expression decreases after 20 minutes, this seems less consistent with a continuous damage repair of the flagella, which would likely maintain elevated expression throughout the duration of experiment and more align with an induced assembly strategy. Moreover, if the applied flow had caused mechanical damage to the flagella (detachment or breakage), similar damage would likely have occurred to the cell membrane, which is exposed to the same forces. However, no transcriptional signatures indicative of significant membrane injury, such as activation of stress signaling or lipid biosynthesis pathways, were detected. Finally, given the high energetic cost of flagellar synthesis (Bouteiller *et al.*, 2021; Colin *et al*., 2021), it seems unlikely that cells would continually rebuild structures that would perpetually be destroyed under the same shear conditions. Currently, it remains impossible to distinguish with absolute certainty between these two hypotheses; however, the evidence aligns more strongly with flagellar synthesis as a stress-escape strategy.

A flagellar assembly strategy may also serve as an initial surface colonization mechanism, promoting biofilm formation. Flagella promote bacterial transport to surfaces (Berke *et al*., 2008; Korber *et al*., 1989; McClaine and Ford, 2002; Secchi *et al.*, 2020; Zheng *et al*., 2021) and adhesion by increasing physiochemical contact points (Berne *et al.*, 2018; Palmer *et al.*, 2007), they act as mechanosensors (Berne *et al.*, 2018; Ellison *et al*., 2025; Persat, 2017), detecting surface contact and triggering regulatory cascades to strengthen attachment, notably via c-di-GMP signaling. Such surface colonization and biofilm formation are common survival strategies under stress. Our previous work (Klopffer *et al*., 2024) showed that pioneer bacteria exhibit highly dynamic behavior at the wall under the same hydrodynamic conditions, with over 70% remaining less than one minute. This transient behavior of pioneer bacteria suggests that many planktonic bacteria repeatedly encounter the surface during the experiment, potentially triggering responses that enhance subsequent attachment, such as flagella production or adhesin expression. A transcriptomic study on *S. oneidensis* pioneer adhered cells (Gödeke *et al.*, 2012) shows that the cells maintain flagella, overexpress pili, upregulate polysaccharide, secretion systems, and require iron. It also downregulates anabolic metabolism, suggesting an adaptive strategy that prioritizes adhesion over planktonic growth. In our study, upregulation of genes involved in flagellar biosynthesis and the type II Secretion System (*gspE*), which is known to promote bacterial adhesion (Cianciotto and White, 2017), along with genes involved in iron acquisition (*pubA*, *pubC*) may reflect some similar bacterial responses to enhance surface attachment under flow conditions.

Iron acquisition is also a key challenging process for bacteria to survive and compete. Specific transport pathways involving TonB-dependent siderophore receptors (TBSR) recognize and import the iron-siderophore complex into the periplasm from the outer membrane, a process depending on the energy transduced by the TonB-ExbB-ExbD system located in the inner membrane (IM).

Hydrodynamics has led to adjustments in the transcriptional response of genes involved in iron absorption and transport networks. Markedly, the gene displaying the highest induction observed in the whole dataset is *speF* (ornithine decarboxylase) which is involved in the putrescine biosynthesis (Wang *et al*., 2020b). This sharp increase in *speF* expression could be related to a dual interconnected cellular response. First, as an essential polyamine, the increase in putrescine synthesis under shear could be interpreted as a global response for cellular homeostasis, in particular to stabilize nucleic acids, to regulate translation and to provide resistance to stress (osmotic, oxidative, salt) (Gevrekci, 2017). Second, it can be hypothesized that putrescine synthesis activation serves as primary substrate for putrebactin synthesis, the major siderophore in *S. oneidensis*. Indeed, under high flow*, speF* upregulation is coordinated with a strong upregulation of the expression of *putA*, *pubA*, and *pubC* genes encoding the specific putrebactin-mediated iron uptake pathway in *S. oneidensis* (Liu *et al*., 2022). This agrees with previous studies (Dong *et al*., 2017; Fu *et al*., 2018; Jie *et al*., 2025; Xie *et al*., 2024), which established the coordinated regulation of these two iron-uptake operons: *putA* encodes a TonB-dependent siderophore receptor (TBSR) critical for iron acquisition under low-iron conditions; *pubA* and *pubC* are involved in putrebactin biosynthesis, a siderophore derived from putrescine, the primary substrate. In cases of iron deficiency, certain bacteria activate alternative metabolic pathways to compensate for the lack of iron, which may include increasing the production of putrescine. Putrescine, a central polyamine has been shown to play a role in protecting cells from oxidative stress, a condition that is frequently exacerbated in cases of iron depletion.

Conversely, the expression of other TBSRs, such as *SO_4743*, *SO_3914* and *SO_4022*, exhibit strong downregulation compared to inoculum, particularly under static conditions. However, as demonstrated by Liu *et al.* (2018), these TBSRs play a negligible role in putrebactin-mediated iron uptake, despite many of them being responsive to iron. Similarly, other components of the heme uptake and utilization pathways involving TonB2 energy transduction system at the inner membrane (*exbB*), TonB-dependent hemin receptor (hmu operon) are also downregulated across all conditions, with a more pronounced effect under static condition across all time points. In the same way, both *erpA* and *feoB* (Feo system), alternative systems of the inner membrane dedicated to iron-sulfur cluster assembly and ferrous (Fe^{2+}) iron transport, respectively, are also downregulated with no substantial differences between shear conditions. Overall, this suggests *Shewanella oneidensis* is subjected to iron scarcity that increased expression of the *pubABC* operon, leading to siderophore production, which in turn upregulates expression of the *putA* gene. It sustains a kind of restoration of iron homeostasis regulation (Liu *et al.*, 2022) under shear, which was likely impaired in the inoculum.

Finally, let's make a point on the transcriptional responses that did not appear while they could also have been anticipated. In particular, membrane damage could have been anticipated due to mechanical forces acting on the cell surface. This could have manifested as the upregulation of genes involved in membrane repair as the flotiline (*Flo*), the dynamin (*DynA*) and ESCRT-III-like proteins (PspA and Ydj complex)

(Bramkamp and Scheffers, 2023; Padilla-Vaca *et al.*, 2019; Ukleja *et al.*, 2024) or the activation of envelope stress response pathways to preserve membrane stability and integrity, in particular induction of the extracytoplasmic stress factor RpoE that reacts to stress signals outside the cytoplasmic membrane by transcriptional activation of genes encoding products involved in defense or repair processes (Egler *et al.*, 2005; Mitchell and Silhavy, 2019). This type of response has been reported, for instance, in bacteria subjected to pressure stress (Malas *et al*., 2024; Wang *et al*., 2021), another physical constraint that can be "considered analogous" to the hydrodynamic stress applied here. Furthemore, no clear evidence of DNA damage was detected, as indicating by the absence of genes such as *recA*, *recN*, *topB*, *dinB* or *lexA*, among others. This contrasts with observations under other forms of stress, including pressure (Malas *et al.*, 2024), ionizing radiation (Qiu *et al.*, 2006), or oxidative stress (Ezraty *et al*., 2017; Seixas *et al*., 2022; Addorisio *et al*., 2022).

Overall, these findings suggest that the shear conditions tested in this study were not strong enough to cause such damage, or that the physiological state of the inoculum, already influenced by prior stress, conferred enhanced resilience to additional mechanical stress. Nevertheless, since the shear rates applied here, along with nutrient limitation experienced by the inoculum, are comparable to those commonly encountered in natural or experimental conditions, this likely explains why the bacteria appeared to thrive under flow, even though such flow modulated their cellular activities.

Conclusion

Our study provided a comprehensive overview of the transcriptional response of planktonic *Shewanella oneidensis* to hydrodynamic shear stress. By combining three shear rates (0, 125 and 1250 s^{-1}) with three exposure times (20, 60 and 120 minutes), we demonstrated that both shear intensity and time drove significant and coordinated transcriptional remodeling. The strongest effects occurred at the highest shear rate, suggesting that *S. oneidensis* MR-1 actively adjusts its physiology in response to mechanical forces. The resulting response proved to be a coordinated adaptive strategy characterized by four main features: (1) metabolic reprogramming towards energy production, (2) a general slowdown in transcription and translation, (3) activation of stress response systems, particularly chaperones and dormant ribosomal genes, and (4) early upregulation of flagellar assembly genes. Together, these changes indicate that shear stress triggers an energy reallocation strategy that prioritizes survival and motility over growth, enabling the bacteria to escape or seek surfaces as adaptive responses to cope with hydrodynamic constraints.

Beyond its classical physical effects on transport and surface adhesion, our study demonstrated that hydrodynamic shear acts as a global environmental cue capable of reshaping bacterial physiology in dynamic habitats. While these results provide a comprehensive insight into the transcriptional response to shear, the molecular mechanisms underlying this mechanosensitivity, specifically which cellular structures detect and transmit the hydrodynamic signal, and how regulatory pathways orchestrate the response, remain to be elucidated.

Targeted gene knockouts and other functional studies will be essential for further advancing our understanding of bacterial mechanosensitivity and signal transduction, and for revealing how flow shapes microbial life in natural and engineered environments.

Acknowledgements

We would like to thank the members of the Epitranscriptomics and Sequencing Platform (EpiRNA-Seq) at the University of Lorraine, particularly Virginie Marchand and Valérie Bourguignon, for sharing their bacterial RNA extraction protocol and for insightful discussions on its implementation.

This work was supported by the French National Research Agency through the 'BIOCIDES' project (ANR-21-CE50-0027).

Appendix A. Supplementary data

Table S1. *Shewanella oneidensis* MR-1 WT inoculum characteristics: total number of bacterial cells in suspension at inoculum preparation (T0 min) and after 120 min of hydrodynamic treatment under different conditions. All values are means ± standard deviations (n = 3 independent experiments). Note: T0 min corresponds to the initial inoculum prior to separation, and is therefore common to all three conditions.

	Total biomass (cells/mL)		
Time (min)	0 s^{-1}	125 s^{-1}	1250 s^{-1}
0	$1.9 \times 10^{9} \pm 7.6 \times 10^{8}$		
120	$2.2 \times 10^{9} \pm 2.9 \times 10^{8}$	$2.2 \times 10^{9} \pm 5.0 \times 10^{8}$	$2.2 \times 10^{9} \pm 6.0 \times 10^{8}$

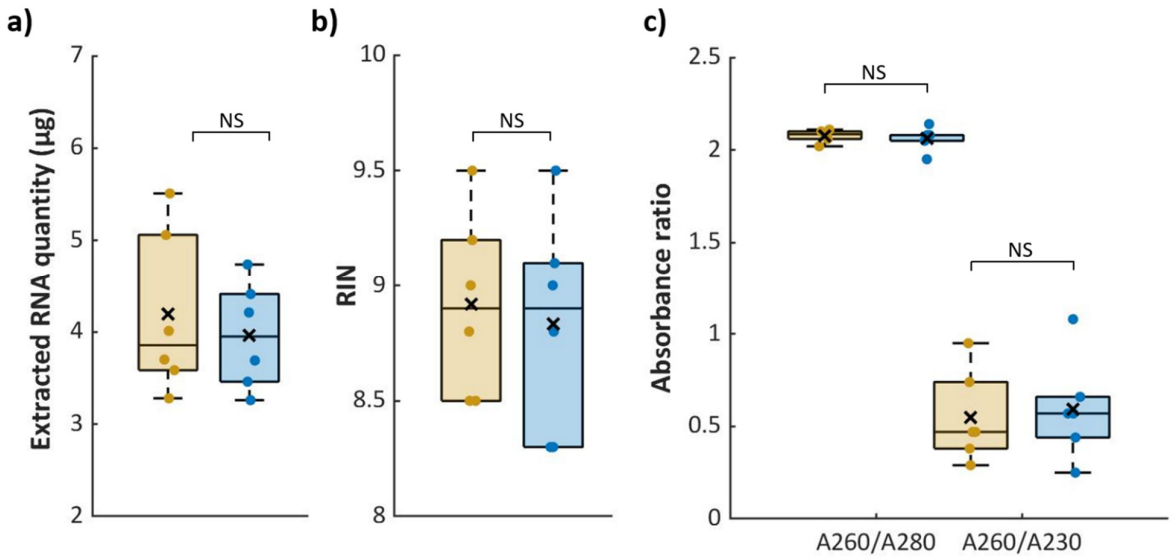


Fig. S1. Evaluation of RNA yield (µg) (a), integrity (RIN) (b), and purity (260/280 and 260/230 absorbance ratios) (c) from bacterial pellets, with (blue) or without (yellow) prior freezing at -80°C for 24 hours (1mL/sample collected in stationary phase, OD ≈ 0.54). Results are based on six independent biological replicates per condition. (NS = not significant; Mann-Whitney test).

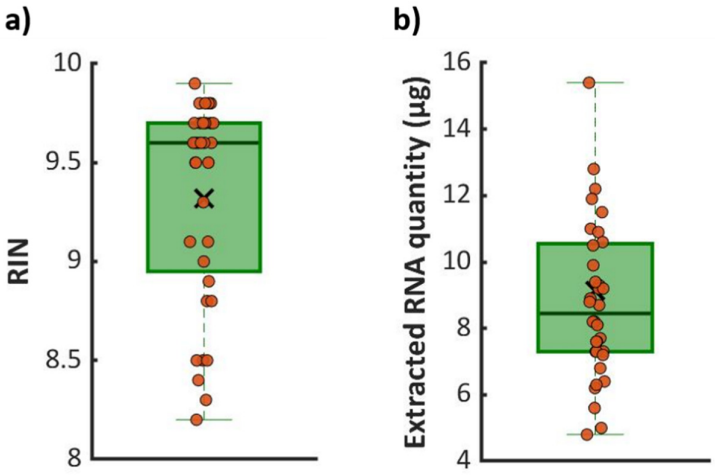


Fig. S2. Boxplots of RIN (a) and RNA yield (b) across all extracted samples (n = 36). The mean is indicated by a black cross. The box represents the interquartile range (IQR), spanning from the first quartile (Q1) to the third quartile (Q3), with the horizontal line inside the box denoting the median.
All samples met Novogene's sequencing requirements (RIN > 6; RNA yield > 300 ng).

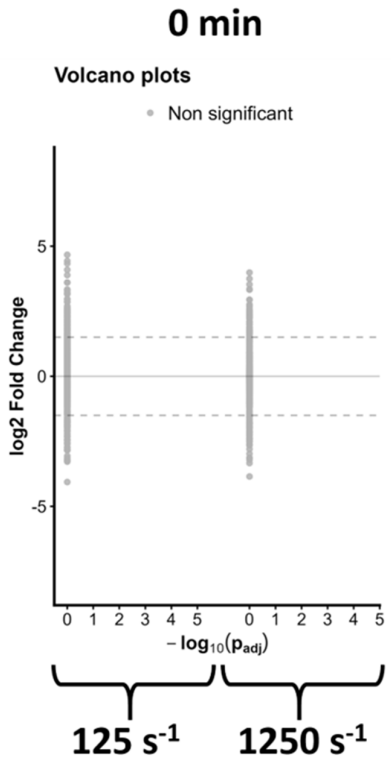


Fig. S3. Volcano plots of differentially expressed genes (DEGs) in *S. oneidensis* suspensions at time 0, comparing the inocula destined for shear rates of 125 s^{-1} and 1250 s^{-1} to the inoculum for the static condition (0s^{-1}). No DEGs were detected, confirming the similarity of starting inocula across all conditions (n = 3 biological replicates per group).

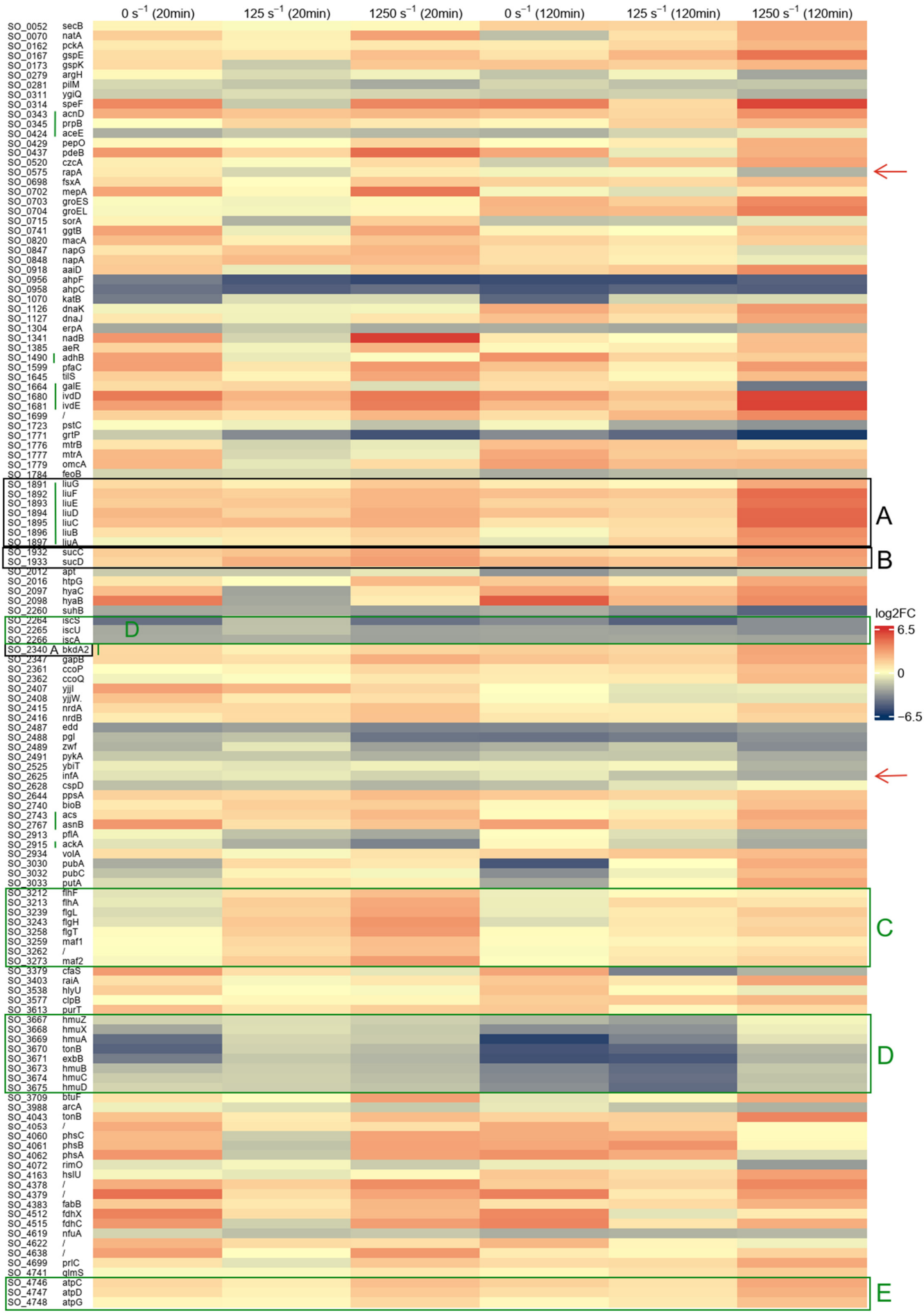

0 s−1 (20min)
125 s−1 (20min)
1250 s−1 (20min)
0 s−1 (120min)
125 s−1 (120min)
1250 s−1 (120min)
SO_0052 secB
SO_0070 natA
SO_0162 pckA
SO_0167 gspE
SO_0173 gspK
SO_0279 argH
SO_0281 pilM
SO_0311 ygiQ
SO_0314 speF
SO_0343 acnD
SO_0345 prpB
SO_0424 aceE
SO_0429 pepO
SO_0437 pdeB
SO_0520 czcA
SO_0575 rapA
SO_0698 fsxA
SO_0702 mepA
SO_0703 groES
SO_0704 groEL
SO_0715 sorA
SO_0741 ggtB
SO_0820 macA
SO_0847 napG
SO_0848 napA
SO_0918 aaiD
SO_0956 ahpF
SO_0958 ahpC
SO_1070 katB
SO_1126 dnaK
SO_1127 dnaJ
SO_1304 erpA
SO_1341 nadB
SO_1385 aeR
SO_1490 adhB
SO_1599 pfaC
SO_1645 tilS
SO_1664 galE
SO_1680 ivdD
SO_1681 ivdE
SO_1699 /
SO_1723 pstC
SO_1771 grtP
SO_1776 mtrB
SO_1777 mtrA
SO_1779 omcA
SO_1784 feoB
SO_1891 liuG
SO_1892 liuF
SO_1893 liuE
SO_1894 liuD
SO_1895 liuC
SO_1896 liuB
SO_1897 liuA
SO_1932 sucC
SO_1933 sucD
SO_2012 apt
SO_2016 htpG
SO_2097 hyaC
SO_2098 hyaB
SO_2260 suhB
SO_2264 iscS
SO_2265 iscU
SO_2266 iscA
SO_2340 A bkdA2
SO_2347 gapB
SO_2361 ccoP
SO_2362 ccoQ
SO_2407 yjjI
SO_2408 yjjW
SO_2415 nrdA
SO_2416 nrdB
SO_2487 edd
SO_2488 pgl
SO_2489 zwf
SO_2491 pykA
SO_2525 ybiT
SO_2625 infA
SO_2628 cspD
SO_2644 ppsA
SO_2740 bioB
SO_2743 acs
SO_2767 asnB
SO_2913 pflA
SO_2915 ackA
SO_2934 volA
SO_3030 pubA
SO_3032 pubC
SO_3033 putA
SO_3212 flhF
SO_3213 flhA
SO_3239 flgL
SO_3243 flgH
SO_3258 flgT
SO_3259 maf1
SO_3262 /
SO_3273 maf2
SO_3379 cfaS
SO_3403 raiA
SO_3538 hlyU
SO_3577 clpB
SO_3613 purT
SO_3667 hmuZ
SO_3668 hmuX
SO_3669 hmuA
SO_3670 tonB
SO_3671 exbB
SO_3673 hmuB
SO_3674 hmuC
SO_3675 hmuD
SO_3709 btuF
SO_3988 arcA
SO_4043 tonB
SO_4053 /
SO_4060 phsC
SO_4061 phsB
SO_4062 phsA
SO_4072 rimO
SO_4163 hslU
SO_4378 /
SO_4379 /
SO_4383 fabB
SO_4512 fdhX
SO_4515 fdhC
SO_4619 nfuA
SO_4622 /
SO_4638 /
SO_4699 prlC
SO_4741 glmS
SO_4746 atpC
SO_4747 atpD
SO_4748 atpG
A
B
C
D
D
E
log2FC
6.5
0
−6.5

Fig. S4. Heatmap analysis of upregulated and downregulated differentially expressed genes (DEGs) in *Shewanella oneidensis* suspensions across various time points and shear rates. Gene expression at time 0 was used as the reference. For visualization purposes, only DEGs with $|\log_2$ fold change$| > 2$ and $p < 0.05$ were included. Data represent $n = 3$ biological replicates per group. To aid interpretation, various symbols and boxed regions have been added. The legend is as follows:

Rectangles:

A : Leucine degradation pathway

B : Tricarboxylic acid (TCA) cycle

C : Motility via flagellar component synthesis

D : Heme capture and transport

E : ATP synthase complex

Green line: Genes involved in primary catabolic/degradation pathways.

Red arrow: Reduced transcriptional activity

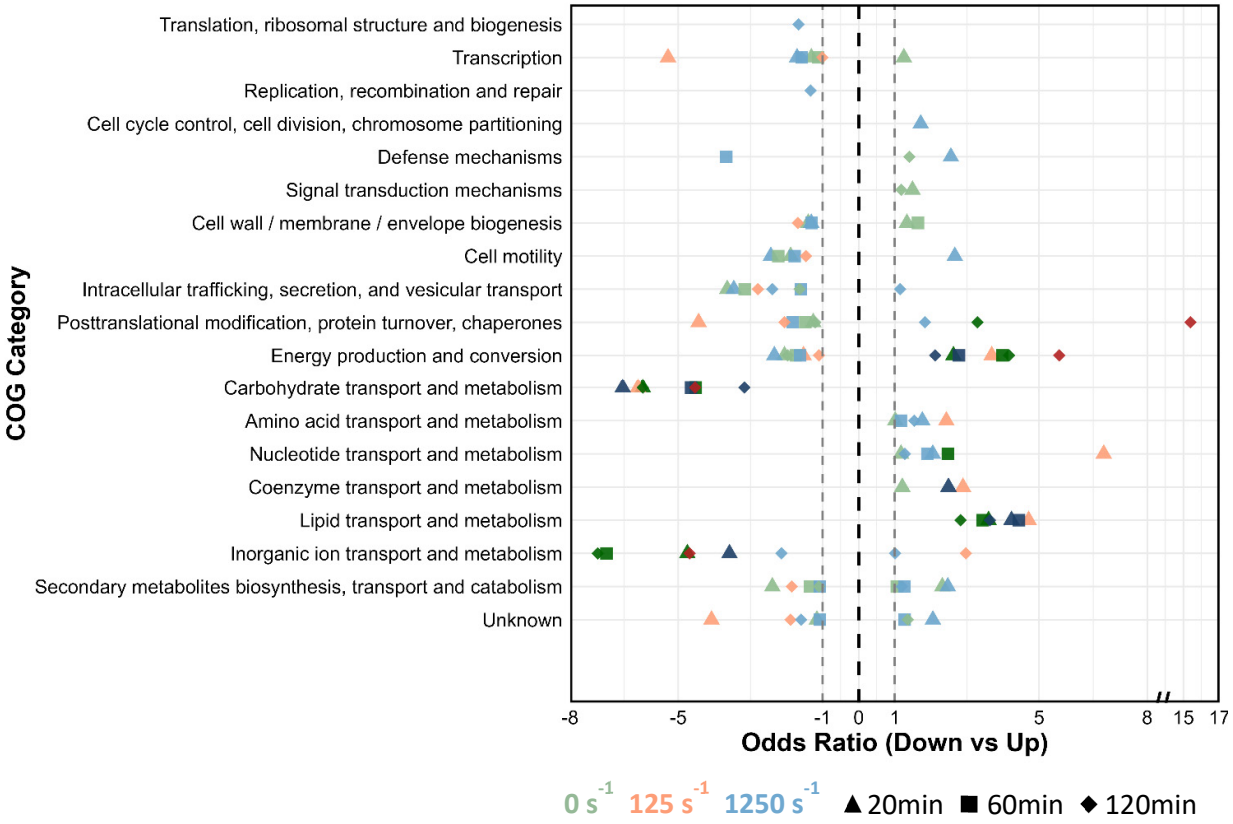


Fig. S5. COG category enrichment of differentially expressed genes (DEGs), identified by comparing each condition to its respective inoculum at 0 min, across all shear rates (color) and time points (shape). The x-axis represents the odds ratio: positive values indicate over-representation among upregulated DEGs, negative values among downregulated DEGs. Only categories with odds ratios beyond ±1 are shown. Statistical significance (Fisher's exact test, $p < 0.05$) is indicated by darker points, while lighter points represent non-significant enrichment.

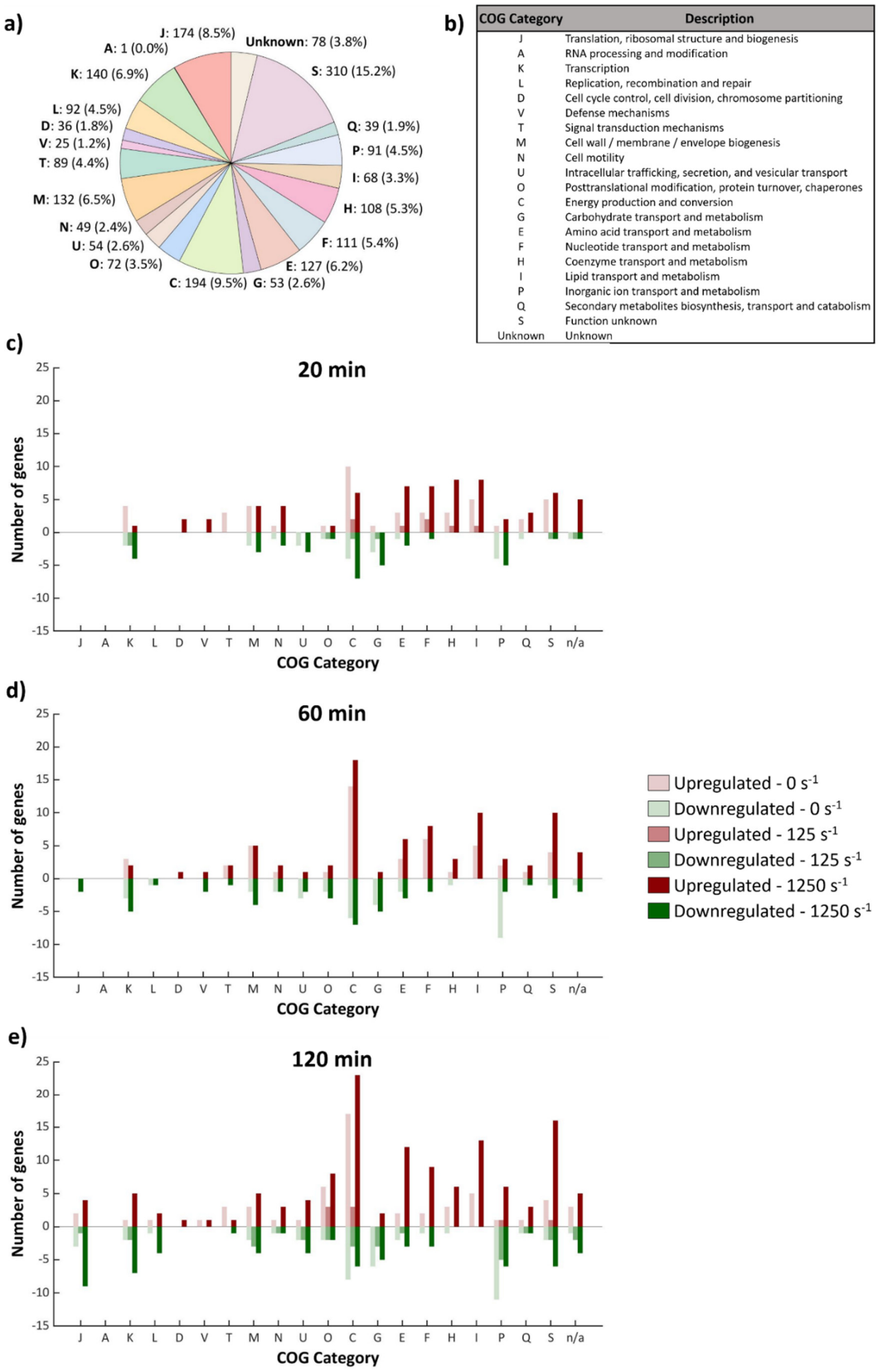


Fig. S6. a) Distribution of the complete background gene set (1,971 genes) of *S. oneidensis* across COG categories shown in b). This background includes all genes expressed at least once across all experimental conditions. (c-e) Number of upregulated (red) and downregulated (green) genes within each COG category at 20, 60 and 120 minutes under the different shear rates tested.

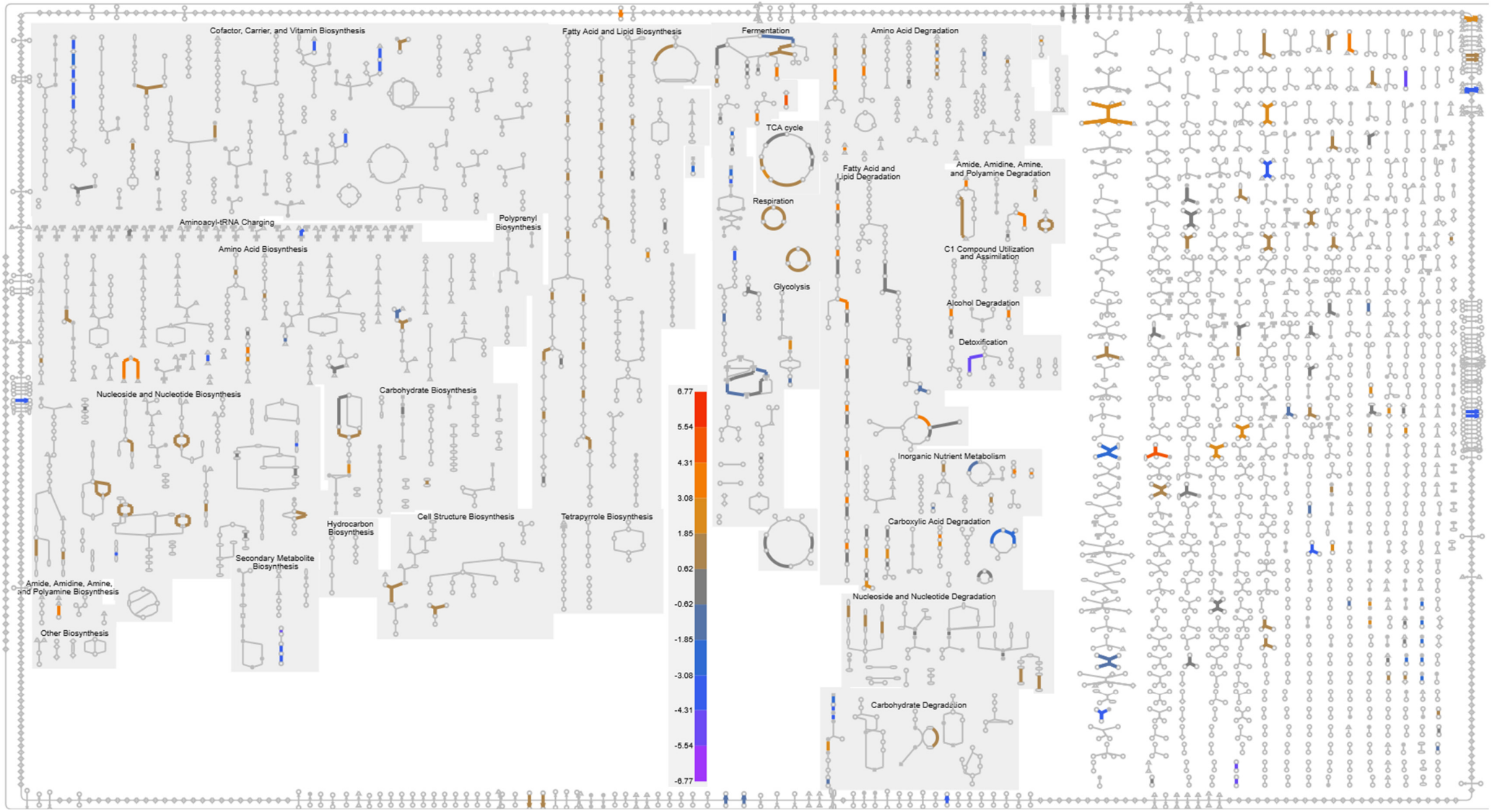


Fig. S7. Cellular overview of *Shewanella oneidensis* at 120 min under static conditions, highlighting differentially expressed genes (DEGs) mapped via BioCyc.

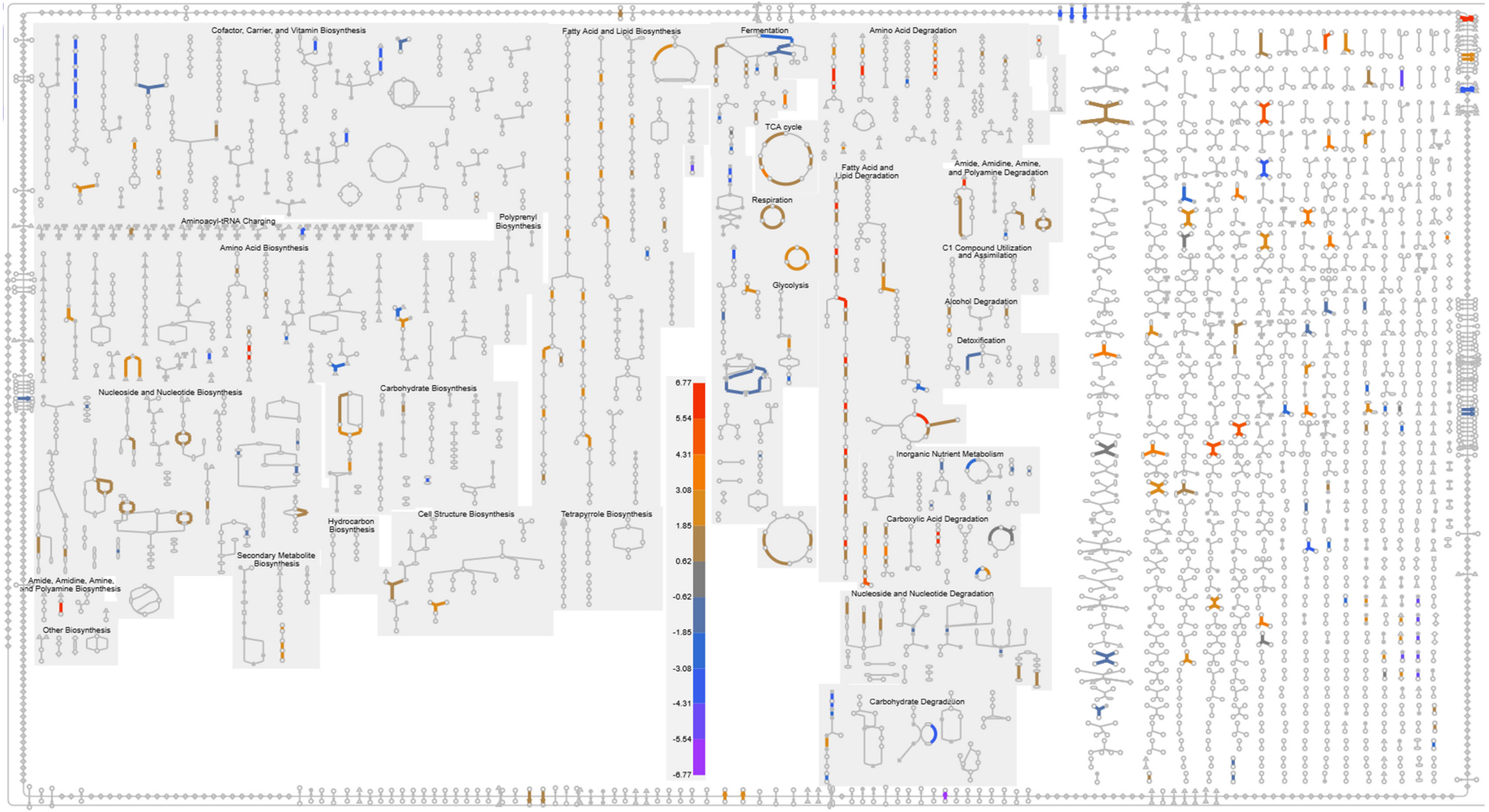


Fig. S8. Cellular overview of *Shewanella oneidensis* at 120 min under 1250 s^{-1} shear stress, highlighting differentially expressed genes (DEGs) mapped via BioCyc.

Conclusions

Au cours de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'influence du taux de cisaillement sur l'expression des gènes de *S. oneidensis*. Nous avons cherché à répondre à deux questions principales : d'une part, savoir si les conditions de cisaillement imposées entraînaient des modifications transcriptionnelles ; d'autre part, en cas de réponse positive, caractériser ces changements en identifiant les fonctions biologiques affectées et en analysant la nature de la réponse cellulaire. Les paragraphes suivants résument les principaux faits marquants obtenus :

- Dans un premier temps, et loin d'être triviale, cette étude a permis de développer une procédure fiable et reproductible d'extraction d'ARN bactérien, assurant à la fois la conservation des échantillons avant extraction, ainsi qu'une pureté, une intégrité et un rendement compatibles avec des analyses post-extraction telles que le séquençage. Cette procédure pourrait se populariser et être adoptée plus largement au sein du laboratoire, en cohérence avec l'essor important des approches « omics » dans la recherche microbiologique.
- Concernant la seconde partie de ce chapitre, l'influence du taux de cisaillement sur l'expression des gènes de *S. oneidensis* sous forme planctonique a été évaluée, permettant une analyse globale des variations transcriptionnelles survenant au cours de l'expérience. Très peu d'études se sont intéressées à cette question scientifique, et il convient de souligner que notre travail figure parmi les rares à adopter une approche aussi globale.
- Notre étude a révélé que le taux de cisaillement et le temps d'exposition induisent un remodelage transcriptionnel significatif. À titre d'exemple, 94 gènes étaient déjà différentiellement exprimés au bout de 20 minutes d'exposition sous fort cisaillement (1250 s^{-1}).
- La réponse transcriptionnelle la plus marquée a été observée au taux de cisaillement le plus élevé (1250 s^{-1}), tandis qu'au cisaillement intermédiaire (125 s^{-1}), elle était plus modeste, mais suivait globalement la même tendance. Un remodelage important a également été constaté à 0 s^{-1}, avec des gènes différentiellement exprimés spécifiques, probablement liés à des phénomènes de sédimentation et d'agrégation en l'absence de cisaillement, entraînant possiblement des variations locales en oxygène et en ressources.
- L'analyse des fonctions et des gènes impactés a révélé une réponse multifactorielle coordonnée, caractérisée par trois caractéristiques principales : 1) une reprogrammation métabolique favorisant la production d'énergie, 2) un ralentissement général de la transcription et de la traduction, ainsi que 3) l'activation de certains systèmes de réponse au stress, protéines chaperonnes et ou facteurs de stabilisation / mise en dormance des ribosomes. Ces observations suggèrent que le cisaillement déclenche une stratégie adaptative de réponse, avec une réallocation de l'énergie vers une stratégie de survie au détriment de la croissance.

- De plus, une réorganisation des voies d'acquisition du fer, avec activation de la putrescine (polyamine) et de la putrebactine (sidérophore), est détectée avec l'augmentation du cisaillement, ce qui peut refléter à la fois une réponse d'homéostasie cellulaire et une stratégie ciblée pour restaurer l'équilibre en fer.
- En parallèle, une *up-régulation* précoce des gènes liés à l'assemblage des flagelles a été observée sous flux, suggérant que la bactérie mobilise son énergie pour maintenir sa motilité. Cela pourrait lui permettre de s'échapper des zones à contraintes hydrodynamiques élevées ou de chercher des surfaces favorables à l'adhésion, contribuant ainsi à sa survie dans des environnements soumis à des contraintes hydrodynamiques.

CHAPITRE 6 :

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Préambule

Ces travaux de thèse ont permis de développer des approches basées sur le deep learning et la microscopie holographique pour étudier l'influence des conditions hydrodynamiques sur le transport et l'adhésion des bactéries, ainsi que d'explorer leur réponse physiologique à ce stress par transcriptomique. Ce chapitre vient conclure mon manuscrit en proposant une mise en perspective globale des développements méthodologiques réalisés et des principaux résultats acquis. Après avoir examiné les forces et les limites des approches mises en œuvre, nous aborderons certains aspects de nos résultats qui n'avaient pas encore été discutés et qui invitent à la réflexion, notamment, la définition de la motilité dans nos différentes approches, la « population » bactérienne interagissant avec la paroi, ainsi que le stimulus susceptible de déclencher la réponse transcriptionnelle sous cisaillement. Enfin une réflexion sur les limites de cette étude et les perspectives de recherche qu'elle ouvre sera intégrée tout au long de la discussion.

1 Approches méthodologiques implémentées

1.1 Une levée de verrous méthodologiques

Le suivi temporel d'une bactérie au sein d'un écoulement, ainsi que l'analyse de ses premières interactions avec les parois constituent un défi expérimental majeur. À la paroi, l'adhésion bactérienne pionnière est un processus rapide et dynamique (Alves *et al.*, 2020 ; Lecuyer *et al.*, 2011), caractérisé par des fréquences élevées d'attachement/détachement (Lecuyer *et al.*, 2011) et par d'éventuels déplacements à la paroi (Gomez *et al.*, 2023). Dans le volume (*bulk*), le suivi individuel s'avère encore plus complexe en raison des propriétés de nage des bactéries : des vitesses élevées ($V_{nage} \in [20 : 180]$ µm/s) (Armitage, 2024 ; Nakamura et Minamino, 2019) et des réorientations fréquentes et aléatoires ($< t_{run} > \sim 1$ s chez *E. coli*) (Berg et Brown, 1972 ; Darnige *et al.*, 2017 ; Molaei *et al.*, 2014). À ces dynamiques individuelles s'ajoute l'influence de la vitesse d'écoulement qui conditionne le transport des bactéries et leur probabilité d'atteindre, puis de s'ancrer à la paroi (Berne *et al.*, 2018; Busscher et Van Der Mei, 2006). Un second verrou méthodologique réside dans la forte variabilité des comportements au sein d'une même population. Cette hétérogénéité impose de disposer d'un échantillonnage bactérien large afin d'obtenir une description statistique fiable et représentative des comportements individuels.

Traditionnellement, les études consacrées à la colonisation bactérienne des surfaces reposent sur une quantification du nombre de bactéries adhérées à différents temps (Alves *et al.*, 2020 ; Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Chang *et al.*, 2020 ; Nejadnik *et al.*, 2008 ; Park *et al.*, 2011). Cette stratégie de quantification discontinue s'est révélée très pertinente pour évaluer l'affinité bactérie/surface en comparant différentes souches, différents facteurs bactériens (flagelle, pili) ou propriétés physico-chimiques des surfaces.

Néanmoins, cette approche reste limitée : elle ne renseigne que sur une cinétique globale d'adhésion et ne permet pas de décrire les dynamiques individuelles à la paroi (temps de résidence, orientation, déplacements à la paroi, transitions attachement / détachement). Certaines études (Lecuyer *et al*., 2011) ont cherché à pallier ces limitations au moyen d'approches time-lapse couplées à un traitement d'images soit : 1) manuel, méthode chronophage et dépendante de l'appréciation de l'opérateur, ou 2) automatisé, à l'aide de logiciels de traitement d'images tels qu'ImageJ. Néanmoins, dans le cas de suivi bactérien sur des séquences d'images, ces outils atteignent rapidement leurs limites dès que la qualité des images devient trop hétérogène (Jeckel et Drescher, 2021). À titre d'exemple, dans nos expériences, les fluctuations importantes de fluorescence et de contraste rendaient toute automatisation fiable impossible via ces approches traditionnelles. Face à ces différents verrous, notre avons développé une approche de détection basée sur le *deep learning*, spécifiquement entraînée pour identifier l'ensemble des bactéries interagissant avec la paroi. Cette approche s'est révélée robuste sur un panel d'images contrastées, avec une capacité de détection pouvant atteindre jusqu'à 800 bactéries par image, soit un échantillonnage représentatif et sans a priori : toutes les bactéries en contact avec la paroi étaient analysées.

Si les modèles de détection par *deep learning* connaissent un essor considérable dans le domaine scientifique, y compris en microbiologie pour le comptage automatisé de colonies, leur segmentation (délimitation précise de chaque objet) et leur classification (Abeyrathna *et al.*, 2022 ; Ferrari *et al*., 2017 ; Lugagne *et al.*, 2020 ; Ragi *et al*., 2021 ; Tamiev *et al*., 2020 ; Zhang *et al*., 2022), nous sommes à notre connaissance, les premiers à avoir implémenté une telle approche couplée à un suivi time-lapse. Cette méthodologie nous a permis de suivre individuellement chaque bactérie à la paroi et d'accéder à des paramètres clés de l'adhésion bactérienne pionnière : temps de résidence, orientation ou déplacement à la paroi. Ces paramètres sont peu étudiés dans la littérature, soulignant l'apport de notre approche et ouvrant la voie à une compréhension plus fine des étapes initiales de la colonisation bactérienne.

De même, le suivi du comportement individuel des bactéries dans un volume est confronté à des limitations instrumentales et expérimentales supplémentaires. Des travaux pionniers utilisant des techniques de microscopie (contraste de phase, lumière blanche, épifluorescence) pour étudier le comportement des bactéries motiles proche des parois, ont révélé un couplage complexe entre la nage et l'écoulement, avec des effets non triviaux tels qu'une accumulation des bactéries motiles proche des parois, de la nage à contre-courant ou encore des modifications des trajectoires (Berke *et al*., 2008 ; Clément *et al*., 2016 ; Elius *et al*., 2023 ; Kaya et Koser, 2012 ; Lauga, 2016 ; Marcos *et al*., 2012 ; Rusconi *et al.*, 2014). Cependant, la faible profondeur de champ de ces méthodes limite l'analyse à des trajectoires à deux dimensions (plan focal) (Dubay *et al*., 2023 ; Palma *et al*., 2022) et l'absence de la composante en profondeur (z dans nos données) crée des biais importants dans la reconstruction des trajectoires (vitesses, angles de réorientation) (Taute *et al*., 2015). Cela souligne la nécessité de développer des méthodologies résolues spatialement en trois dimensions et temporellement (Dubay *et al*., 2023).

Quelques approches ont été proposées, notamment des systèmes reposant sur une focalisation continue, dans lesquels une boucle de rétroaction maintient en permanence une bactérie unique dans le plan focal (Berg et Brown, 1972 ; Berg, 1971 ; Darnige *et al*., 2017). Ces méthodes, bien que très précises, restent néanmoins limitées au suivi d'une bactérie à la fois dans des suspensions extrêmement diluées.

Pour conserver cette résolution 3D tout en permettant le suivi simultané d'un nombre élevé de bactéries, la microscopie holographique constitue une solution pertinente (Dubay *et al*., 2023). Après une phase d'optimisation du traitement des hologrammes réalisée en amont de mon travail (Becker *et al*., 2024), nous avons adapté la méthode de microscopie holographique pour permettre le suivi 3D de l'ensemble des trajectoires bactériennes dans le volume de notre système microfluidique. Cette approche s'est révélée fiable pour l'analyse simultanée d'une centaine de bactéries, y compris sous écoulement, jusqu'à des vitesses maximales de 1000 µm/s (cisaillement à la paroi de 20 s^{-1}), ce qui constitue un défi technique important. Notons en effet que notre étude compte parmi les premières à implémenter l'holographie en conditions d'écoulement, une approche jusqu'ici seulement explorée par Molaei et Sheng (2016). De surcroît, elle se distingue par le nombre total élevé de bactéries analysées. Cette méthodologie a permis d'accéder à des paramètres clés du transport bactérien en volume : trajectoires, vitesses instantanées, orientations, coefficients de diffusion translationnelle et rotationnelle, ainsi qu'à une classification des bactéries selon leur mécanisme dominant de transport (convection, diffusion, motilité). Malgré une littérature théorique et numérique abondante (Elgeti *et al*., 2015 ; Ezhilan et Saintillan, 2015 ; Ganesh *et al*., 2023 ; Junot *et al*., 2019), les études expérimentales sur le transport bactérien sous flux restent rares (Darnige *et al*., 2017 ; Figueroa-Morales *et al*., 2020 ; Junot *et al*., 2019 ; Mathijssen *et al*., 2019 ; Molaei *et al*., 2014 ; Molaei et Sheng, 2016 ; Torres Maldonado *et al*., 2024). Nos résultats viennent renforcer ces quelques études expérimentales et nous ont permis de les confronter aux prédictions théoriques existantes du modèle de Ezhilan et Saintillan (2015) (chapitre 4).

1.2 Limites des approches développées

Ces développements méthodologiques du suivi du comportement dynamique des bactéries en 2D comme en 3D ne sont pas exempts de limites qu'il convient de souligner.

En ce qui concerne l'approche par *deep learning*, la principale limite réside dans sa faible transposabilité à d'autres systèmes expérimentaux. Le modèle a en effet été spécifiquement entraîné pour reconnaître des bacilles fluorescents verts de taille et de morphologie caractéristiques, dépendantes à la fois de la souche utilisée et des conditions d'imagerie. Cette spécialisation, indispensable pour atteindre une détection fiable dans notre contexte, restreint son utilisation directe pour d'autres morphologies cellulaires, d'autres marqueurs fluorescents ou d'autres configurations microscopiques (grossissement, résolution, filtres d'émission/excitation). Dans ces conditions, un réentraînement partiel ou complet du modèle serait indispensable. Par ailleurs, cette méthode, particulièrement adaptée au suivi de cellules individuelles, voit ses performances diminuer dès que la colonisation progresse et que des regroupements

cellulaires apparaissent à la paroi. Cette perte de performance résulte de la labellisation et de l'apprentissage effectués uniquement sur des cellules isolées. Une autre stratégie de labellisation devrait être mis en place pour permettre l'étude des étapes ultérieures de colonisation, où des phénomènes d'expansion et de regroupement cellulaire en amas à la paroi se mettent en place.

Par ailleurs, l'utilisation d'une souche exprimant constitutivement une protéine fluorescente (gfp^+) peut également être discutée. L'excitation répétée sous microscope nécessaire aux enregistrements entraîne en effet du photoblanchissement (Demchenko, 2020 ; Dubay *et al*., 2023 ; Sinnecker *et al.*, 2005), qui réduit l'intensité du signal de fluorescence et limite la durée de suivi fiable (ici, 15 minutes environ). Par ailleurs, il ne faut pas négliger que l'exposition prolongée à la lumière d'excitation pourrait induire des dommages cellulaires (diminution de la motilité, production d'espèces réactives de l'oxygène, stress oxydatif, voire toxicité) comme cela a été démontré dans la littérature (Cheong *et al.*, 2015 ; Gomelsky et Hoff, 2011 ; Lipovsky *et al*., 2010). De plus, l'expression constitutive d'une protéine fluorescente impose un coût métabolique à la cellule, qui pourrait modifier sa physiologie (Knodler *et al*., 2005 ; Leff et Leff, 1996 ; Rang *et al*., 2003 ; Virgile *et al*., 2019) et même impacter sa dynamique à la paroi, d'autant plus que nos conditions expérimentales étaient stringentes (20°C et milieu $LB_{1/10}$).

La méthode par holographie s'est quant à elle révélée très robuste pour l'obtention des trajectoires bactériennes en 3D, avec une résolution spatiale et temporelle élevée. Néanmoins, elle présente certaines limites, notamment pour la localisation des bactéries proches des parois, qui s'avère plus difficile que dans le *bulk*. Cette difficulté résulte d'une part d'un contraste optique réduit entre la paroi en verre et le milieu environnant, ce qui complique l'identification précise des surfaces et peut induire des erreurs de localisation (Dubay *et al*., 2023 ; Farthing *et al*., 2017 ; Tai *et al*., 2023 ; Wang *et al*., 2020a). D'autre part, près des parois, l'image jumelle (copie virtuelle symétrique de l'objet) générée lors de la rétropropagation de l'hologramme (Latychevskaia et Fink, 2007 ; Picart *et al*., 2015) peut être interprétée comme des bactéries, compliquant le réglage précis de la localisation de la paroi.

Une autre limite de l'holographie concerne le temps de passage des bactéries dans le volume observé qui diminue à mesure que le débit augmente, entraînant de fait des trajectoires bactériennes de plus en plus courtes, avec le risque de diminuer la fiabilité des analyses. Nous avons, à titre exploratoire, réalisé des tests jusqu'à 50 s^{-1} mais les trajectoires étaient trop courtes pour des analyses complètes précises et n'ont pas pu être traitées. La fréquence maximale de la caméra nous limitait également en termes de nombre de points de mesure disponibles. Pour améliorer cela, augmenter la zone d'observation en passant à un grossissement plus faible, comme dans les travaux de l'équipe de Molaei (Molaei *et al*., 2014 ; Molaei et Sheng, 2016, 2014), permettrait de quadrupler la surface observée, mais diminuerait la résolution, compliquant la détection bactérienne. Cela augmenterait également le volume de données et le temps de traitement, nécessitant une puissance de calcul accrue.

De plus, la méthode présente également des limites à forte concentration bactérienne : comme nous l'avons observé dans le capillaire de 50 µm, lorsque les bactéries sont très rapprochées, l'algorithme de suivi ne peut plus les distinguer de manière fiable. Cela limite l'analyse des comportements collectifs et des interactions bactériennes. Une adaptation du montage vers l'holographie *off-axis*, avec un bras de référence séparé, pourrait améliorer la détection individuelle, mais introduirait de nouvelles contraintes liées à la complexité du système expérimental et à une sensibilité accrue aux vibrations (Wang *et al.*, 2022 ; Kumar et Hong, 2025).

Enfin, certaines limites sont communes aux deux approches. Ces méthodes nécessitent un accès optique ce qui ne peut être transposé à tous les systèmes expérimentaux. De plus, elles impliquent un post-traitement des images ou des hologrammes enregistrés, qui est d'autant plus long que les données générées sont importantes. Enfin, ces approches demandent une expertise avancée en programmation (Dubay *et al.*, 2023). Par exemple l'implémentation des logiciels de détection et de suivi pour l'holographie n'aurait pas été possible sans les compétences de Simon Becker du LEMTA.

1.3 Perspectives à plus long terme

Les approches que nous avons développées pourraient être étendues pour suivre le devenir des bactéries pionnières à la paroi et la dynamique de primo-clusterisation sous flux. Cette perspective nécessiterait des ajustements méthodologiques, tels qu'une nouvelle stratégie de labellisation pour le *deep learning* (suivi automatisé et caractérisation des clusters à la paroi) et l'adaptation de l'holographie à une configuration *off-axis*, couplée à une motorisation de la platine (pour travailler à des concentrations bactériennes plus élevées et sur un volume d'observation plus conséquent). Ces outils pourraient permettre d'explorer le développement dynamique des amas bactériens, leur évolution morphologique sous flux, ainsi que l'interaction de nouvelles bactéries avec ces clusters en termes de transfert et d'adhésion.
En holographie, la motorisation de la platine offrirait également la possibilité d'analyser le transport bactérien sur des durées prolongées, ouvrant la voie à l'étude des propriétés de dispersion de la suspension bactérienne dans des milieux confinés.

2 Motilité bactérienne ? Une définition à la frontière du physique et du biologique

Les résultats obtenus dans le capillaire sous flux (chapitre 4) montrent que la proportion de bactéries considérées comme motiles diminue fortement avec l'augmentation du flux, pour tendre vers 0 % pour des cisaillements à la paroi testés allant jusqu'à 20 s^{-1}, voire 50 s^{-1} (résultats non présentés).

À première vue, cette observation contraste avec les données transcriptomiques obtenues pour des cisaillements plus élevés (125 et 1250 s^{-1}) (chapitre 5) qui indiquent une induction des gènes du système flagellaire. Cela pourrait a priori indiquer une possible synthèse du flagelle et une augmentation potentielle de la proportion de bactéries motiles sous flux. Ces faits nous invitent à reconsidérer la définition même de la « motilité » dans nos deux approches expérimentales. Dans l'étude du transport bactérien (chapitre 4), la motilité a été définie selon une approche physique et fonctionnelle. C'est la capacité d'une bactérie à produire un mouvement autonome, détectable et distinct d'un transport purement convectif (tel que celui observé chez la souche ΔFla), dans un environnement soumis à un écoulement. En d'autres termes, la motilité est évaluée comme un mouvement effectif. À l'inverse, dans l'approche transcriptomique, la motilité est appréhendée selon une approche biologique, elle correspond à l'activation des gènes impliqués dans l'assemblage et le fonctionnement du flagelle. Cette définition traduit un potentiel de motilité, et non l'expression physique d'un mouvement. Ces nuances permettent de lever pour partie la contradiction soulevée. Dans le capillaire, il est fortement probable que certaines bactéries considérées comme convectées possèdent en réalité un flagelle fonctionnel, mais que celui-ci soit incapable de produire une propulsion détectable et un mouvement propre lorsque les forces hydrodynamiques deviennent prépondérantes. De plus, l'augmentation du débit réduit le temps de passage de la bactérie dans le volume d'observation, ce qui expérimentalement, limite notre capacité à détecter un déplacement autonome (la motorisation de la platine est en cours d'étude de faisabilité pour améliorer ce point). Dans ce contexte, l'absence de motilité effective ne signifie pas une absence de motilité potentielle, comme le montre le rebond rapide du pourcentage de bactéries motiles après arrêt du flux (figure 13 chapitre 4) (passant à nouveau à 70 %), ce qui suggère que l'équipement flagellaire est conservé chez la plupart des bactéries « convectées », mais masqué sous flux, et conduisant à un mouvement indiscernable de celui de particules passives.

Dans notre étude transcriptomique, les résultats indiquent qu'une fraction importante de la population bactérienne s'engage biologiquement dans un programme de motilité en réponse au flux, mais ne permettent pas de confirmer si cela aboutit à un déplacement effectif. Le flagelle pourrait être en cours d'assemblage, sans fonctionnalité ni mouvement réel. Des travaux récents ont mis en évidence que l'assemblage des flagelles bactériens suit un modèle dit « d'injection diffusion » (Chen *et al*., 2017 ; Renault *et al*., 2017) avec des vitesses d'élongation comprises entre 10 et 100 nm/min, nécessitant environ 1 à 1,5 heure pour être complet chez *Salmonella* et *E. coli* (Renault *et al*., 2017). Une fois que son flagelle atteint environ 2,5 µm, il peut devenir fonctionnel (Halte *et al*., 2025), ce qui, avec la vitesse d'assemblage, suggère qu'il faudrait entre 25 et 50 minutes pour que la bactérie puisse se déplacer activement. Enfin, l'hypothèse d'un arrachement répétitif du flagelle sous cisaillement et de son renouvellement constant est peu probable compte tenu de la dynamique d'activation des gènes observée, qui indique une réponse transcriptionnelle rapide à l'exposition au cisaillement, puis une diminution une fois la synthèse terminée.

Ainsi, les observations issues de ces deux chapitres ne renseignent pas sur la même dimension de la motilité bactérienne et ne constituent pas une contradiction mais révèlent une sorte de décorrélation entre motilité potentielle et motilité effective. Sous cisaillement, la cellule activerait son programme flagellaire (motilité potentielle), mais demeurerait majoritairement entrainée par le flux (absence de motilité effective) en raison des contraintes physiques dominantes. Cela soulève la question de la fonction du flagelle sous fort cisaillement, et de ses bénéfices, point qui sera exploré au paragraphe 3 ci-dessous.

Ces résultats démontrent l'importance d'étudier ces deux aspects afin d'obtenir une compréhension plus complète de l'influence du cisaillement sur la motilité. Plusieurs approches complémentaires pourraient être envisagées : d'une part, des analyses préalables des suspensions bactériennes par holographie pour quantifier la proportion de bactéries motiles. D'autre part, des approches moléculaires et génétiques pouvant inclure : 1) des études protéomiques ciblant les gènes flagellaires (Holtappels *et al.*, 2015 ; Islam *et a*l., 2014 ; Resch *et al.*, 2006), 2) L'utilisation d'un gène rapporteur fluorescent, sous le contrôle d'un promoteur flagellaire tels que fliC pour identifier les cellules engagées dans la production d'un flagelle fonctionnel. (Kalir *et al.*, 2001 ; Lyu *et al.*, 2021 ; Zarkani *et al.*, 2020), 3) Le marquage direct du flagelle, soit par fluorochromes spécifiques tels que le NanoOrange (Grossart *et al.*, 2000), soit par fusion d'une protéine du système flagellaire à une sonde fluorescente (Barlag *et al.*, 2016 ; Dunn *et al.*, 2024 ; Klein *et al.*, 2012 ; Koike *et al.*, 2011 ; Morimoto *et al.*, 2010), avec le risque néanmoins de perturber la fonction du flagelle (Koike *et al.*, 2011 ; Morimoto *et al.*, 2020). La mise en place d'une de ces stratégies permettrait d'établir un lien entre motilité effective et potentielle. Mais également d'identifier les cisaillements critiques au-delà desquels la motilité effective s'efface au profit du transport convectif.

3 Quelles bactéries atteignent la paroi ?

Notre objectif initial était de développer des approches expérimentales permettant d'établir un continuum entre le transfert des bactéries du bulk vers la paroi et leur comportement sur cette dernière. Nous souhaitions identifier quelles bactéries atteignent la paroi, en termes de position dans le capillaire, de trajectoires et de type de transport (diffusion, sédimentation, convection ou motilité), ainsi que de déterminer si l'histoire et le comportement des bactéries dans le bulk influencent leur comportement une fois arrivées à la paroi.

Nous n'avons pas pu atteindre cet objectif. Premièrement car le traitement des hologrammes par division de l'hologramme moyen, nécessaire pour compenser le faible signal de diffraction des bactéries, supprime la composante continue (statique) du signal. Ainsi, une bactérie qui adhère à la paroi au début de l'enregistrement par holographie et qui y reste est considérée comme immobile et disparaît du signal, ce qui complique son suivi.

La seconde et principale limite réside dans l'échelle de temps des phénomènes étudiés. Le transfert à la paroi est un évènement très rapide (de l'ordre de la seconde), nécessitant une résolution temporelle élevée et qui conduit à l'acquisition de films courts (moins d'une minute) à haute fréquence. À l'inverse, l'étude de l'adhésion à la paroi nécessite d'observer des comportements sur plusieurs minutes. Ce décalage d'échelle constitue un verrou méthodologique. Une bactérie qui arrive à la paroi et repart presque immédiatement pourra être détectée par holographie ; alors qu'une bactérie qui s'y fixe ne pourra pas être suivie sur la totalité de son temps de résidence. L'enregistrement de films d'hologrammes successifs ou plus longs pourrait être proposé, mais l'identification d'une même bactérie d'un film à l'autre serait risquée, et des films plus longs généreraient des volumes de données et des besoins en calcul plus importants. Malgré ces limites méthodologiques, certains faits expérimentaux obtenus nous permettent de formuler des hypothèses sur les questions initiales proposées : **quelles bactéries atteignent la paroi, par quels mécanismes, et quelle est leur dynamique une fois à la paroi ?**

Concernant le transfert à la paroi, nos observations holographiques montrent qu'avec l'augmentation de l'intensité de l'écoulement, les bactéries sont majoritairement entraînées à la manière de particules passives, ce qui limite leur accès à la paroi. C'est le phénomène de *shear trapping* (Ezhilan et Saintillan, 2015), qui aligne les bactéries avec les lignes de courant plus rapidement qu'elles ne peuvent se déplacer perpendiculairement pour traverser le capillaire et atteindre une paroi (Junot *et al*., 2019 ; Kaya et Koser, 2012 ; Kim *et al*., 2022 ; Mathijssen *et al*., 2019). En conséquence, seules les bactéries circulant suffisamment proche des parois au sein de la couche limite, où les vitesses sont faibles mais le gradient de cisaillement élevé, peuvent potentiellement entrer en contact avec la surface et s'y ancrer via différents mécanismes : interactions hydrodynamiques et phénomènes d'aspiration à la paroi (Berke *et al*., 2008 ; Clément *et al*., 2016 ; Drescher *et al*., 2011 ; Mazza, 2016), sédimentation (Wan *et al*., 1995 ; Li *et al*., 2011b ; Hogan *et al*., 2023) ou diffusion (Busscher et Van Der Mei, 2006). La possession d'un flagelle peut également faciliter l'accès des bactéries à la paroi (Aufrecht *et al*., 2019 ; Berne *et al*., 2018, 2015 ; McClaine et Ford, 2002). Cependant, au-delà d'un certain seuil de cisaillement, l'adhésion des bactéries motiles et non motiles devient comparable (Secchi *et al*., 2020). Cette observation suggère qu'indépendamment de leur motilité, le cisaillement dicte à la fois le transfert vers les parois et la capacité des bactéries à s'y maintenir, en contrôlant leur capacité à développer des interactions suffisamment fortes avec la paroi. Des mesures des forces d'interaction entre la bactérie et la paroi via des mesures de microscopie à force atomique (AFM) constitueraient un complément pertinent à nos données. Elles permettraient : 1) d'établir des liens entre les temps de résidence mesurés à la paroi, le cisaillement subi et les forces d'adhésion développées par les bactéries au cours du temps ; 2) d'identifier des seuils à partir desquels l'adhésion devient durable ou, au contraire, à partir desquels le cisaillement empêche l'adhésion.

Concernant les résultats de l'adhésion pionnière, et compte tenu de ce qui précède, il est raisonnable de considérer que les bactéries analysées en time-lapse constituent un mélange de bactéries flagellées et non flagellées, dont la proportion reste toutefois inconnue. À fort cisaillement (1250 s^{-1}), il est probable que l'effet du cisaillement domine sur une éventuelle motilité, et qu'il soit à l'origine de la forte dynamique observée à la paroi que les bactéries soient flagellées ou non. À cisaillement intermédiaire (125 s^{-1}), nous avons observé une proportion plus importante de bactéries dites sédentaires, c'est-à-dire restant plusieurs minutes à la paroi (10 % restent plus de 5 minutes, contre 1 % à 1250 s^{-1}). Nous avons également montré que les bactéries qui restent plus longtemps à la paroi, se déplacent plus à la paroi : environ 10 % des bactéries à 125 s^{-1} parcourent plus de 20 µm à la paroi. Nous émettons l'hypothèse qu'une partie de ces bactéries plus sédentaires pourrait être flagellée. La présence d'un flagelle pourrait en effet favoriser la formation de points de contact supplémentaires avec la paroi (Berne *et al*., 2018) ou la détection de la surface par mécanosensing (Belas, 2014 ; Kimkes et Heinemann, 2020). Ces mécanismes renforceraient l'ancrage et le maintien à la paroi et contribueraient aux déplacements observés. Le flagelle peut en effet aussi faciliter l'exploration locale de la paroi (Friedlander *et al*., 2013), que ce soit pour rechercher des microcavités sur la surface du verre, se rapprocher d'autres bactéries ou au contraire contourner des zones défavorables à l'adhésion (« *blocking area* ») (Busscher et Van Der Mei, 2006 ; Camesano et Logan, 1998 ; Lu *et al*., 2013). Ces déplacements pourraient également permettre à la bactérie de se réorienter dans une configuration hydrodynamique plus stable, notamment en s'alignant dans le sens du flux afin de réduire sa surface exposée au flux (Liu *et al*., 2011 ; Palalay *et al*., 2023 ; Xu *et al*., 2021).

Néanmoins, à ce stade, nous ne sommes pas en mesure d'attribuer ces comportements plus sédentaires et plus mobiles à la paroi à la présence d'un flagelle. En effet, il est possible que d'autres phénomènes, tels que la motilité par *twitching* associée aux pili de type IV présents chez *Shewanella* (Bouhenni *et al*., 2010), interviennent bien qu'aucune étude à notre connaissance n'ait confirmé ce mode de motilité chez cette espèce. Ou encore que ces déplacements correspondent à un mécanisme de type « *stick-and-roll* » décrit chez *E. coli* sous écoulement (Thomas *et al.,* 2004), où les bactéries roulent le long des surfaces, entraînées par le flux tout en maintenant un contact continu avec la paroi grâce à leurs fimbriae. Cette dernière hypothèse est cohérente avec nos conditions de fort cisaillement, où les déplacements observés s'effectuent exclusivement dans le sens du flux. En revanche, elle l'est moins au cisaillement de 125 s^{-1}, où ils s'effectuent dans toutes les directions du plan x-y, suggérant un mouvement actif initié par la bactérie.

Cette question reste donc ouverte et nécessite de reproduire les essais d'adhésion avec la souche ΔFla, afin de déterminer si le comportement observé à la paroi dépend effectivement de la présence du flagelle. Par comparaison avec les résultats déjà acquis, la mesure du flux à la paroi des bactéries sans flagelle permettrait d'évaluer l'influence de ce dernier sur le transfert en fonction du cisaillement. Et pourquoi ne pas envisager, en ajustant notre modèle de *deep learning* et en employant des gènes rapporteurs ciblant le flagelle, un suivi simultané et discriminé à la paroi des populations avec et sans flagelle ?

4 Quel stimulus déclenche la réponse cellulaire sous fort cisaillement ?

L'analyse transcriptomique réalisée au cours de ce travail a révélé une réponse multifactorielle et coordonnée sous fort écoulement. Celle-ci se caractérise notamment par une reprogrammation métabolique favorisant la production d'énergie et une régulation précoce des gènes impliqués dans l'assemblage flagellaire. L'activation de ces différentes réponses sous écoulement a été discutée au chapitre 5, néanmoins elle soulève une question fondamentale peu discutée jusqu'à présent. **Quel signal physique ou chimique les bactéries perçoivent-elles sous flux pour initier cette cascade transcriptionnelle ?**

Une première hypothèse repose sur la détection mécanique des forces hydrodynamiques imposées par le flux. Les bactéries possèdent des canaux mécanosensibles (MS), MscL (*Mechanosensitive channel of Large conductance*) et MscS (*Mechanosensitive channel of Small conductance*) qui leur permettent de détecter directement les changements de tension ou de pression de la membrane plasmique. Ces canaux jouent le rôle de soupapes de sécurité (Booth *et al.*, 2007 ; Cox *et al.*, 2018 ; Flegler *et al.*, 2021 ; Goodman *et al.*, 2023 ; Haswell *et al.*, 2011 ; Wang et Blount, 2023). Bien qu'initialement étudiés dans le contexte de l'osmorégulation bactérienne (Booth *et al.*, 2007), ces canaux sont également impliqués dans la régulation des stress mécaniques liés à des contraintes hydrodynamiques chez les eucaryotes, comme le suggèrent des travaux de simulation numérique (Heureaux *et al.*, 2014 ; Pak *et al.*, 2015 ; Peng *et al.*, 2016). La forte conservation des canaux mécanosensibles dans le monde vivant (Peyronnet *et al.*, 2014) laisse supposer que ce mécanisme est partagé chez les bactéries, bien que la démonstration expérimentale demeure complexe. Par ailleurs, le lien entre les gènes codant pour divers canaux MS (Edwards *et al.*, 2012 ; Levina, 1999) et leur rôle physiologique reste encore à déterminer.

D'autres mécanismes moléculaires de mécanosensation chez les bactéries, tels que ceux impliqués dans la reconnaissance des surfaces (Gordon et Wang, 2019 ; Wheeler *et al.*, 2019) peuvent activer des cascades de régulation transcriptionnelle :

- Via des déformations de l'enveloppe cellulaire, perçues comme un stress mécanique par les systèmes à deux composantes tels que Cpx ou BaeSR (Berne *et al.*, 2018 ; Kimkes et Heinemann, 2020).
- Via l'entrave mécanique de la rotation du flagelle qui active également des voies de signalisation telles DegS-DegU (Belas, 2014 ; Caiazza *et al.*, 2007 ; Cairns *et al.*, 2013 ; Gordon et Wang, 2019 ; Laventie et Jenal, 2020 ; Merritt *et al.*, 2007 ; Schniederberend *et al.*, 2019).
- Via le recrutement de stators au niveau du moteur flagellaire, qui joue un rôle de mécanosenseur pour compenser l'augmentation de la charge mécanique en réponse à une augmentation de la viscosité du milieu (Lele *et al.*, 2013 ; Tipping *et al.*, 2013).

Cependant, l'étude de Sanfilippo *et al.* (2019) apporte une distinction fondamentale entre la nature du signal perçu par la bactérie : elles répondent au taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$, paramètre cinématique) plutôt qu'à la contrainte de cisaillement τ (avec $\tau = \eta\,\dot{\gamma}$ avec η la viscosité du fluide). Ils ont identifié chez *P. aeruginosa* exposé à différentes combinaisons de taux et de contraintes de cisaillement, un opéron (« fro ») dont l'expression est spécifiquement induite par le taux de cisaillement, indépendamment de la contrainte mécanique appliquée. Des travaux complémentaires réalisés au sein de la même équipe (Padron *et al.*, 2023b) démontrent aussi que l'augmentation du taux de cisaillement accentue la sensibilité des bactéries au stress oxydatif induit par H_2O_2, ce qui active les gènes de défense correspondants (*katB*, *ahpB*, *ahpCF*...).

Cette réponse, liée à une accumulation intracellulaire de H_2O_2 résulte probablement du renouvellement rapide du micro-environnement local de la cellule sous flux. Cela modifie la chimie de son voisinage immédiat, un aspect rarement pris en compte dans les études réalisées sous flux. Dans nos expériences, le milieu $LB_{1/10}$ neuf contient du H_2O_2 ($\sim 0{,}9\ \mu M$) (Padron *et al*., 2023b) pouvant suggérer une certaine accumulation de H_2O_2 sous flux, en accord avec la légère induction de *katB* observée. Toutefois, nous ne savons pas si un opéron équivalent à *fro,* encore peu caractérisé, est présent chez *S. oneidensis*, ce qui laisse penser que d'autres signaux chimiques ou mécanismes pourraient intervenir. La réponse induite par le flux apparaît donc comme multifactorielle, les bactéries percevant des signaux mécaniques et chimiques liés aux perturbations locales de leur microenvironnement. La perception du flux demeure donc une problématique complexe, car les mécanismes de transduction restent largement inconnus. De plus, les approches expérimentales actuelles permettent généralement d'identifier qu'une partie des signaux impliqués, rendant difficile l'élaboration d'un schéma mécanistique complet.

Nos travaux et les études expérimentales actuellement limitées sur le *sensing* du flux par les bactéries ouvrent des perspectives intéressantes, notamment via l'utilisation de méthodes d'électrophysiologie ou de mutants de ces canaux mécanosenseurs, associées à une approche transcriptomique. Dans le 1e cas, la procédure, complexe, comprendrait :

1) la génération de sphéroplastes de *S. oneidensis* nécessaire pour atteindre la membrane plasmique où se trouvent les canaux (Jiang *et al.*, 2021 ; Martinac *et al*., 2013) ;

2) la réalisation de test d'électrophysiologie (Delcour, 2013) pour mesurer les courants ioniques sur des sphéroplastes de *S. oneidensis* ayant été exposés à des flux hydrodynamiques. Mais il est évident que ces perspectives se heurtent à des défis techniques et méthodologiques importants, notamment sur la génération de sphéroplastes, ou encore l'application d'un flux sur ces derniers.

Dans la seconde proposition, on pourrait réaliser des stress hydrodynamiques selon une démarche expérimentale similaire à celle du chapitre 5, sur des mutants des gènes codant pour ces systèmes chez *S. oneidensis.*

Le but étant d'évaluer les réponses cellulaires et d'apporter des éléments de réponse quant à la contribution des systèmes de mécanosensing. Cela passerait par :

1) une première étape de recherche et d'identification de ces gènes par comparaison à ceux connus chez *E. coli* (ΔmscL, ΔyggB, ΔkefA (Levina, 1999)), dans la mesure où des différences existent chez *Vibrio cholerae* (Rowe *et al.*, 2013) et *P. aeruginosa* (Çetiner *et al*., 2017) ;

2) la génération de mutants et leur caractérisation en termes de survie sur la base des essais décrits par Moller *et al.* (2023) par exemple. Le verrou majeur de cette approche réside dans le décalage entre le temps de réaction des systèmes de mécanosensing (∼ centaines de ms), la cellule rétablissant sa « mécanohoméostasie » extrêmement rapidement (Booth, 2014 ; Booth *et al.*, 2007) et le temps analytique (quelques minutes) qui pourrait conduire à l'absence d'expression différentielle de gènes.

C'est ainsi que je mets un point final à mon manuscrit de thèse.
Ce travail, qui soulève peut-être autant de questions qu'il n'apporte de réponses aura, je l'espère, contribué à enrichir les connaissances sur les dynamiques de transport et d'adhésion des bactéries sous écoulement, ainsi qu'à mettre en lumière leurs effets sur la cellule bactérienne.
L'un des points forts de ce travail réside probablement dans l'approche interdisciplinaire qui l'a guidé, mêlant biophysique, microbiologie et biologie moléculaire, qui offre une vision plus intégrative d'un phénomène complexe et ouvre la voie à de multiples perspectives.

Références bibliographiques

Abboud, R., Popa, R., Souza-Egipsy, V., Giometti, C.S., Tollaksen, S., Mosher, J.J., Findlay, R.H., Nealson, K.H., 2005. Low-Temperature Growth of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied and Environmental Microbiology 71*, 811–816. https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.811-816.2005

Abeyrathna, D., Ashaduzzaman, M., Malshe, M., Kalimuthu, J., Gadhamshetty, V., Chundi, P., Subramaniam, M., 2022. An AI-based approach for detecting cells and microbial byproducts in low volume scanning electron microscope images of biofilms. *Frontiers in Microbiology 13*, 996400. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.996400

Achinas, S., Charalampogiannis, N., Euverink, G.J.W., 2019. A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Applied Sciences 9*, 2801. https://doi.org/10.3390/app9142801

Acres, J., Nadeau, J., 2021. 2D vs 3D tracking in bacterial motility analysis. *AIMS Biophysics 8*, 385–399. https://doi.org/10.3934/biophy.2021030

Adamczyk, Z., 2012. Modeling adsorption of colloids and proteins. *Current Opinion in Colloid & Interface Science 17*, 173–186. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2011.12.002

Adamczyk, Z., 2003. Particle adsorption and deposition: role of electrostatic interactions. *Advances in Colloid and Interface Science 100–102*, 267–347. https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00062-3

Adamczyk, Z., Siwek, B., Zembala, M., & Belouschek, P., 1994. Kinetics of localized adsorption of colloid particles. *Advances in Colloid and Interface Science 48*, 151-280

Addorisio, S. R., Shteynberg R., Dasilva, M., Mixon, J., Mucciarone, K., Vu, L., Arsenault, K., Briand, V., Parker, S., Smith, S., Vise, C., Pina, C., Laranjo, L., 2022. Oxidative Stress Response in Bacteria: A Review. *Fine Focus 8*, 36–46. https://doi.org/10.33043/FF.8.1.36-46

Adler, M., Erickstad, M., Gutierrez, E., Groisman, A., 2012. Studies of bacterial aerotaxis in a microfluidic device. *Lab on a Chip 12*, 4835. https://doi.org/10.1039/c2lc21006a

Ahmed, T., Shimizu, T.S., Stocker, R., 2010. Microfluidics for bacterial chemotaxis. *Integrative Biology 2*, 604. https://doi.org/10.1039/c0ib00049c

Ahmed, T., Stocker, R., 2008. Experimental Verification of the Behavioral Foundation of Bacterial Transport Parameters Using Microfluidics. *Biophysical Journal 95*, 4481–4493. https://doi.org/10.1529/biophysj.108.134510

Akiyama, T., Williamson, K.S., Schaefer, R., Pratt, S., Chang, C.B., Franklin, M.J., 2017. Resuscitation of *Pseudomonas aeruginosa* from dormancy requires hibernation promoting factor (PA4463) for ribosome preservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences 114*, 3204–3209. https://doi.org/10.1073/pnas.1700695114

Akyon, F.C., Altinuc, S.O., Temizel, A., 2022. Slicing Aided Hyper Inference and Fine-tuning for Small Object Detection, in: 2022 IEEE International Conference on Image Processing (ICIP). pp. 966–970. https://doi.org/10.1109/ICIP46576.2022.9897990

Aldridge, P., 2002. Regulation of flagellar assembly. *Current Opinion in Microbiology 5*, 160–165. https://doi.org/10.1016/s1369-5274(02)00302-8

Allison, D.G., Sattenstall, M.A., 2007. The influence of green fluorescent protein incorporation on bacterial physiology: a note of caution. *Journal of Applied Microbiology 103*, 318–324. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03243.x

Alonso-Sáez, L., Galand, P.E., Casamayor, E.O., Pedrós-Alió, C., Bertilsson, S., 2010. High bicarbonate assimilation in the dark by Arctic bacteria. *The ISME Journal 4*, 1581–1590. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.69

Alsharif, G., Ahmad, S., Islam, M.S., Shah, R., Busby, S.J., Krachler, A.M., 2015. Host attachment and fluid shear are integrated into a mechanical signal regulating virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Proceedings of the National Academy of Sciences 112*, 5503–5508. https://doi.org/10.1073/pnas.1422986112

Alvarez, A.F., Georgellis, D., 2023. Environmental adaptation and diversification of bacterial two-component systems. *Current Opinion in Microbiology 76*, 102399. https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102399

Alves, P., Moreira, J.M., Miranda, J.M., Mergulhão, F.J., 2020. Analysing the Initial Bacterial Adhesion to Evaluate the Performance of Antifouling Surfaces. *Antibiotics 9*, 421. https://doi.org/10.3390/antibiotics9070421

Amrani, A., Bergon, A., Holota, H., Tamburini, C., Garel, M., Ollivier, B., Imbert, J., Dolla, A., Pradel, N., 2014. Transcriptomics Reveal Several Gene Expression Patterns in the Piezophile *Desulfovibrio hydrothermalis* in Response to Hydrostatic Pressure. *PLoS ONE 9*, e106831. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106831

Amsler, C.D., Cho, M., Matsumura, P., 1993. Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth. *Journal of Bacteriology 175*, 6238–6244. https://doi.org/10.1128/jb.175.19.6238-6244.1993

An, Y.H., Friedman, R.J., 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research 43*, 338–348. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199823)43:3<338::AID-JBM16>3.0.CO;2-B

Andrews, S.C., Robinson, A.K., Rodríguez-Quiñones, F., 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews 27*, 215–237. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X

Anselme, K., Ploux, L., Ponche, A., 2010. Cell/Material Interfaces: Influence of Surface Chemistry and Surface Topography on Cell Adhesion. *Journal of Adhesion Science and Technology 24*, 831–852. https://doi.org/10.1163/016942409X12598231568186

Anton, B.P., Saleh, L., Benner, J.S., Raleigh, E.A., Kasif, S., Roberts, R.J., 2008. RimO, a MiaB-like enzyme, methylthiolates the universally conserved Asp88 residue of ribosomal protein S12 in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences 105*, 1826–1831. https://doi.org/10.1073/pnas.0708608105

Apel, D., Surette, M.G., 2008. Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1778*, 1851–1858. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.005

Arinda, T., Philipp, L.-A., Rehnlund, D., Edel, M., Chodorski, J., Stöckl, M., Holtmann, D., Ulber, R., Gescher, J., Sturm-Richter, K., 2019. Addition of Riboflavin-Coupled Magnetic Beads Increases Current Production in Bioelectrochemical Systems via the Increased Formation of Anode-Biofilms. *Frontiers in Microbiology 10*, 126. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00126

Arlt, J., Martinez, V.A., Dawson, A., Pilizota, T., Poon, W.C.K., 2018. Painting with light-powered bacteria. *Nature Communications 9*, 768. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03161-8

Armitage, J.P., 2024. Microbial Primer: The bacterial flagellum – how bacteria swim: This article is part of the Microbial Primers collection. *Microbiology 170*. https://doi.org/10.1099/mic.0.001406

Armitano, J., Baraquet, C., Michotey, V., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C., 2011. The chemical-in-µwell: a high-throughput technique for identifying solutes eliciting a chemotactic response in motile bacteria. *Research in Microbiology 162*, 934–938. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.03.001

Armitano, J., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C., 2014. Gram-negative bacteria can also form pellicles. *Environmental Microbiology Reports 6*, 534–544. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12171

Armitano, J., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C., 2013. Aerotaxis governs floating biofilm formation in *Shewanella oneidensis*. *Environmental Microbiology 15*, 3108–3118. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12158

Arnold, G.P., 1974. Rheotropism in fishes. *Biological Reviews 49*, 515–576. https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1974.tb01173.x

Arnold, J.W., Bailey, G.W., 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm formation: scanning electron and atomic force microscopy study. *Poultry Science 79*, 1839–1845. https://doi.org/10.1093/ps/79.12.1839

Arora, S., Bhat, V., Mittal, A., 2007. Correlating single cell motility with population growth dynamics for flagellated bacteria. *Biotechnology and Bioengineering 97*, 1644–1649. https://doi.org/10.1002/bit.21372

Arpa-Sancet, M.P., Christophis, C., Rosenhahn, A., 2012. Microfluidic Assay to Quantify the Adhesion of Marine Bacteria. *Biointerphases 7*, 26. https://doi.org/10.1007/s13758-012-0026-x

Arrieta, J., Barreira, A., Chioccioli, M., Polin, M., Tuval, I., 2017. Phototaxis beyond turning: persistent accumulation and response acclimation of the microalga Chlamydomonas reinhardtii. *Scientific Reports 7*, 3447. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03618-8

Atwal, S., Giengkam, S., VanNieuwenhze, M., Salje, J., 2016. Live imaging of the genetically intractable obligate intracellular bacteria *Orientia tsutsugamushi* using a panel of fluorescent dyes. *Journal of Microbiological Methods 130*, 169–176. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.08.022

Aufrecht, J.A., Fowlkes, J.D., Bible, A.N., Morrell-Falvey, J., Doktycz, M.J., Retterer, S.T., 2019. Pore-scale hydrodynamics influence the spatial evolution of bacterial biofilms in a microfluidic porous network. *PLoS ONE 14*, e0218316. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218316

Avalos Vizcarra, I., Emge, P., Miermeister, P., Chabria, M., Konradi, R., Vogel, V., Möller, J., 2013. Fluorescence-based *in situ* assay to probe the viability and growth kinetics of surface-adhering and suspended recombinant bacteria. *Biointerphases 8*, 22. https://doi.org/10.1186/1559-4106-8-22

Azeredo, J., Lazarova, V., Oliveira, R., 1999. Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Water science and technology 39 (7)*, 243-250.

Bagherifard, S., Hickey, D.J., De Luca, A.C., Malheiro, V.N., Markaki, A.E., Guagliano, M., Webster, T.J., 2015. The influence of nanostructured features on bacterial adhesion and bone cell functions on severely shot peened 316L stainless steel. *Biomaterials 73*, 185–197. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.09.019

Bakker, D.P., Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C., 2002. Bacterial deposition in a parallel plate and a stagnation point flow chamber: microbial adhesion mechanisms depend on the mass transport conditions. *Microbiology 148*, 597–603. https://doi.org/10.1099/00221287-148-2-597

Balleza, E., López-Bojorquez, L.N., Martínez-Antonio, A., Resendis-Antonio, O., Lozada-Chávez, I., Balderas-Martínez, Y.I., Encarnación, S., Collado-Vides, J., 2009. Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS Microbiology Reviews 33*, 133–151. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00145.x

Bamford, R.A., Smith, A., Metz, J., Glover, G., Titball, R.W., Pagliara, S., 2017. Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. *BMC Biology 15*, 121. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0465-4

Baraquet, C., Théraulaz, L., Iobbi-Nivol, C., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C., 2009. Unexpected chemoreceptors mediate energy taxis towards electron acceptors in *Shewanella oneidensis*. *Molecular Microbiology 73*, 278–290. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06770.x

Barchinger, S.E., Pirbadian, S., Sambles, C., Baker, C.S., Leung, K.M., Burroughs, N.J., El-Naggar, M.Y., Golbeck, J.H., 2016. Regulation of Gene Expression in Shewanella oneidensis MR-1 during Electron Acceptor Limitation and Bacterial Nanowire Formation. *Applied and Environmental Microbiology 82*, 5428–5443. https://doi.org/10.1128/AEM.01615-16

Barlag, B., Beutel, O., Janning, D., Czarniak, F., Richter, C.P., Kommnick, C., Göser, V., Kurre, R., Fabiani, F., Erhardt, M., Piehler, J., Hensel, M., 2016. Single molecule super-resolution imaging of proteins in living *Salmonella enterica* using self-labelling enzymes. *Scientific Reports 6*, 31601. https://doi.org/10.1038/srep31601

Basset, T. ,2023. Lagrangian investigation of particle dispersion in turbulence (Doctoral dissertation, Ecole normale supérieure de lyon-ENS LYON).

Beblawy, S., Bursac, T., Paquete, C., Louro, R., Clarke, T.A., Gescher, J., 2018. Extracellular reduction of solid electron acceptors by *Shewanella oneidensis*. *Molecular Microbiology 109*, 571–583. https://doi.org/10.1111/mmi.14067

Becker, S., Klopffer, L., Mathieu, L., Gross, M., Louvet, N., 2024. Suivi de bactéries en écoulement confiné par microscopie holographique numérique. *Congrès Francophone de Techniques Laser,* 9-13 Septembre 2024, Lyon, France

Bedrossian, M., El-Kholy, M., Neamati, D., & Nadeau, J., 2018. A machine learning algorithm for identifying and tracking bacteria in three dimensions using Digital Holographic Microscopy. *AIMS Biophysics 5(1)*, 36-49.

Belas, R., 2014. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology 22*, 517–527. https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.002

Bencharit, S., Ward, M.J., 2005. Chemotactic Responses to Metals and Anaerobic Electron Acceptors in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology 187*, 5049–5053. https://doi.org/10.1128/JB.187.14.5049-5053.2005

Benoit, M.R., Conant, C.G., Ionescu-Zanetti, C., Schwartz, M., Matin, A., 2010. New Device for High-Throughput Viability Screening of Flow Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology 76*, 4136–4142. https://doi.org/10.1128/AEM.03065-09

Berg, H.C., 2000. Motile Behavior of Bacteria. *Physics Today 53*, 24–29. https://doi.org/10.1063/1.882934

Berg, H.C., 1971. How to Track Bacteria. *Review of Scientific Instruments 42*, 868–871. https://doi.org/10.1063/1.1685246

Berg, H. C., 1993. Random walks in biology. Princeton University Press.

Berg, H. C., Brown, D. A. ,1972. Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature 239 (5374)*, 500-504.

Berke, A.P., Turner, L., Berg, H.C., Lauga, E., 2008. Hydrodynamic attraction of swimming microorganisms by surfaces. *Physical Review Letters 101*, 038102. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.101.038102

Berne, C., Ducret, A., Hardy, G.G., Brun, Y.V., 2015. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiology Spectrum 3*, 3.4.15. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015

Berne, C., Ellison, C.K., Ducret, A., Brun, Y.V., 2018. Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nature Reviews Microbiology 16*, 616–627. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5

Berne, C., Ma, X., Licata, N.A., Neves, B.R.A., Setayeshgar, S., Brun, Y.V., Dragnea, B., 2013. Physiochemical Properties of *Caulobacter crescentus* Holdfast: A Localized Bacterial Adhesive. *Journal of Physical Chemistry B 117*, 10492–10503. https://doi.org/10.1021/jp405802e

Bhagwat, G., O'Connor, W., Grainge, I., Palanisami, T., 2021. Understanding the Fundamental Basis for Biofilm Formation on Plastic Surfaces: Role of Conditioning Films. *Frontiers in Microbiology 12*, 687118. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.687118

Bhattacharjee, T., Datta, S.S., 2019. Bacterial hopping and trapping in porous media. *Nature Communications 10*, 2075. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10115-1

Bhosle, N., Suci, P.A., Baty, A.M., Weiner, R.M., Geesey, G.G., 1998. Influence of Divalent Cations and pH on Adsorption of a Bacterial Polysaccharide Adhesin. *Journal of Colloid and Interface Science 205*, 89–96. https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5597

Bianchi, S., Saglimbeni, F., Di Leonardo, R., 2017. Holographic Imaging Reveals the Mechanism of Wall Entrapment in Swimming Bacteria. *Physical Review X 7*, 011010. https://doi.org/10.1103/PhysRevX.7.011010

Binnenkade, L., Teichmann, L., Thormann, K. M. ,2014. Iron triggers λSo prophage induction and release of extracellular DNA in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *80 (17)*, 5304-5316.

Binnenkade, L., Kreienbaum, M., Thormann, K.M., 2018. Characterization of ExeM, an Extracellular Nuclease of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Frontiers in Microbiology 9*, 1761. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01761

Binnenkade, L., Lassak, J., Thormann, K.M., 2011. Analysis of the BarA/UvrY Two-Component System in *Shewanella oneidensis* MR-1. *PLoS ONE 6*, e23440. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023440

Binz, M., Lee, A.P., Edwards, C., Nicolau, D.V., 2010. Motility of bacteria in microfluidic structures. *Microelectronic Engineering 87*, 810–813. https://doi.org/10.1016/j.mee.2009.11.080

Biondi, S. A., Quinn, J. A., Goldfine, H., 1998. Random motility of swimming bacteria in restricted geometries. *AIChE journal 44*(8), 1923-1929.

Blackburn, G.M., Egli, M., 2022. Nucleic Acids in Chemistry and Biology 4th Edition. Royal Society of Chemistry.

Boks, N.P., Kaper, H.J., Norde, W., Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C., 2008a. Residence time dependent desorption of *Staphylococcus epidermidis* from hydrophobic and hydrophilic substrata. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 67*, 276–278. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.08.021

Boks, N.P., Norde, W., Van Der Mei, H.C., Busscher, H.J., 2008b. Forces involved in bacterial adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Microbiology 154*, 3122–3133. https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018622-0

Bollenl, C.M.L., Lambrechts, P., Quirynen, M., 1997. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: A review of the literature. *Dental Materials 13*, 258–269. https://doi.org/10.1016/S0109-5641(97)80038-3

Booth, I.R., 2014. Bacterial mechanosensitive channels: progress towards an understanding of their roles in cell physiology. *Current Opinion in Microbiology 18*, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.01.005

Booth, I.R., Edwards, M.D., Black, S., Schumann, U., Miller, S., 2007. Mechanosensitive channels in bacteria: signs of closure? *Nature Reviews Microbiology 5*, 431–440. https://doi.org/10.1038/nrmicro1659

Borukhov, S., Lee, J., Laptenko, O., 2005. Bacterial transcription elongation factors: new insights into molecular mechanism of action. *Molecular Microbiology 55*, 1315–1324. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04481.x

Bos, R., 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews 23*, 179–229. https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00004-2

Bouhenni, R.A., Vora, G.J., Biffinger, J.C., Shirodkar, S., Brockman, K., Ray, R., Wu, P., Johnson, B.J., Biddle, E.M., Marshall, M.J., Fitzgerald, L.A., Little, B.J., Fredrickson, J.K., Beliaev, A.S., Ringeisen, B.R., Saffarini, D.A., 2010. The Role of *Shewanella oneidensis* MR-1 Outer Surface Structures in Extracellular Electron Transfer. *Electroanalysis 22*, 856–864. https://doi.org/10.1002/elan.200880006

Bouillet, S., Genest, O., Méjean, V., Iobbi-Nivol, C., 2017. Protection of the general stress response σS factor by the CrsR regulator allows a rapid and efficient adaptation of *Shewanella oneidensis*. *Journal of Biological Chemistry 292*, 14921–14928. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.781443

Bouteiller, M., Dupont, C., Bourigault, Y., Latour, X., Barbey, C., Konto-Ghiorghi, Y., Merieau, A., 2021. *Pseudomonas* Flagella: Generalities and Specificities. *IJMS 22*, 3337. https://doi.org/10.3390/ijms22073337

Boyeldieu, A., Ali Chaouche, A., Ba, M., Honoré, F.A., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C., 2020. The phosphorylated regulator of chemotaxis is crucial throughout biofilm biogenesis in *Shewanella oneidensis*. *npj Biofilms Microbiomes 6*, 54. https://doi.org/10.1038/s41522-020-00165-5

Bozec, L., Donos, N., Spratt, D., Aguayo, S., 2016. Probing the nanoadhesion of *Streptococcus sanguinis* to titanium implant surfaces by atomic force microscopy. *IJN 1443*. https://doi.org/10.2147/IJN.S100768

Bradley, M.D., Beach, M.B., De Koning, A.P.J., Pratt, T.S., Osuna, R., 2007. Effects of Fis on *Escherichia coli* gene expression during different growth stages. *Microbiology 153*, 2922–2940. https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008565-0

Bramkamp, M., Scheffers, D., 2023. Bacterial membrane dynamics: Compartmentalization and repair. *Molecular Microbiology 120*, 490–501. https://doi.org/10.1111/mmi.15077

Bretherton, F. P., 1962. The motion of rigid particles in a shear flow at low Reynolds number. *Journal of Fluid Mechanics 14*(2), 284-304.

Bretherton, F. P., Rothschild, N. M. V., 1961. Rheotaxis of spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences 153*(953), 490-502.

Bridier, A., Hammes, F., Canette, A., Bouchez, T., Briandet, R., 2015. Fluorescence-based tools for single-cell approaches in food microbiology. *International Journal of Food Microbiology 213*, 2–16. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.003

Brown, A.N., Anderson, M.T., Bachman, M.A., Mobley, H.L.T., 2022. The ArcAB Two-Component System: Function in Metabolism, Redox Control, and Infection. *Microbiology and Molecular Biology Reviews 86*, e00110-21. https://doi.org/10.1128/mmbr.00110-21

Browning, D.F., Busby, S.J.W., 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nature Reviews Microbiology 2*, 57–65. https://doi.org/10.1038/nrmicro787

Bruna, R.E., Kendra, C.G., Pontes, M.H., 2024. An intracellular phosphorus-starvation signal activates the PhoB/PhoR two-component system in *Salmonella enterica*. *mBio 15*, e01642-24. https://doi.org/10.1128/mbio.01642-24

Bruzaud, J., Tarrade, J., Coudreuse, A., Canette, A., Herry, J.-M., Taffin De Givenchy, E., Darmanin, T., Guittard, F., Guilbaud, M., Bellon-Fontaine, M.-N., 2015. Flagella but not type IV pili are involved in the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to hydrophobic or superhydrophobic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 131*, 59–66. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.04.036

Bruus, H., 2007. *Theoretical microfluidics* (Vol. 18). Oxford university press.

Burrows, L.L., 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annual Review of Microbiology 66*, 493–520. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055

Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C., 2012. How Do Bacteria Know They Are on a Surface and Regulate Their Response to an Adhering State? *PLoS Pathogens 8*, e1002440. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002440

Busscher, H.J., Van Der Mei, H.C., 2006. Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. *Clinical Microbiology Reviews 19*, 127–141. https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.127-141.2006

Caiazza, N.C., Merritt, J.H., Brothers, K.M., O'Toole, G.A., 2007. Inverse Regulation of Biofilm Formation and Swarming Motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology 189*, 3603–3612. https://doi.org/10.1128/JB.01685-06

Cairns, L.S., Marlow, V.L., Bissett, E., Ostrowski, A., Stanley-Wall, N.R., 2013. A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology 90*, 6–21. https://doi.org/10.1111/mmi.12342

Cambré, A., Aertsen, A., 2020. Bacterial Vivisection: How Fluorescence-Based Imaging Techniques Shed a Light on the Inner Workings of Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews 84*, e00008-20. https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-20

Camesano, T.A., Logan, B.E., 1998. Influence of Fluid Velocity and Cell Concentration on the Transport of Motile and Nonmotile Bacteria in Porous Media. *Environmental Science & Technology 32*, 1699–1708. https://doi.org/10.1021/es970996m

Camesano, T.A., Natan, M.J., Logan, B.E., 2000. Observation of Changes in Bacterial Cell Morphology Using Tapping Mode Atomic Force Microscopy. *Langmuir 16*, 4563–4572. https://doi.org/10.1021/la990805o

Cao, D., Dvoriashyna, M., Liu, S., Lauga, E., Wu, Y., 2022. Reduced surface accumulation of swimming bacteria in viscoelastic polymer fluids. *Proceedings of the National Academy of Sciences 119*, e2212078119. https://doi.org/10.1073/pnas.2212078119

Cao, J.G., Meighen, E.A., 1989. Purification and Structural Identification of an Autoinducer for the Luminescence System of *Vibrio harveyi*. *Journal of Biological Chemistry 264*, 21670–21676. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)88238-6

Capra, E.J., Laub, M.T., 2012. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annual Review of Microbiology 66*, 325–347. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150039

Carniello, V., Peterson, B.W., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., 2018. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Advances in Colloid and Interface Science 261*, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.10.005

Carrillo-Mora, J.P., Monteiro, M.P., Lodeiro, A.R., Marconi, V.I., Cordero, M.L., 2025. Damage and recovery of flagella in soil bacteria exposed to shear within long microchannels. https://doi.org/10.48550/arXiv.2410.10932

Çengel, Y.A., Cimbala, J.M., 2014. Fluid mechanics: fundamentals and applications, Third edition. ed. McGraw Hill, New York.

Çetiner, U., Rowe, I., Schams, A., Mayhew, C., Rubin, D., Anishkin, A., Sukharev, S., 2017. Tension-activated channels in the mechanism of osmotic fitness in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Physiology 149*, 595–609. https://doi.org/10.1085/jgp.201611699

Chambless, J. D., & Stewart, P. S. ,2007. A three-dimensional computer model analysis of three hypothetical biofilm detachment mechanisms. *Biotechnology and bioengineering 97*(6), 1573-1584.

Chang, J., He, X., Bai, X., Yuan, C., 2020. The impact of hydrodynamic shear force on adhesion morphology and biofilm conformation of *Bacillus sp. Ocean Engineering 197*, 106860. https://doi.org/10.1016/j.oceaneng.2019.106860

Chang, Y., Carroll, B.L., Liu, J., 2021. Structural basis of bacterial flagellar motor rotation and switching. *Trends in Microbiology 29*, 1024–1033. https://doi.org/10.1016/j.tim.2021.03.009

Chapman, R.G., Ostuni, E., Liang, M.N., Meluleni, G., Kim, E., Yan, L., Pier, G., Warren, H.S., Whitesides, G.M., 2001. Polymeric Thin Films That Resist the Adsorption of Proteins and the Adhesion of Bacteria. *Langmuir 17*, 1225–1233. https://doi.org/10.1021/la001222d

Chattopadhyay, S., Moldovan, R., Yeung, C., Wu, X.L., 2006. Swimming efficiency of bacterium *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences 103*, 13712–13717. https://doi.org/10.1073/pnas.0602043103

Chen, L., Yang, C., Xiao, Y., Yan, X., Hu, L., Eggersdorfer, M., Chen, D., Weitz, D.A., Ye, F., 2021. Millifluidics, microfluidics, and nanofluidics: manipulating fluids at varying length scales. *Materials Today Nano 16*, 100136. https://doi.org/10.1016/j.mtnano.2021.100136

Chen, L., Zhang, Y.-H., Wang, S., Zhang, Y., Huang, T., Cai, Y.-D., 2017. Prediction and analysis of essential genes using the enrichments of gene ontology and KEGG pathways. *PLoS ONE 12*, e0184129. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184129

Chen, M., Zhao, Z., Yang, J., Peng, K., Baker, M.A., Bai, F., Lo, C.-J., 2017. Length-dependent flagellar growth of *Vibrio alginolyticus* revealed by real time fluorescent imaging. *eLife 6*, e22140. https://doi.org/10.7554/eLife.22140

Chen, S., Ding, Y., 2023. A bibliography study of *Shewanella oneidensis* biofilm. *FEMS Microbiology Ecology 99(11)*, fiad124. 10.1093/femsec/fiad124

Chen, X., Zhang, C., Paterson, D.M., Townend, I.H., Jin, C., Zhou, Z., Gong, Z., Feng, Q., 2019. The effect of cyclic variation of shear stress on non-cohesive sediment stabilization by microbial biofilms: the role of 'biofilm precursors.' *Earth Surface Processes and Landforms 44*, 1471–1481. https://doi.org/10.1002/esp.4573

Cheng, H.-J., Hsu, C.-H., Hung, C.-L., Lin, C.-Y., 2022. A review for cell and particle tracking on microscopy images using algorithms and deep learning technologies. *Biomedical Journal 45*, 465–471. https://doi.org/10.1016/j.bj.2021.10.001

Chenouard, N., Dufour, A., Olivo-Marin, J., 2009. Tracking algorithms chase down pathogens. *Biotechnology Journal 4*, 838–845. https://doi.org/10.1002/biot.200900030

Cheong, F.C., Wong, C.C., Gao, Y., Nai, M.H., Cui, Y., Park, S., Kenney, L.J., Lim, C.T., 2015. Rapid, High-Throughput Tracking of Bacterial Motility in 3D via Phase-Contrast Holographic Video Microscopy. *Biophysical Journal 108*, 1248–1256. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.01.018

Cherkouk, A., Law, G.T.W., Rizoulis, A., Law, K., Renshaw, J.C., Morris, K., Livens, F.R., Lloyd, J.R., 2016. Influence of riboflavin on the reduction of radionuclides by *Shewanella oneidenis* MR-1. *Dalton Transactions 45*, 5030–5037. https://doi.org/10.1039/C4DT02929A

Chilukuri, S., Collins, C.H., Underhill, P.T., 2014. Impact of external flow on the dynamics of swimming microorganisms near surfaces. *Journal of Physics: Condensed Matter 26*, 115101. https://doi.org/10.1088/0953-8984/26/11/115101

Cho, S.Y., Na, H., Oh, H.B., Kwak, Y.M., Song, W.S., Park, S.C., Jeon, W.-J., Cho, H., Oh, B.-C., Park, J., Kang, S.G., Lee, G.-S., Yoon, S., 2022. Structural basis of flagellar motility regulation by the MogR repressor and the GmaR antirepressor in *Listeria monocytogenes*. *Nucleic Acids Research 50*, 11315–11330. https://doi.org/10.1093/nar/gkac815

Choi, Y.-S., Lee, S.-J., 2012. Inertial migration of erythrocytes in low-viscosity and high-shear rate microtube flows: Application of simple digital in-line holographic microscopy. *Journal of Biomechanics 45*, 2706–2709. https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.08.004

Chun, A.L.M., Mosayyebi, A., Butt, A., Carugo, D., Salta, M., 2022. Early biofilm and streamer formation is mediated by wall shear stress and surface wettability: A multifactorial microfluidic study. *MicrobiologyOpen 11*. https://doi.org/10.1002/mbo3.1310

Cianciotto, N. P., White, R. C., 2017. Expanding role of type II secretion in bacterial pathogenesis and beyond. *Infection and immunity 85*(5), 10-1128.

Clement, E., Lindner, A., Douarche, C., Auradou, H., 2016. Bacterial suspensions under flow. *European Physical Journal: Special Topics 225*, 2389–2406. https://doi.org/10.1140/epjst/e2016-60068-6

Codling, E.A., Plank, M.J., Benhamou, S., 2008. Random walk models in biology. *Journal of the Royal Society interface 5*, 813–834. https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0014

Colin, R., Ni, B., Laganenka, L., Sourjik, V., 2021. Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology. *FEMS Microbiology Reviews 45*, fuab038. https://doi.org/10.1093/femsre/fuab038

Coltharp, C., Xiao, J., 2012. Superresolution microscopy for microbiology: Superresolution microscopy for microbiology. *Cellular Microbiology 14*, 1808–1818. https://doi.org/10.1111/cmi.12024

Conrad, J.C., Poling-Skutvik, R., 2018. Confined Flow: Consequences and Implications for Bacteria and Biofilms. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering 9*, 175–200. https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060817-084006

Cooley, B.J., Thatcher, T.W., Hashmi, S.M., L'Her, G., Le, H.H., Hurwitz, D.A., Provenzano, D., Touhami, A., Gordon, V.D., 2013. The extracellular polysaccharide Pel makes the attachment of *P. aeruginosa* to surfaces symmetric and short-ranged. *Soft Matter 9*, 3871. https://doi.org/10.1039/c3sm27638d

Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S.C., Vinckx, T., 2011. Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics 3*, 540. https://doi.org/10.1039/c1mt00022e

Cox, C.D., Bavi, N., Martinac, B., 2018. Bacterial Mechanosensors. *Annual Review of Physiology 80*, 71–93. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121351

Croucher, N.J., Thomson, N.R., 2010. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Current Opinion in Microbiology 13*, 619–624. https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.009

Crouzet, M., Claverol, S., Lomenech, A.-M., Le Sénéchal, C., Costaglioli, P., Barthe, C., Garbay, B., Bonneu, M., Vilain, S., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* cells attached to a surface display a typical proteome early as 20 minutes of incubation. *PLoS ONE 12*, e0180341. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180341

Croze, O.A., Ferguson, G.P., Cates, M.E., Poon, W.C.K., 2011. Migration of Chemotactic Bacteria in Soft Agar: Role of Gel Concentration. *Biophysical Journal 101*, 525–534. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.023

Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., Penadés, J.R., 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology 183*, 2888–2896. https://doi.org/10.1128/JB.183.9.2888-2896.2001

Cummings, H.S., Hershey, J.W., 1994. Translation initiation factor IF1 is essential for cell viability in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology 176*, 198–205. https://doi.org/10.1128/jb.176.1.198-205.1994

Daniel, F., Kesterson, D., Lei, K., Hord, C., Patel, A., Kaffenes, A., Congivaram, H., Prakash, S., 2022. Application of Microfluidics for Bacterial Identification. *Pharmaceuticals 15*, 1531. https://doi.org/10.3390/ph15121531

Darnige, T., Figueroa-Morales, N., Bohec, P., Lindner, A., Clément, E., 2017. Lagrangian 3D tracking of fluorescent microscopic objects in motion. *Review of Scientific Instruments 88*, 055106. https://doi.org/10.1063/1.4982820

Darnton, N.C., Turner, L., Rojevsky, S., Berg, H.C., 2007. On Torque and Tumbling in Swimming *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology 189*, 1756–1764. https://doi.org/10.1128/JB.01501-06

Das, T., Sharma, P. K., Busscher, H. J., Van Der Mei, H. C., Krom, B. P., 2010. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Applied and environmental microbiology 76*(10), 3405-3408.

Davies, D.G., Chakrabarty, A.M., Geesey, G.G., 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology 59*, 1181–1186. https://doi.org/10.1128/aem.59.4.1181-1186.1993

Davies, D.G., Geesey, G.G., 1995. Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology 61*, 860–867. https://doi.org/10.1128/aem.61.3.860-867.1995

Davis, M.L., Mounteer, L.C., Stevens, L.K., Miller, C.D., Zhou, A., 2011. 2D motility tracking of *Pseudomonas putida* KT2440 in growth phases using video microscopy. *Journal of Bioscience and Bioengineering 111*, 605–611. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.01.007

De Kerchove, A.J., Elimelech, M., 2008. Calcium and Magnesium Cations Enhance the Adhesion of Motile and Nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* on Alginate Films. *Langmuir 24*, 3392–3399. https://doi.org/10.1021/la7036229

De Vriendt, K., Theunissen, S., Carpentier, W., De Smet, L., Devreese, B., Van Beeumen, J., 2005. Proteomics of *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilm reveals differentially expressed proteins, including AggA and RibB. *Proteomics 5*, 1308–1316. https://doi.org/10.1002/pmic.200400989

De Windt, W., Gao, H., Krömer, W., Van Damme, P., Dick, J., Mast, J., Boon, N., Zhou, J., Verstraete, W., 2006. AggA is required for aggregation and increased biofilm formation of a hyper-aggregating mutant of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Microbiology 152*, 721–729. https://doi.org/10.1099/mic.0.28204-0

DeBenedictis, E.P., Liu, J., Keten, S., 2016. Adhesion mechanisms of curli subunit CsgA to abiotic surfaces. *Science Advances 2*, e1600998. https://doi.org/10.1126/sciadv.1600998

Dehkharghani, A., Waisbord, N., Dunkel, J., Guasto, J.S., 2019. Bacterial scattering in microfluidic crystal flows reveals giant active Taylor–Aris dispersion. *Proceedings of the National Academy of Sciences 116*, 11119–11124. https://doi.org/10.1073/pnas.1819613116

Delcour, A.H., 2013. Electrophysiology of Bacteria. *Annual Review of Microbiology 67*, 179–197. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155637

Demchenko, A.P., 2020. Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection. *Methods and Applications in Fluorescence 8*, 022001. https://doi.org/10.1088/2050-6120/ab7365

Deng, Y., Wang, L., Chen, Y., Long, Y., 2020. Optimization of Staining with SYTO 9/Propidium Iodide: Interplay, Kinetics and Impact on *Brevibacillus Brevis*. *BioTechniques 69*, 88–98. https://doi.org/10.2144/btn-2020-0036

Denich, T.J., Beaudette, L.A., Lee, H., Trevors, J.T., 2003. Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods 52*, 149–182. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00155-0

Dentz, M., Creppy, A., Douarche, C., Clément, E., Auradou, H., 2022. Dispersion of motile bacteria in a porous medium. *Journal of Fluid Mechanics 946*. https://doi.org/10.1017/jfm.2022.596

Diaz, A. M., Li, W., Calle, L. M., Callahan, M. R., 2019. Investigation of biofilm formation and control for spacecraft-an early literature review. In *International Conference on Enviromental Systems* (No.KSC-E-DAA-TN68829).

Díaz-Pérez, A.L., Díaz-Pérez, C., Campos-García, J., 2016. Bacterial l-leucine catabolism as a source of secondary metabolites. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 15*, 1–29. https://doi.org/10.1007/s11157-015-9385-3

Díaz-Pérez, A. L., Román-Doval, C., Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Sosa-Aguirre, C. R., López-Meza, J. E., Campos-García, J. ,2007. Identification of the aceA gene encoding isocitrate lyase required for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on acetate, acyclic terpenes and leucine. *FEMS microbiology letters 269*(2), 309-316.

Dikow, R.B., 2011. Genome-level homology and phylogeny of *Shewanella* (Gammaproteobacteria: lteromonadales: Shewanellaceae). *BMC Genomics 12*, 237. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-237

DiLuzio, W.R., Turner, L., Mayer, M., Garstecki, P., Weibel, D.B., Berg, H.C., Whitesides, G.M., 2005. *Escherichia coli* swim on the right-hand side. *Nature 435*, 1271–1274. https://doi.org/10.1038/nature03660

Dingemans, J., Monsieurs, P., Yu, S.-H., Crabbé, A., Förstner, K.U., Malfroot, A., Cornelis, P., Van Houdt, R., 2016. Effect of Shear Stress on *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from the Cystic Fibrosis Lung. *mBio 7*, e00813-16. https://doi.org/10.1128/mBio.00813-16

Diwan, T., Anirudh, G., Tembhurne, J.V., 2023. Object detection using YOLO: challenges, architectural successors, datasets and applications. *Multimedia Tools and Applications 82*, 9243–9275. https://doi.org/10.1007/s11042-022-13644-y

Dong, Z., Guo, S., Fu, H., Gao, H., 2017. Investigation of a spontaneous mutant reveals novel features of iron uptake in *Shewanella oneidensis*. *Scientific Reports 7*, 11788. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11987-3

Donlan, R. M., 2016. Microbial biofilms. *Emerging Infectious Diseases 22*(6), 1142.

Douarche, C., Buguin, A., Salman, H., Libchaber, A., 2009. *E. Coli* and Oxygen: A Motility Transition. *Physical Review Letters 102*, 198101. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.102.198101

Drescher, K., Dunkel, J., Cisneros, L.H., Ganguly, S., Goldstein, R.E., 2011. Fluid dynamics and noise in bacterial cell–cell and cell–surface scattering. *Proceedings of the National Academy of Sciences 108*, 10940–10945. https://doi.org/10.1073/pnas.1019079108

Driscoll, M. E., Romine, M. F., Juhn, F. S., Serres, M. H., McCue, L. A., Beliaev, A. S., Gardner, T. S., 2007. Identification of diverse carbon utilization pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1 via expression profiling. *Genome Informatics 18*, 287-307.

Dubay, M.M., Acres, J., Riekeles, M., Nadeau, J.L., 2023. Recent advances in experimental design and data analysis to characterize prokaryotic motility. *Journal of Microbiological Methods 204*, 106658. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106658

Ducret, A., Maisonneuve, E., Notareschi, P., Grossi, A., Mignot, T., Dukan, S., 2009. A Microscope Automated Fluidic System to Study Bacterial Processes in Real Time. *PLoS ONE 4*, e7282. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007282

Dufrêne, Y.F., Persat, A., 2020. Mechanomicrobiology: how bacteria sense and respond to forces. *Nature Reviews Microbiology 18*, 227–240. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0314-2

Duhl, K.L., Tefft, N.M., TerAvest, M.A., 2018. *Shewanella oneidensis* MR-1 Utilizes both Sodium- and Proton-Pumping NADH Dehydrogenases during Aerobic Growth. *Applied and Environmental Microbiology 84*, e00415-18. https://doi.org/10.1128/AEM.00415-18

Dunn, C.M., Foust, D., Gao, Y., Biteen, J.S., Shaw, S.L., Kearns, D.B., 2024. Nascent flagellar basal bodies are immobilized by rod assembly in *Bacillus subtilis*. https://doi.org/10.1101/2024.08.02.606393

Dunne, W.M., 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews 15*, 155–166. https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.155-166.2002

Durand, A., Bourbon, M.-L., Steunou, A.-S., Khalfaoui-Hassani, B., Legrand, C., Guitton, A., Astier, C., Ouchane, S., 2018. Biogenesis of the bacterial cbb3 cytochrome c oxidase: Active subcomplexes support a sequential assembly model. *Journal of Biological Chemistry 293*, 808–818. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805184

Dworkin, J., 2023. Understanding the Stringent Response: Experimental Context Matters. *mBio 14*, e03404-22. https://doi.org/10.1128/mbio.03404-22

Edwards, M.D., Black, S., Rasmussen, T., Rasmussen, A., Stokes, N.R., Stephen, T.-L., Miller, S., Booth, I.R., 2012. Characterization of three novel mechanosensitive channel activities in *Escherichia coli*. *Channels 6*, 272–281. https://doi.org/10.4161/chan.20998

Egler, M., Grosse, C., Grass, G., Nies, D.H., 2005. Role of the Extracytoplasmic Function Protein Family Sigma Factor RpoE in Metal Resistance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology 187*, 2297–2307. https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2297-2307.2005

El Husseini, N., Mekonnen, S.A., Hall, C.L., Cole, S.J., Carter, J.A., Belew, A.T., El-Sayed, N.M., Lee, V.T., 2024. Characterization of the Entner-Doudoroff pathway in *Pseudomonas aeruginosa* catheter-associated urinary tract infections. *Journal of Bacteriology 206*, e00361-23. https://doi.org/10.1128/jb.00361-23

Elgeti, J., Gompper, G., 2013. Wall accumulation of self-propelled spheres. *Europhysics Letters 101*, 48003. https://doi.org/10.1209/0295-5075/101/48003

Elgeti, J., Winkler, R.G., Gompper, G., 2015. Physics of microswimmers—single particle motion and collective behavior: a review. *Reports on Progress in Physics 78*, 056601. https://doi.org/10.1088/0034-4885/78/5/056601

Elius, M., Boyle, K., Chang, W.-S., Moisander, P.H., Ling, H., 2023. Comparison of three-dimensional motion of bacteria with and without wall accumulation. *Physical Review E 108*, 014409. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.108.014409

El-Kirat-Chatel, S., Beaussart, A., Mathelié-Guinlet, M., Dufrêne, Y.F., 2020. The importance of force in microbial cell adhesion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science 47*, 111–117. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2019.12.010

Ellison, C.K., Dalia, T.N., Dalia, A.B., Brun, Y.V., 2019. Real-time microscopy and physical perturbation of bacterial pili using maleimide-conjugated molecules. *Nature Protocols 14*, 1803–1819. https://doi.org/10.1038/s41596-019-0162-6

Ellison, C.K., Kan, J., Dillard, R.S., Kysela, D.T., Ducret, A., Berne, C., Hampton, C.M., Ke, Z., Wright, E.R., Biais, N., Dalia, A.B., Brun, Y.V., 2017. Obstruction of pilus retraction stimulates bacterial surface sensing. *Science 358*, 535–538. https://doi.org/10.1126/science.aan5706

Elmas, M., Alexiades, V., O'Neal, L., Alexandre, G., 2019. Modeling aerotaxis band formation in *Azospirillum brasilense*. *BMC Microbiology 19*, 101. https://doi.org/10.1186/s12866-019-1468-9

Erben, J., Pinder, Z.A., Lüdtke, M.S., Kerzenmacher, S., 2021. Local Acidification Limits the Current Production and Biofilm Formation of *Shewanella oneidensis* MR-1 With Electrospun Anodes. *Frontiers in Microbiology 12*, 660474. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660474

Ezhilan, B., Saintillan, D., 2015. Transport of a dilute active suspension in pressure-driven channel flow. *Journal of Fluid Mechanics 777*, 482–522. https://doi.org/10.1017/jfm.2015.372

Ezraty, B., Gennaris, A., Barras, F., Collet, J.-F., 2017. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology 15*, 385–396. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26

Farrell, M.J., Finkel, S.E., 2003. The Growth Advantage in Stationary-Phase PhenotypeConferred by *rpoS* Mutations Is Dependent on the pH andNutrientEnvironment. *Journal of Bacteriology 185*, 7044–7052. https://doi.org/10.1128/JB.185.24.7044-7052.2003

Farthing, N.E., Findlay, R.C., Jikeli, J.F., Walrad, P.B., Bees, M.A., Wilson, L.G., 2017. Simultaneous two-color imaging in digital holographic microscopy. *Optics Express 25*, 28489. https://doi.org/10.1364/OE.25.028489

Fatima, K., Naqvi, F., Younas, H., 2021. A Review: Molecular Chaperone-mediated Folding, Unfolding and Disaggregation of Expressed Recombinant Proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics 79*, 153–174. https://doi.org/10.1007/s12013-021-00970-5

Fernandes, S., Gomes, I.B., Simões, L.C., Simões, M., 2021. Overview on the hydrodynamic conditions found in industrial systems and its impact in (bio)fouling formation. *Chemical Engineering Journal 418*, 129348. https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129348

Ferrari, A., Lombardi, S., Signoroni, A., 2017. Bacterial colony counting with Convolutional Neural Networks in Digital Microbiology Imaging. *Pattern Recognition 61*, 629–640. https://doi.org/10.1016/j.patcog.2016.07.016

Ferreira, J.L., Gao, F.Z., Rossmann, F.M., Nans, A., Brenzinger, S., Hosseini, R., Wilson, A., Briegel, A., Thormann, K.M., Rosenthal, P.B., Beeby, M., 2019. γ-proteobacteria eject their polar flagella under nutrient depletion, retaining flagellar motor relic structures. *PLoS Biology 17*, e3000165. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000165

Figueroa-Morales, N., Soto, R., Junot, G., Darnige, T., Douarche, C., Martinez, V., Lindner, A., Clément, E., 2020. 3D spatial exploration by *E. coli* echoes motor temporal variability. *Physical Review X 10*, 021004. https://doi.org/10.1103/PhysRevX.10.021004

Flegler, V.J., Rasmussen, A., Borbil, K., Boten, L., Chen, H.-A., Deinlein, H., Halang, J., Hellmanzik, K., Löffler, J., Schmidt, V., Makbul, C., Kraft, C., Hedrich, R., Rasmussen, T., Böttcher, B., 2021. Mechanosensitive channel gating by delipidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences 118*, e2107095118. https://doi.org/10.1073/pnas.2107095118

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology 8*, 623–633. https://doi.org/10.1038/nrmicro2415

Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology 14*, 563–575. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94

Fletcher, M., 1977. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology 23*, 1–6. https://doi.org/10.1139/m77-001

Fonseca, E.S.R., Fiadeiro, P.T., Pereira, M., Pinheiro, A., 2016. Comparative analysis of autofocus functions in digital in-line phase-shifting holography. *Applied optics 55*(27), 7663-7674.

Fournier, C., Haeberlé, O., 2023. Imageries optiques non conventionnelles pour la biologie. ISTE Group.

Fradique, R., Azevedo, A.M., Chu, V., Conde, J.P., Aires-Barros, M.R., 2020. Microfluidic platform for rapid screening of bacterial cell lysis. *Journal of Chromatography A 1610*, 460539. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460539

Francis, V.I., Stevenson, E.C., Porter, S.L., 2017. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters 364*. https://doi.org/10.1093/femsle/fnx104

Francius, G., El Zein, R., Mathieu, L., Gosselin, F., Maul, A., Block, J.-C., 2017. Nano-exploration of organic conditioning film formed on polymeric surfaces exposed to drinking water. *Water Research 109*, 155–163. https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.038

Frawley, E.R., Fang, F.C., 2014. The ins *and outs* of bacterial iron metabolism. *Molecular Microbiology 93*, 609–616. https://doi.org/10.1111/mmi.12709

Fredrickson, J.K., Romine, M.F., Beliaev, A.S., Auchtung, J.M., Driscoll, M.E., Gardner, T.S., Nealson, K.H., Osterman, A.L., Pinchuk, G., Reed, J.L., Rodionov, D.A., Rodrigues, J.L.M., Saffarini, D.A., Serres, M.H., Spormann, A.M., Zhulin, I.B., Tiedje, J.M., 2008. Towards environmental systems biology of *Shewanella*. *Nature Reviews Microbiology 6*, 592–603. https://doi.org/10.1038/nrmicro1947

Friedlander, R.S., Vlamakis, H., Kim, P., Khan, M., Kolter, R., Aizenberg, J., 2013. Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences 110*, 5624–5629. https://doi.org/10.1073/pnas.1219662110

Friedlander, R.S., Vogel, N., Aizenberg, J., 2015. Role of Flagella in Adhesion of *Escherichia coli* to Abiotic Surfaces. *Langmuir 31*, 6137–6144. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00815

Frymier, P.D., Ford, R.M., Berg, H.C., Cummings, P.T., 1995. Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences 92*, 6195–6199. https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.6195

Fu, H., Liu, L., Dong, Z., Guo, S., Gao, H., 2018. Dissociation between Iron and Heme Biosyntheses Is Largely Accountable for Respiration Defects of *Shewanella oneidensis fur* Mutants. *Applied and Environmental Microbiology 84*, e00039-18. https://doi.org/10.1128/AEM.00039-18

Fu, Y., Deiorio-Haggar, K., Anthony, J., Meyer, M.M., 2013. Most RNAs regulating ribosomal protein biosynthesis in *Escherichia coli* are narrowly distributed to Gammaproteobacteria. *Nucleic Acids Research 41*, 3491–3503. https://doi.org/10.1093/nar/gkt055

Fuqua, C., 2010. Passing the baton between laps: adhesion and cohesion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Molecular Microbiology 77*, 533–536. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07250.x

Furukawa, Y., Dale, J.R., 2013. The surface properties of *Shewanella putrefaciens* 200 and *S. oneidensis* MR-1: the effect of pH and terminal electron acceptors. *Geochemical Transactions 14*, 3. https://doi.org/10.1186/1467-4866-14-3

Gabor, D., 1948. A New Microscopic Principle. *Nature 161*(4098), 777-778

Galaxy Training Network., 2025. *Training material – Galaxy Project*. Consulté le 2 septembre 2025, sur

https://training.galaxyproject.org/training-material/

Galperin, M.Y., Vera Alvarez, R., Karamycheva, S., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Landsman, D., Koonin, E.V., 2025. COG database update 2024. *Nucleic Acids Research 53*, D356–D363. https://doi.org/10.1093/nar/gkae983

Gambari, C., Boyeldieu, A., Armitano, J., Méjean, V., Jourlin-Castelli, C., 2019. Control of pellicle biogenesis involves the diguanylate cyclases PdgA and PdgB, the c-di-GMP binding protein MxdA and the chemotaxis response regulator CheY3 in *Shewanella oneidensis*. *Environmental Microbiology 21*, 81–97. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14424

Ganesh, A., Douarche, C., Dentz, M., Auradou, H., 2023. Numerical modeling of dispersion of swimming bacteria in a Poiseuille flow. *Physical Review Fluids 8*, 034501. https://doi.org/10.1103/PhysRevFluids.8.034501

Gao, H., Barua, S., Liang, Y., Wu, L., Dong, Y., Reed, S., Chen, J., Culley, D., Kennedy, D., Yang, Y., He, Z., Nealson, K.H., Fredrickson, J.K., Tiedje, J.M., Romine, M., Zhou, J., 2010. Impacts of *Shewanella oneidensis c* -type cytochromes on aerobic and anaerobic respiration. *Microbial Biotechnology 3*, 455–466. https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00181.x

Gao, H., Wang, Y., Liu, X., Yan, T., Wu, L., Alm, E., Arkin, A., Thompson, D.K., Zhou, J., 2004. Global Transcriptome Analysis of the Heat Shock Response of *Shewanella oneidensis*. *Journal of Bacteriology 186*, 7796–7803. https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7796-7803.2004

Gao, T., Shi, M., Gao, H., 2018. Partially Reciprocal Replacement of FlrA and FlrC in Regulation of *Shewanella oneidensis* Flagellar Biosynthesis. *Journal of Bacteriology 200*. https://doi.org/10.1128/JB.00796-17

Garcia, M., Berti, S., Peyla, P., Rafaï, S., 2011. The random walk of a low-Reynolds-number swimmer. https://doi.org/10.48550/arXiv.1011.2931

Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z., 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science 18*, 1049–1056. https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001

Garrido, K.D., Palacios, R.J.S., Lee, C., Kang, S., 2014. Impact of conditioning film on the initial adhesion of *E. coli* on polysulfone ultrafiltration membrane. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry 20*, 1438–1443. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.07.029

Geesey, G. G., Wigglesworth-Cooksey, B., & Cooksey, K. E., 2000. Influence of calcium and other cations on surface adhesion of bacteria and diatoms: a review. *Biofouling 15*(1-3), 195-205.

Germain, D., Leocmach, M., Gibaud, T., 2016. Differential Dynamic Microscopy to characterize Brownian motion and bacteria motility. *American Journal of Physics 84*, 202–210. https://doi.org/10.1119/1.4939516

Gevrekci, A.Ö., 2017. The roles of polyamines in microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology 33*, 204. https://doi.org/10.1007/s11274-017-2370-y

Gibiansky, M.L., Conrad, J.C., Jin, F., Gordon, V.D., Motto, D.A., Mathewson, M.A., Stopka, W.G., Zelasko, D.C., Shrout, J.D., Wong, G.C.L., 2010. Bacteria Use Type IV Pili to Walk Upright and Detach from Surfaces. *Science 330*, 197–197. https://doi.org/10.1126/science.1194238

Gödeke, J., Binnenkade, L., Thormann, K.M., 2012. Transcriptome Analysis of Early Surface-Associated Growth of *Shewanella oneidensis* MR-1. *PLoS ONE 7*, e42160. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042160

Gödeke, J., Paul, K., Lassak, J., Thormann, K.M., 2011. Phage-induced lysis enhances biofilm formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *The ISME Journal 5*, 613–626. https://doi.org/10.1038/ismej.2010.153

Godin, A.G., Lounis, B., Cognet, L., 2014. Super-resolution Microscopy Approaches for Live Cell Imaging. *Biophysical Journal 107*, 1777–1784. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.08.028

Goeres, D.M., Velez-Justiniano, Y.-A., Kjellerup, B.V., McLean, R.Jc., 2023. Biofilm and human spaceflight. *Biofilm 6*, 100150. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100150

Gomelsky, M., Hoff, W.D., 2011. Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends in Microbiology 19*, 441–448. https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.05.002

Gomez, S., Bureau, L., John, K., Chêne, E.-N., Débarre, D., Lecuyer, S., 2023. Substrate stiffness impacts early biofilm formation by modulating *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility. *eLife 12*, e81112. https://doi.org/10.7554/eLife.81112

Goodman, M.B., Haswell, E.S., Vásquez, V., 2023. Mechanosensitive membrane proteins: Usual and unusual suspects in mediating mechanotransduction. *Journal of General Physiology 155*, e202213248. https://doi.org/10.1085/jgp.202213248

Goodman, A. E., Marshall, K. C, 1995. Genetic responses of bacteria at Surfaces. *Microbial Biofilms*, 80-98.

Gordon, V.D., Wang, L., 2019. Bacterial mechanosensing: the force will be with you, always. *Journal of Cell Science 132*, jcs227694. https://doi.org/10.1242/jcs.227694

Gottenbos, B., 2001. The development of antimicrobial biomaterial surfaces. University Library Groningen.

Grognot, M., Taute, K.M., 2021. More than propellers: how flagella shape bacterial motility behaviors. *Current Opinion in Microbiology 61*, 73–81. https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.02.005

Grossart, H.-P., Steward, G.F., Martinez, J., Azam, F., 2000. A Simple, Rapid Method for Demonstrating Bacterial Flagella. *Applied and Environmental Microbiology 66*, 3632–3636. https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3632-3636.2000

Guégan, C., Garderes, J., Le Pennec, G., Gaillard, F., Fay, F., Linossier, I., Herry, J.-M., Fontaine, M.-N.B., Réhel, K.V., 2014. Alteration of bacterial adhesion induced by the substrate stiffness. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 114*, 193–200. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.010

Gumerov, V.M., Ortega, D.R., Adebali, O., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B., 2020. MiST 3.0: an updated microbial signal transduction database with an emphasis on chemosensory systems. *Nucleic Acids Research 48*, D459–D464. https://doi.org/10.1093/nar/gkz988

Guo, Q., Chen, B., Tu, Y., Du, S., Chen, X., 2019. Prophage LambdaSo uses replication interference to suppress reproduction of coexisting temperate phage MuSo2 in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Environmental Microbiology 21*, 2079–2094. https://doi.org/10.1111/1462-2920.14592

Guttenplan, S. B., Shaw, S., Kearns, D. B., 2013. The cell biology of peritrichous flagella in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology 87*(1), 211-229.

Güvener, Z.T., Harwood, C.S., 2007. Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Molecular Microbiology 66*, 1459–1473. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06008.x

Guyon, É., Hulin, J. P., Petit, L., 2012. Hydrodynamique physique 3e édition EDP sciences.

Haas, B., Matson, J., DiRita, V., Biteen, J., 2014. Imaging Live Cells at the Nanometer-Scale with Single-Molecule Microscopy: Obstacles and Achievements in Experiment Optimization for Microbiology. *Molecules 19*, 12116–12149. https://doi.org/10.3390/molecules190812116

Haas, R., Gutman, J., Wardrip, N.C., Kawahara, K., Uhl, W., Herzberg, M., Arnusch, C.J., 2015. Glycosphingolipids Enhance Bacterial Attachment and Fouling of Nanofiltration Membranes. *Environmental Science & Technology Letters 2*, 43–47. https://doi.org/10.1021/ez500409h

Hakim, T., Lekchiri, S., Amine Afilal, M.E., Ellouali, M., Zahir, H., Latrache, H., 2020. Modifying Supports Surfaces by Dairy Wastewater Conditioning Film and Relationship with Initial Bacterial Adhesion. *Biosciences Biotechnology Research Asia 17*, 525–533. https://doi.org/10.13005/bbra/2856

Hallinen, K.M., Bodine, S.P., Stone, H.A., Muir, T.W., Wingreen, N.S., Gitai, Z., 2025. Bacterial species with different nanocolony morphologies have distinct flow-dependent colonization behaviors. *Proceedings of the National Academy of Sciences 122*, e2419899122. https://doi.org/10.1073/pnas.2419899122

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology 2*, 95–108. https://doi.org/10.1038/nrmicro821

Halte, M., Popp, P. F., Hathcock, D., Severn, J., Fischer, S., Goosmann, C., Renault, T. T., 2025. Bacterial motility depends on a critical flagellum length and energy-optimized assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences 122*(11), e2413488122.

Haswell, E.S., Phillips, R., Rees, D.C., 2011. Mechanosensitive Channels: What Can They Do and How Do They Do It? *Structure 19*, 1356–1369. https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.005

Hatzinger, P.B., Palmer, P., Smith, R.L., Peñarrieta, C.T., Yoshinari, T., 2003. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods 52*, 47–58. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00132-X

Hau, H.H., Gralnick, J.A., 2007. Ecology and Biotechnology of the Genus *Shewanella*. *Annual Review of Microbiology 61*, 237–258. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093257

Hayes, S.A., Dice, J.F., 1996. Roles of molecular chaperones in protein degradation. *The Journal of cell biology 132*, 255–258. https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.255

He, X., Zhang, W., Feng, P., Mai, Z., Gong, X., Zhang, G., 2023. Role of surface coverage of sessile probiotics in their interplay with pathogen bacteria investigated by digital holographic microscopy. *Langmuir 39*(48), 17308-17317.

Hebisch, E., Knebel, J., Landsberg, J., Frey, E., Leisner, M., 2013. High Variation of Fluorescence Protein Maturation Times in Closely Related *Escherichia coli* Strains. *PLoS ONE 8*, e75991. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075991

Heidelberg, J.F., Paulsen, I.T., Nelson, K.E., Gaidos, E.J., Nelson, W.C., Read, T.D., Eisen, J.A., Seshadri, R., Ward, N., Methe, B., Clayton, R.A., Meyer, T., Tsapin, A., Scott, J., Beanan, M., Brinkac, L., Daugherty, S., DeBoy, R.T., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Haft, D.H., Kolonay, J.F., Madupu, R., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Wolf, A.M., Vamathevan, J., Weidman, J., Impraim, M., Lee, K., Berry, K., Lee, C., Mueller, J., Khouri, H., Gill, J., Utterback, T.R., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Smith, H.O., Venter, J.C., Nealson, K.H., Fraser, C.M., 2002. Genome sequence of the dissimilatory metal ion–reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nature Biotechnology 20*, 1118–1123. https://doi.org/10.1038/nbt749

Helena-Bueno, K., Chan, L.I., Melnikov, S.V., 2024. Rippling life on a dormant planet: hibernation of ribosomes, RNA polymerases, and other essential enzymes. *Frontiers in Microbiology 15*, 1386179. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1386179

Helmann, J.D., 2019. Where to begin? Sigma factors and the selectivity of transcription initiation in bacteria. *Molecular Microbiology 112*, 335–347. https://doi.org/10.1111/mmi.14309

Hendrick, J.P., Hartl, F.U., 1995. The role of molecular chaperones in protein folding. *The FASEB Journal 9*, 1559–1569. https://doi.org/10.1096/fasebj.9.15.8529835

Heo, M., Nord, A.L., Chamousset, D., Van Rijn, E., Beaumont, H.J.E., Pedaci, F., 2017. Impact of fluorescent protein fusions on the bacterial flagellar motor. *Scientific Reports 7*, 12583. https://doi.org/10.1038/s41598-017-11241-w

Herman, P., El-Kirat-Chatel, S., Beaussart, A., Geoghegan, J.A., Foster, T.J., Dufrêne, Y.F., 2014. The binding force of the staphylococcal adhesin SdrG is remarkably strong. *Molecular Microbiology 93*, 356–368. https://doi.org/10.1111/mmi.12663

Heureaux, J., Chen, D., Murray, V.L., Deng, C.X., Liu, A.P., 2014. Activation of a Bacterial Mechanosensitive Channel in Mammalian Cells by Cytoskeletal Stress. *Cellular and Molecular Bioengineering 7*, 307–319. https://doi.org/10.1007/s12195-014-0337-8

Heyde, M., Portalier, R. ,1987. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12 by pH. *Molecular and General Genetics MGG 208*(3), 511-517.

Hill, J., Kalkanci, O., McMurry, J.L., Koser, H., 2007. Hydrodynamic Surface Interactions Enable *Escherichia Coli* to Seek Efficient Routes to Swim Upstream. *Physical Review Letters 98*, 068101. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.068101

Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L., O'Toole, G.A., 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology 49*, 905–918. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03615.x

Hintsche, M., Waljor, V., Großmann, R., Kühn, M.J., Thormann, K.M., Peruani, F., Beta, C., 2017. A polar bundle of flagella can drive bacterial swimming by pushing, pulling, or coiling around the cell body. *Scientific Reports 7*, 16771. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16428-9

Hochbaum, A.I., Aizenberg, J., 2010. Bacteria Pattern Spontaneously on Periodic Nanostructure Arrays. *Nano Letters 10*, 3717–3721. https://doi.org/10.1021/nl102290k

Hoeniger, J.F.M., 1964. Cellular changes accompanying the swarming of *Proteus Mirabilis*: I. Observations of living cultures. *Canadian Journal of Microbiology 10*, 1–9. https://doi.org/10.1139/m64-001

Hogan, K., Paul, S., Lin, G., Fuerte-Stone, J., Sokurenko, E.V., Thomas, W.E., 2023. Effect of Gravity on Bacterial Adhesion to Heterogeneous Surfaces. *Pathogens 12*, 941. https://doi.org/10.3390/pathogens12070941

Holtappels, M., Vrancken, K., Schoofs, H., Deckers, T., Remans, T., Noben, J.P., Valcke, R., 2015. A comparative proteome analysis reveals flagellin, chemotaxis regulated proteins and amylovoran to be involved in virulence differences between *Erwinia amylovora* strains. *Journal of Proteomics 123*, 54–69. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.036

Honda, T., Cremer, J., Mancini, L., Zhang, Z., Pilizota, T., Hwa, T., 2022. Coordination of gene expression with cell size enables *Escherichia coli* to efficiently maintain motility across conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences 119*, e2110342119. https://doi.org/10.1073/pnas.2110342119

Hong, Y., Brown, D.G., 2010. Alteration of bacterial surface electrostatic potential and pH upon adhesion to a solid surface and impacts to cellular bioenergetics. *Biotechnology and Bioengineering 105*, 965–972. https://doi.org/10.1002/bit.22606

Hook, A. L., Flewellen, J. L., Dubern, J. F., Carabelli, A. M., Zaid, I. M., Berry, R. M., Alexander, M. R., 2019. Simultaneous tracking of *Pseudomonas aeruginosa* motility in liquid and at the solid-liquid interface reveals differential roles for the flagellar stators. *MSystems 4*(5), 10-1128.

Hori, K., Matsumoto, S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal 48*, 424–434. https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014

Hou, J., Veeregowda, D.H., van de Belt-Gritter, B., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., 2018. Extracellular Polymeric Matrix Production and Relaxation under Fluid Shear and Mechanical Pressure in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology 84*, e01516-17. https://doi.org/10.1128/AEM.01516-17

Houry, A., Gohar, M., Deschamps, J., Tischenko, E., Aymerich, S., Gruss, A., Briandet, R., 2012. Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences 109*, 13088–13093. https://doi.org/10.1073/pnas.1200791109

Howard, E.C., Hamdan, L.J., Lizewski, S.E., Ringeisen, B.R., 2012. High frequency of glucose-utilizing mutants in *Shewanella oneidensis* MR-1. *FEMS Microbiology Letters 327*, 9–14. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02450.x

Huang, Y., Chen, W., Chung, J., Yin, J., Yoon, J., 2021. Recent progress in fluorescent probes for bacteria. *Chemical Society Reviews 50*, 7725–7744. https://doi.org/10.1039/D0CS01340D

Hwang, G., Liang, J., Kang, S., Tong, M., Liu, Y., 2013. The role of conditioning film formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhesion to inert surfaces in aquatic environments. *Biochemical Engineering Journal 76*, 90–98. https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.024

Icha, J., Weber, M., Waters, J.C., Norden, C., 2017. Phototoxicity in live fluorescence microscopy, and how to avoid it. *BioEssays 39*, 1700003. https://doi.org/10.1002/bies.201700003

Ikeda, S., Takamatsu, Y., Tsuchiya, M., Suga, K., Tanaka, Y., Kouzuma, A., Watanabe, K., 2021. *Shewanella oneidensis* MR-1 as a bacterial platform for electro-biotechnology. *Essays in Biochemistry 65*, 355–364. https://doi.org/10.1042/EBC20200178

Imlay, J.A., 2015. Transcription Factors That Defend Bacteria Against Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Microbiology 69*, 93–108. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104322

Irving, S.E., Choudhury, N.R., Corrigan, R.M., 2021. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nature Reviews Microbiology 19*, 256–271. https://doi.org/10.1038/s41579-020-00470-y

Ishimoto, K., 2023. Jeffery's orbits and microswimmers in flows: A theoretical review. *Journal of the Physical Society of Japan 92*(6), 062001.

Islam, N., Kim, Y., Ross, J.M., Marten, M.R., 2014. Proteomic analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm cells grown under physiologically relevant fluid shear stress conditions. *Proteome Science 12*, 21. https://doi.org/10.1186/1477-5956-12-21

Ivanova, E.P., Truong, V.K., Webb, H.K., Baulin, V.A., Wang, J.Y., Mohammodi, N., Wang, F., Fluke, C., Crawford, R.J., 2011. Differential attraction and repulsion of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on molecularly smooth titanium films. *Scientific Reports 1*, 165. https://doi.org/10.1038/srep00165

Jahnke, J.P., Cornejo, J.A., Sumner, J.J., Schuler, A.J., Atanassov, P., Ista, L.K., 2016. Conjugated gold nanoparticles as a tool for probing the bacterial cell envelope: The case of *Shewanella oneidensis* MR-1. *Biointerphases 11*, 011003. https://doi.org/10.1116/1.4939244

Jeanneret, R., Pushkin, D.O., Polin, M., 2019. Confinement enhances the diversity of microbial flow fields. *Physical Review Letters 123*, 248102. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.123.248102

Jeckel, H., Drescher, K., 2021. Advances and opportunities in image analysis of bacterial cells and communities. *FEMS Microbiology Reviews 45*, fuaa062. https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa062

Jeffery, G. B., 1922. The motion of ellipsoidal particles immersed in a viscous fluid. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing papers of a mathematical and physical character 102*(715), 161-179.

Jericho, S.K., Klages, P., Nadeau, J., Dumas, E.M., Jericho, M.H., Kreuzer, H.J., 2010. In-line digital holographic microscopy for terrestrial and exobiological research. *Planetary and Space Science 58*, 701–705. https://doi.org/10.1016/j.pss.2009.07.012

Jeong, H.E., Kim, I., Karam, P., Choi, H.-J., Yang, P., 2013. Bacterial Recognition of Silicon Nanowire Arrays. *Nano Letters 13*, 2864–2869. https://doi.org/10.1021/nl401205b

Jiang, Y., Idikuda, V., Chanda, B., 2021. Preparation of Giant *Escherichia coli* spheroplasts for Electrophysiological Recordings. *Bio-Protocol 11*. https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4261

Jie, K., Liu, X., Hou, J., Xie, P., Tang, J., Gao, H., 2025. Regulation of iron homeostasis by Fur and atypical response regulator SsoR via derepressor-inhibitor oscillation in *Shewanella oneidensis*. *Applied and Environmental Microbiology 91*, e01230-25. https://doi.org/10.1128/aem.01230-25

Jikeli, J.F., Alvarez, L., Friedrich, B.M., Wilson, L.G., Pascal, R., Colin, R., Pichlo, M., Rennhack, A., Brenker, C., Kaupp, U.B., 2015. Sperm navigation along helical paths in 3D chemoattractant landscapes. *Nature Communications 6*, 7985. https://doi.org/10.1038/ncomms8985

Jin, D.J., Zhou, Y.N., Shaw, G., Ji, X., 2011. Structure and function of RapA: A bacterial Swi2/Snf2 protein required for RNA polymerase recycling in transcription. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms 1809*, 470–475. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.03.003

Jing, G., Zöttl, A., Clément, É., Lindner, A., 2020. Chirality-induced bacterial rheotaxis in bulk shear flows. *Science Advances 6*, eabb2012. https://doi.org/10.1126/sciadv.abb2012

Junot, G., 2019. Transport of active bacteria: from micro-scale processes to macroscopic hydrodynamic dispersion. Doctoral dissertation, Sorbonne Université.

Junot, G., Darnige, T., Lindner, A., Martinez, V.A., Arlt, J., Dawson, A., Poon, W.C.K., Auradou, H., Clément, E., 2022. Run-to-Tumble Variability Controls the Surface Residence Times of *E. coli* Bacteria. *Physical Review Letters 128*, 248101. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.128.248101

Junot, G., Figueroa-Morales, N., Darnige, T., Lindner, A., Soto, R., Auradou, H., Clément, E., 2019. Swimming bacteria in Poiseuille flow: the quest for active Bretherton-Jeffery trajectories. *Europhysics Letters 126*, 44003. https://doi.org/10.1209/0295-5075/126/44003

Kaila, V.R.I., Wikström, M., 2021. Architecture of bacterial respiratory chains. *Nature Reviews Microbiology 19*, 319–330. https://doi.org/10.1038/s41579-020-00486-4

Kalir, S., McClure, J., Pabbaraju, K., Southward, C., Ronen, M., Leibler, S., Surette, M.G., Alon, U., 2001. Ordering Genes in a Flagella Pathway by Analysis of Expression Kinetics from Living Bacteria. *Science 292*, 2080–2083. https://doi.org/10.1126/science.1058758

Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., Tanabe, M., 2016. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research 44*, D457–D462. https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070

Kanjee, U., Gutsche, I., Alexopoulos, E., Zhao, B., El Bakkouri, M., Thibault, G., Liu, K., Ramachandran, S., Snider, J., Pai, E.F., Houry, W.A., 2011. Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase: Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses. *The EMBO Journal 30*, 931–944. https://doi.org/10.1038/emboj.2011.5

Kao, W.K., Gagnon, P.M., Vogel, J.P., Chole, R.A., 2017. Surface charge modification decreases *Pseudomonas aeruginosa* adherence in vitro and bacterial persistence in an in vivo implant model. *The Laryngoscope 127*, 1655–1661. https://doi.org/10.1002/lary.26499

Kaplan, M., Ghosal, D., Subramanian, P., Oikonomou, C. M., Kjaer, A., Pirbadian, S.& Jensen, G. J., 2019. The presence and absence of periplasmic rings in bacterial flagellar motors correlates with stator type. *Elife 8*, e43487

Karimi, A., Karig, D., Kumar, A., Ardekani, A.M., 2015. Interplay of physical mechanisms and biofilm processes: review of microfluidic methods. *Lab on a Chip 15*, 23–42. https://doi.org/10.1039/C4LC01095G

Katz, J., Sheng, J., 2010. Applications of Holography in Fluid Mechanics and Particle Dynamics. *Annual Review of Fluid Mechanics 42*, 531–555. https://doi.org/10.1146/annurev-fluid-121108-145508

Kaya, T., Koser, H., 2012. Direct Upstream Motility in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal 102*, 1514–1523. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.001

Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology 8*, 634–644. https://doi.org/10.1038/nrmicro2405

Kerrigan, S.W., Clarke, N., Loughman, A., Meade, G., Foster, T.J., Cox, D., 2008. Molecular Basis for *Staphylococcus aureus* –Mediated Platelet Aggregate Formation Under Arterial Shear In Vitro. *Asteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 28*, 335–340. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.152058

Keskin, D., Mergel, O., Van Der Mei, H.C., Busscher, H.J., Van Rijn, P., 2019. Inhibiting Bacterial Adhesion by Mechanically Modulated Microgel Coatings. *Biomacromolecules 20*, 243–253. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01378

Khong, N.Z.-J., Zeng, Y., Lai, S.-K., Koh, C.-G., Liang, Z.-X., Chiam, K.-H., Li, H.-Y., 2021. Dynamic swimming pattern of *Pseudomonas aeruginosa* near a vertical wall during initial attachment stages of biofilm formation. *Scientific Reports 11*, 1952. https://doi.org/10.1038/s41598-021-81621-w

Kim, D., Kim, Y., Lim, S., 2022. Effects of swimming environment on bacterial motility. *Physics of Fluids 34*, 031907. https://doi.org/10.1063/5.0082768

Kim, J., Lee, S.J., 2024. Digital in-line holographic microscopy for label-free identification and tracking of biological cells. *Military Medical Research 11*, 38. https://doi.org/10.1186/s40779-024-00541-8

Kim, J., Park, H.-D., Chung, S., 2012. Microfluidic Approaches to Bacterial Biofilm Formation. *Molecules 17*, 9818–9834. https://doi.org/10.3390/molecules17089818

Kim, M.-C., Klapperich, C., 2010. A new method for simulating the motion of individual ellipsoidal bacteria in microfluidic devices. *Lab on a Chip 10*, 2464. https://doi.org/10.1039/c003627g

Kim, M.K., 2010. Principles and techniques of digital holographic microscopy. *Journal of Photonics for Energy 018005*. https://doi.org/10.1117/6.0000006

Kim, Y., Bang, H., 2019. Introduction to Kalman Filter and Its Applications, in: Govaers, F. (Ed.), Introduction and Implementations of the Kalman Filter. *IntechOpen*. https://doi.org/10.5772/intechopen.80600

Kim, Y. C., 1996. Diffusivity of bacteria. *Korean Journal of Chemical Engineering 13*(3), 282-287.

Kimkes, T.E.P., Heinemann, M., 2020. How bacteria recognise and respond to surface contact. *FEMS Microbiology Reviews 44*, 106–122. https://doi.org/10.1093/femsre/fuz029

Kjelleberg, S., Humphrey, B.A., Marshall, K.C., 1982. Effect of Interfaces on Small, Starved Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology 43*, 1166–1172. https://doi.org/10.1128/aem.43.5.1166-1172.1982

Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology 48*, 1511–1524. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x

Klein, A., Toth, B., Jankovics, H., Muskotal, A., Vonderviszt, F., 2012. A polymerizable GFP variant. *Protein Engineering Design and Selection 25*, 153–157. https://doi.org/10.1093/protein/gzs003

Klopffer, L., Louvet, N., Becker, S., Fix, J., Pradalier, C., Mathieu, L., 2024. Effect of shear rate on early *Shewanella oneidensis* adhesion dynamics monitored by deep learning. *Biofilm 8*, 100240. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100240

Kloska, A., Cech, G.M., Sadowska, M., Krause, K., Szalewska-Pałasz, A., Olszewski, P., 2020. Adaptation of the Marine Bacterium *Shewanella baltica* to Low Temperature Stress. *IJMS 21*, 4338. https://doi.org/10.3390/ijms21124338

Kniggendorf, A.-K., Nogueira, R., Kelb, C., Schadzek, P., Meinhardt-Wollweber, M., Ngezahayo, A., Roth, B., 2016. Confocal Raman microscopy and fluorescent in situ hybridization – A complementary approach for biofilm analysis. *Chemosphere 161*, 112–118. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.096

Knodler, L.A., Bestor, A., Ma, C., Hansen-Wester, I., Hensel, M., Vallance, B.A., Steele-Mortimer, O., 2005. Cloning Vectors and Fluorescent Proteins Can Significantly Inhibit *Salmonella enterica* Virulence in Both Epithelial Cells and Macrophages: Implications for Bacterial Pathogenesis Studies. *Infection and Immunity 73*, 7027–7031. https://doi.org/10.1128/IAI.73.10.7027-7031.2005

Ko, C.-H., Elimelech, M., 2000. The "Shadow Effect" in Colloid Transport and Deposition Dynamics in Granular Porous Media: Measurements and Mechanisms. *Environmental Science & Technology 34*, 3681–3689. https://doi.org/10.1021/es0009323

Koerdt, A., Paulick, A., Mock, M., Jost, K., Thormann, K.M., 2009. MotX and MotY Are Required for Flagellar Rotation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology 191*, 5085–5093. https://doi.org/10.1128/JB.00206-09

Koike, M., Nishioka, N., Kojima, S., Homma, M., 2011. Characterization of the flagellar motor composed of functional GFP-fusion derivatives of FliG in the Na+-driven polar flagellum of *Vibrio alginolyticus. Biophysics 7*, 59–67. https://doi.org/10.2142/biophysics.7.59

Kolewe, K.W., Peyton, S.R., Schiffman, J.D., 2015. Fewer Bacteria Adhere to Softer Hydrogels. *ACS Applied Materials & Interfaces 7*, 19562–19569. https://doi.org/10.1021/acsami.5b04269

Koo, H., Allan, R.N., Howlin, R.P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., 2017. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology 15*, 740–755. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.99

Korber, D.R., Lawrence, J.R., Sutton, B., Caldwell, D.E., 1989. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot+ and Mot− *Pseudomonas fluorescens*. *Microbial Ecology 18*, 1–19. https://doi.org/10.1007/BF02011692

Korber, D.R., Lawrence, J.R., Zhang, L., Caldwell, D.E., 1990. Effect of gravity on bacterial deposition and orientation in laminar flow environments. *Biofouling 2*, 335–350. https://doi.org/10.1080/08927019009378155

Korenevsky, A.A., Vinogradov, E., Gorby, Y., Beveridge, T.J., 2002. Characterization of the Lipopolysaccharides and Capsules of *Shewanella* spp. *Applied and Environmental Microbiology 68*, 4653–4657. https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4653-4657.2002

Korenevsky, Anton., Beveridge, T.J., 2007. The surface physicochemistry and adhesiveness of *Shewanella* are affected by their surface polysaccharides. *Microbiology 153*, 1872–1883. https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003814-0

Kouzuma, A., Oba, H., Tajima, N., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2014. Electrochemical selection and characterization of a high current-generating *Shewanella oneidensis* mutant with altered cell-surface morphology and biofilm-related gene expression. *BMC Microbiology 14*, 190. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-190

Kovačević, D., Pratnekar, R., Godič Torkar, K., Salopek, J., Dražić, G., Abram, A., Bohinc, K., 2016. Influence of Polyelectrolyte Multilayer Properties on Bacterial Adhesion Capacity. *Polymers 8*, 345. https://doi.org/10.3390/polym8100345

Krapf, M.-E.M., Lartiges, B., Merlin, C., Francius, G., Ghanbaja, J., Duval, J.F.L., 2016. Deciphering the aggregation mechanism of bacteria (*Shewanella oneidensis* MR-1) in the presence of polyethyleneimine: Effects of the exopolymeric superstructure and polymer molecular weight. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 139*, 285–293. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.015

Krasowska, A., Sigler, K., 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 4*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112

Krause, B., Nealson, K.H., 1997. Physiology and enzymology involved in denitrification by *Shewanella putrefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology 63*, 2613–2618. https://doi.org/10.1128/aem.63.7.2613-2618.1997

Krekeler, D., Teske, A., Cypionka, H., 1998. Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiology Ecology 25*, 89–96. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00462.x

Kreve, S., Reis, A.C.D., 2021. Bacterial adhesion to biomaterials: What regulates this attachment? A review. *Japanese Dental Science Review 57*, 85–96. https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.05.003

Krsmanovic, M., Biswas, D., Ali, H., Kumar, A., Ghosh, R., Dickerson, A.K., 2021. Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. *Advances in Colloid and Interface Science 288*, 102336. https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102336

Kühlbrandt, W., 2019. Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annual Review of Biochemistry 88*, 515–549. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-110903

Kühn, J., Niraula, B., Liewer, K., Kent Wallace, J., Serabyn, E., Graff, E., Nadeau, J. L., 2014. A Mach-Zender digital holographic microscope with sub-micrometer resolution for imaging and tracking of marine micro-organisms. *Review of Scientific Instruments 85*(12).

Kühn, M.J., Schmidt, F.K., Eckhardt, B., Thormann, K.M., 2017. Bacteria exploit a polymorphic instability of the flagellar filament to escape from traps. *Proceedings of the National Academy of Sciences 114*, 6340–6345. https://doi.org/10.1073/pnas.1701644114

Kühn, M.J., Schmidt, F.K., Farthing, N.E., Rossmann, F.M., Helm, B., Wilson, L.G., Eckhardt, B., Thormann, K.M., 2018. Spatial arrangement of several flagellins within bacterial flagella improves motility in different environments. *Nature Communications 9*, 5369. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07802-w

Kumar, A., Karig, D., Acharya, R., Neethirajan, S., Mukherjee, P.P., Retterer, S., Doktycz, M.J., 2013. Microscale confinement features can affect biofilm formation. *Microfluidics and Nanofluidics 14*, 895–902. https://doi.org/10.1007/s10404-012-1120-6

Kumar, A., Karig, D., Neethirajan, S., Suresh, A.K., Srijanto, B.R., Mukherjee, P.P., Retterer, S., Doktycz, M.J., 2012. Adhesion and Formation of Microbial Biofilms in Complex Microfluidic Devices. Presented at the ASME 2012 Third International Conference on Micro/Nanoscale Heat and Mass Transfer, American Society of Mechanical Engineers, Atlanta, Georgia, USA, pp. 79–84. https://doi.org/10.1115/MNHMT2012-75207

Kumar, S., Hong, J., 2025. A review of 3D particle tracking and flow diagnostics using digital holography. *Measurement Science and Technology.* https://doi.org/10.1088/1361-6501/adabff

La Spina, R., António, D.C., Desmet, C., Valsesia, A., Bombera, R., Norlén, H., Lettieri, T., Colpo, P., 2019. Dark Field Microscopy-Based Biosensors for the Detection of *E. coli* in Environmental Water Samples. *Sensors 19*, 4652. https://doi.org/10.3390/s19214652

Lang, M., Krin, E., Korlowski, C., Sismeiro, O., Varet, H., Coppée, J.-Y., Mazel, D., Baharoglu, Z., 2021. Sleeping ribosomes: Bacterial signaling triggers RaiA mediated persistence to aminoglycosides. *iScience 24*, 103128. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103128

Laplace, B., 2022. Etude expérimentale de la sédimentation de particules inertielles en turbulence. Doctoral dissertation, Université de Lyon.

Lasa, I., Penadés, J.R., 2006. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Research in Microbiology 157*, 99–107. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003

Lashgari, I., Picano, F., Breugem, W.-P., Brandt, L., 2014. Laminar, Turbulent, and Inertial Shear-Thickening Regimes in Channel Flow of Neutrally Buoyant Particle Suspensions. *Physical Review Letters 113*, 254502. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.254502

Latychevskaia, T., Fink, H.-W., 2007. Solution to the Twin Image Problem in Holography. *Physical Review Letters 98*, 233901. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.233901

Lauga, E., 2016. Bacterial Hydrodynamics. *Annual Review of Fluid Mechanics 48*, 105–130. https://doi.org/10.1146/annurev-fluid-122414-034606

Lauga, E., DiLuzio, W.R., Whitesides, G.M., Stone, H.A., 2006. Swimming in Circles: Motion of Bacteria near Solid Boundaries. *Biophysical Journal 90*, 400–412. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.069401

Lauga, E., Powers, T.R., 2009. The hydrodynamics of swimming microorganisms. *Reports on Progress in Physics 72*, 096601. https://doi.org/10.1088/0034-4885/72/9/096601

Laursen, B.S., Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U., 2005. Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews 69*, 101–123. https://doi.org/10.1128/MMBR.69.1.101-123.2005

Laventie, B.-J., Jenal, U., 2020. Surface Sensing and Adaptation in Bacteria. *Annual Review of Microbiology 74*, 735–760. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-012120-063427

Le Laz, S., Kpebe, A., Bauzan, M., Lignon, S., Rousset, M., Brugna, M., 2016. Expression of terminal oxidases under nutrient-starved conditions in *Shewanella oneidensis*: detection of the A-type cytochrome c oxidase. *Scientific Reports 6*, 19726. https://doi.org/10.1038/srep19726

Le Laz, S., Kpebe, A., Bauzan, M., Lignon, S., Rousset, M., Brugna, M., 2014. A Biochemical Approach to Study the Role of the Terminal Oxidases in Aerobic Respiration in *Shewanella oneidensis* MR-1. *PLoS ONE 9*, e86343. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086343

Leaphart, A.B., Thompson, D.K., Huang, K., Alm, E., Wan, X.-F., Arkin, A., Brown, S.D., Wu, L., Yan, T., Liu, X., Wickham, G.S., Zhou, J., 2006. Transcriptome Profiling of *Shewanella oneidensis* Gene Expression following Exposure to Acidic and Alkaline pH. *Journal of Bacteriology 188*, 1633–1642. https://doi.org/10.1128/JB.188.4.1633-1642.2006

Learman, D.R., Yi, H., Brown, S.D., Martin, S.L., Geesey, G.G., Stevens, A.M., Hochella, M.F., 2009. Involvement of *Shewanella oneidensis* MR-1 LuxS in Biofilm Development and Sulfur Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology 75*, 1301–1307. https://doi.org/10.1128/AEM.01393-08

Lecuyer, S., Rusconi, R., Shen, Y., Forsyth, A., Vlamakis, H., Kolter, R., Stone, H.A., 2011. Shear Stress Increases the Residence Time of Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical Journal 100*, 341–350. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.11.078

Lee, C.K., Kim, A.J., Santos, G.S., Lai, P.Y., Lee, S.Y., Qiao, D.F., Anda, J.D., Young, T.D., Chen, Y., Rowe, A.R., Nealson, K.H., Weiss, P.S., Wong, G.C.L., 2016. Evolution of Cell Size Homeostasis and Growth Rate Diversity during Initial Surface Colonization of *Shewanella oneidensis*. *ACS Nano 10*, 9183–9192. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b05123

Lee, J.-H., Kaplan, J.B., Lee, W.Y., 2008. Microfluidic devices for studying growth and detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Biomedical Microdevices 10*, 489–498. https://doi.org/10.1007/s10544-007-9157-0

Lee, Y. J., Kim, J. H., 1986. A review of holography applications in multiphase flow visualization study.

Lefèvre, C.T., Bazylinski, D.A., 2013. Ecology, Diversity, and Evolution of Magnetotactic Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews 77*, 497–526. https://doi.org/10.1128/MMBR.00021-13

Leff, L.G., Leff, A.A., 1996. Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology 62*, 3486–3488. https://doi.org/10.1128/aem.62.9.3486-3488.1996

Lele, P.P., Hosu, B.G., Berg, H.C., 2013. Dynamics of mechanosensing in the bacterial flagellar motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences 110*, 11839–11844. https://doi.org/10.1073/pnas.1305885110

Lemaire, O.N., Méjean, V., Iobbi-Nivol, C., 2020. The *Shewanella* genus: ubiquitous organisms sustaining and preserving aquatic ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews 44*, 155–170. https://doi.org/10.1093/femsre/fuz031

Lemelle, L., Cajgfinger, T., Nguyen, C.C., Dominjon, A., Place, C., Chatre, E., Barbier, R., Palierne, J.-F., Vaillant, C., 2020. Tumble Kinematics of *Escherichia coli* near a Solid Surface. *Biophysical Journal 118*, 2400–2410. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.03.024

Lemos, M., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M., 2015. The effect of shear stress on the formation and removal of *Bacillus cereus* biofilms. *Food and Bioproducts Processing 93*, 242–248. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.005

Levina, N., 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *The EMBO Journal 18*, 1730–1737. https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1730

Lewandowski, Z., Beyenal, H., 2013. Fundamentals of biofilm research. CRC press

Li, G., Bensson, J., Nisimova, L., Munger, D., Mahautmr, P., Tang, J. X., Brun, Y. V., 2011a. Accumulation of swimming bacteria near a solid surface. *Physical Review E—Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics 84*(4), 041932.

Li, G. J., Ardekani, A. M., 2014. Hydrodynamic interaction of microswimmers near a wall. *Physical Review E 90*(1), 013010.

Li, G., Tam, L.-K., Tang, J.X., 2008. Amplified effect of Brownian motion in bacterial near-surface swimming. *Proceedings of the National Academy of Sciences 105*, 18355–18359. https://doi.org/10.1073/pnas.0807305105

Li, G., Tang, J. X., 2009. Accumulation of Microswimmers near a Surface Mediated by Collision and Rotational Brownian Motion. *Physical review letters 103*(7), 078101.

Li, H., Sourjik, V., 2011. Assembly and stability of flagellar motor in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology 80*, 886–899. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07557.x

Li, J., Busscher, H.J., Norde, W., Sjollema, J., 2011b. Analysis of the contribution of sedimentation to bacterial mass transport in a parallel plate flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 84*, 76–81. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.018

Li, X., Song, Y., Glidle, A., Smith, C., Sloan, W., Cusack, M., Yin, H., 2025. A simple three-dimensional microfluidic platform for studying chemotaxis and cell sorting. *Lab on a Chip 25*, 343–353. https://doi.org/10.1039/D4LC00892H

Liang, Y., Gao, H., Guo, X., Chen, J., Qiu, G., He, Z., Zhou, J., Liu, X., 2012. Transcriptome analysis of pellicle formation of *Shewanella oneidensis*. *Archives of Microbiology 194*, 473–482. https://doi.org/10.1007/s00203-011-0782-x

Libchaber, A., 2019. From Biology to Physics and Back: The Problem of Brownian Movement. *Annual Review of Condensed Matter Physics 10*, 275–293. https://doi.org/10.1146/annurev-conmatphys-031218-013318

Licata, N.A., Mohari, B., Fuqua, C., Setayeshgar, S., 2016. Diffusion of Bacterial Cells in Porous Media. *Biophysical Journal 110*, 247–257. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.035

Lin, T.-Y., Maire, M., Belongie, S., Bourdev, L., Girshick, R., Hays, J., Perona, P., Ramanan, D., Zitnick, C.L., Dollár, P., 2015. Microsoft COCO: Common Objects in Context.

Lipovsky, A., Nitzan, Y., Gedanken, A., Lubart, R., 2010. Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: Implication for wound healing. *Lasers in Surgery and Medicine 42*, 467–472. https://doi.org/10.1002/lsm.20948

Liu, L., Li, S., Wang, S., Dong, Z., Gao, H., 2018. Complex Iron Uptake by the Putrebactin-Mediated and Feo Systems in *Shewanella oneidensis*. *Applied and Environmental Microbiology 84*, e01752-18. https://doi.org/10.1128/AEM.01752-18

Liu, L., Wang, W., Wu, S., Gao, H., 2022. Recent Advances in the Siderophore Biology of *Shewanella*. *Frontiers in Microbiology 13*, 823758. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.823758

Liu, Q., Zhang, C., Zhang, R., Yuan, J., 2024. Speed-dependent bacterial surface swimming. *Applied and Environmental Microbiology 90*, e00508-24. https://doi.org/10.1128/aem.00508-24

Liu, Y., Gao, W., Wang, Y., Wu, L., Liu, X., Yan, T., Alm, E., Arkin, A., Thompson, D.K., Fields, M.W., Zhou, J., 2005. Transcriptome Analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 in Response to Elevated Salt Conditions. *Journal of Bacteriology 187*, 2501–2507. https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2501-2507.2005

Liu, Y., Wang, J.-C., Ren, L., Tu, Q., Liu, W.-M., Wang, X.-Q., Liu, R., Zhang, Y.-R., Wang, J.-Y., 2011. Microfluidics-based assay on the effects of microenvironmental geometry and aqueous flow on bacterial adhesion behaviors. *Journal of Pharmaceutical Analysis 1*, 175–183. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2011.06.001

Liu, Z., Jin, L., Chen, J., Fang, Q., Ablameyko, S., Yin, Z., Xu, Y., 2021. A survey on applications of deep learning in microscopy image analysis. *Computers in Biology and Medicine 134*, 104523. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104523

Liu, Z., Zhang, K., Cheng, X., 2019. Rheology of bacterial suspensions under confinement. *Rheologica Acta 58*, 439–451. https://doi.org/10.1007/s00397-019-01155-x

Lorenzetti, M., Dogša, I., Stošicki, T., Stopar, D., Kalin, M., Kobe, S., Novak, S., 2015. The Influence of Surface Modification on Bacterial Adhesion to Titanium-Based Substrates. *ACS Applied Materials & Interfaces 7*, 1644–1651. https://doi.org/10.1021/am507148n

Lou, Q., Fan, H., Liu, Y., Miller, J.F., Huang, Y., Zhou, Z.H., 2025. Curvature generation and engineering principles from *Shewanella oneidensis* multi-flagellin flagellum. https://doi.org/10.1101/2025.02.07.637127

Loui, C., Chang, A.C., Lu, S., 2009. Role of the ArcAB two-component system in the resistance of *Escherichia coli* to reactive oxygen stress. *BMC Microbiology 9*, 183. https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-183

Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology 15*, 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Lovely, P.S., Dahlquist, F.W., 1975. Statistical measures of bacterial motility and chemotaxis. *Journal of Theoretical Biology 50*, 477–496. https://doi.org/10.1016/0022-5193(75)90094-6

Lu, N., Bevard, T., Massoudieh, A., Zhang, C., Dohnalkova, A.C., Zilles, J.L., Nguyen, T.H., 2013. Flagella-Mediated Differences in Deposition Dynamics for *Azotobacter vinelandii* in Porous Media. *Environmental Science & Technology 47*, 5162–5170. https://doi.org/10.1021/es3053398

Lugagne, J.-B., Lin, H., Dunlop, M.J., 2020. DeLTA: Automated cell segmentation, tracking, and lineage reconstruction using deep learning. *PLoS Computational Biology 16*, e1007673. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007673

Lund, P.A., 2009. Multiple chaperonins in bacteria – why so many? *FEMS Microbiology Reviews 33*, 785–800. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00178.x

Lynch, J.B., James, N., McFall-Ngai, M., Ruby, E.G., Shin, S., Takagi, D., 2022. Transitioning to confined spaces impacts bacterial swimming and escape response. *Biophysical Journal 121*, 2653–2662. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.04.008

Lytle, D.A., Olden, J.D., McMullen, L.E., 2008. Drought-Escape Behaviors Of Aquatic Insects May Be Adaptations To Highly Variable Flow Regimes Characteristic Of Desert Rivers. *The Southwestern Naturalist 53*, 399–402. https://doi.org/10.1894/JS-19.1

Lyu, Z., Yang, A., Villanueva, P., Singh, A., Ling, J., 2021. Heterogeneous Flagellar Expression in Single *Salmonella* Cells Promotes Diversity in Antibiotic Tolerance. *mBio 12*, e02374-21. https://doi.org/10.1128/mBio.02374-21

Madigan, M. T., Martinko, J. M., 2007. Brock : Biologie des micro-organismes (11e édition). Pearson education. France, Paris.

Manz, A., Simone, G., O'Connor, J. S., Neuzil, P. , 2020. *Microfluidics and Lab-on-a-Chip*. Royal Society of Chemistry.

M, S.K., Hong, J., 2025. A review of 3D particle tracking and flow diagnostics using Digital Holography. *Measurement Science and Technology*. https://doi.org/10.1088/1361-6501/adabff

MacDonell, M.T., Colwell, R.R., 1985. Phylogeny of the Vibrionaceae, and Recommendation for Two New Genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and Applied Microbiology 6*, 171–182. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80051-5

Macnab, R.M., 2003. How Bacteria Assemble Flagella. *Annual Review of Microbiology 57*, 77–100. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090832

Maeda, K., Imae, Y., Shioi, J.I., Oosawa, F., 1976. Effect of temperature on motility and chemotaxis of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology 127*, 1039–1046. https://doi.org/10.1128/jb.127.3.1039-1046.1976

Malas, J., Russo, D.C., Bollengier, O., Malaska, M.J., Lopes, R.M.C., Kenig, F., Meyer-Dombard, D.R., 2024. Biological functions at high pressure: transcriptome response of *Shewanella oneidensis* MR-1 to hydrostatic pressure relevant to Titan and other icy ocean worlds. *Frontiers in Microbiology 15*, 1293928. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1293928

Männik, J., Driessen, R., Galajda, P., Keymer, J.E., Dekker, C., 2009. Bacterial growth and motility in sub-micron constrictions. *Proceedings of the National Academy of Sciences 106*, 14861–14866. https://doi.org/10.1073/pnas.0907542106

Marcos, Fu, H.C., Powers, T.R., Stocker, R., 2012. Bacterial rheotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences 109*, 4780–4785. https://doi.org/10.1073/pnas.1120955109

Marcos, Fu, H.C., Powers, T.R., Stocker, R., 2009. Separation of microscale chiral objects by shear flow. *Physical Review Letters 102*, 158103. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.102.158103

Marguier, A., Poulin, N., Soraru, C., Vonna, L., Hajjar-Garreau, S., Kunemann, P., Airoudj, A., Mertz, G., Bardon, J., Delmée, M., Roucoules, V., Ruch, D., Ploux, L., 2020. Bacterial Colonization of Low-Wettable Surfaces is Driven by Culture Conditions and Topography. *Advanced Materials Interfaces 7*, 2000179. https://doi.org/10.1002/admi.202000179

Marshall, K.C., 1988. Adhesion and growth of bacteria at surfaces in oligotrophic habitats. *Canadian Journal of Microbiology 34*, 503–506. https://doi.org/10.1139/m88-086

Marsili, E., Baron, D.B., Shikhare, I.D., Coursolle, D., Gralnick, J.A., Bond, D.R., 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences 105*, 3968–3973. https://doi.org/10.1073/pnas.0710525105

Martinac, B., Rohde, P.R., Cranfield, C.G., Nomura, T., 2013. Patch Clamp Electrophysiology for the Study of Bacterial Ion Channels in Giant Spheroplasts of *E. coli*, in: Delcour, A.H. (Ed.), Bacterial Cell Surfaces. *Methods in Molecular Biology 966*, 367–380. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-245-2_23

Martinez, V.A., Besseling, R., Croze, O.A., Tailleur, J., Reufer, M., Schwarz-Linek, J., Wilson, L.G., Bees, M.A., Poon, W.C.K., 2012. Differential Dynamic Microscopy: A High-Throughput Method for Characterizing the Motility of Microorganisms. *Biophysical Journal 103*, 1637–1647. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.08.045

Martín-Rodríguez, A.J., González-Orive, A., Hernández-Creus, A., Morales, A., Dorta-Guerra, R., Norte, M., Martín, V.S., Fernández, J.J., 2014. On the influence of the culture conditions in bacterial antifouling bioassays and biofilm properties: *Shewanella algae*, a case study. *BMC Microbiology 14*, 102. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-102

Mathieu, L., Bertrand, I., Abe, Y., Angel, E., Block, J.C., Skali-Lami, S., Francius, G., 2014. Drinking water biofilm cohesiveness changes under chlorination or hydrodynamic stress. *Water Research 55*, 175–184. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.054

Mathijssen, A., Figueroa-Morales, N., Junot, G., Clement, E., Lindner, A., Zöttl, A., 2019. Oscillatory surface rheotaxis of swimming *E. coli* bacteria. *Nature Communications 10*, 3434. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11360-0

Matthews, S. A., Coelho, C., Rodriguez Salas, E. E., Brock, E. E., Hodge, V. J., Walker, J. A., Wilson, L. G., 2024. Real-time 3D tracking of swimming microbes using digital holographic microscopy and deep learning. *Plos one 19* (4), e0301182.

Matz, C., Jürgens, K., 2005. High Motility Reduces Grazing Mortality of Planktonic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology 71*, 921–929. https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.921-929.2005

Matzov, D., Bashan, A., Yap, M.F., Yonath, A., 2019. Stress response as implemented by hibernating ribosomes: a structural overview. *The FEBS Journal 286*, 3558–3565. https://doi.org/10.1111/febs.14968

Mazza, M.G., 2016. The Physics of Biofilms -- An Introduction. *Journal of Physics D: Applied Physics 49*, 203001. https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/20/203001

McClaine, J.W., Ford, R.M., 2002. Characterizing the adhesion of motile and nonmotile *Escherichia coli* to a glass surface using a parallel-plate flow chamber. *Biotechnology and Bioengineering 78*, 179–189. https://doi.org/10.1002/bit.10192

Medilanski, E., Kaufmann, K., Wick, L.Y., Wanner, O., Harms, H., 2002. Influence of the Surface Topography of Stainless Steel on Bacterial Adhesion. *Biofouling 18*, 193–203. https://doi.org/10.1080/08927010290011370

Meinders, J.M., Noordmans, J., Busscher, H.J., 1992. Simultaneous monitoring of the adsorption and desorption of colloidal particles during deposition in a parallel plate flow chamber. *Journal of Colloid and Interface Science 152*, 265–280. https://doi.org/10.1016/0021-9797(92)90026-I

Meinders, J.M., Van Der Mei, H.C., Busscher, H.J., 1995. Deposition Efficiency and Reversibility of Bacterial Adhesion under Flow. *Journal of Colloid and Interface Science 176*, 329–341. https://doi.org/10.1006/jcis.1995.9960

Melamed, S., Zhang, A., Jarnik, M., Mills, J., Silverman, A., Zhang, H., Storz, G., 2023. σ28-dependent small RNA regulation of flagella biosynthesis. *eLife 12*, RP87151. https://doi.org/10.7554/eLife.87151

Melanthota, S.K., Gopal, D., Chakrabarti, S., Kashyap, A.A., Radhakrishnan, R., Mazumder, N., 2022. Deep learning-based image processing in optical microscopy. *Biophysical Reviews 14*, 463–481. https://doi.org/10.1007/s12551-022-00949-3

Merritt, J.H., Brothers, K.M., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A., 2007. SadC Reciprocally Influences Biofilm Formation and Swarming Motility via Modulation of Exopolysaccharide Production and Flagellar Function. *Journal of Bacteriology 189*, 8154–8164. https://doi.org/10.1128/JB.00585-07

Minamino, T., Imae, Y., Oosawa, F., Kobayashi, Y., Oosawa, K., 2003. Effect of Intracellular pH on Rotational Speed of Bacterial Flagellar Motors. *Journal of Bacteriology 185*, 1190–1194. https://doi.org/10.1128/JB.185.4.1190-1194.2003

Mitchell, A.M., Silhavy, T.J., 2019. Envelope stress responses: balancing damage repair and toxicity. *Nature Reviews Microbiology 17*, 417–428. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0199-0

Mitchell, J.G., Kogure, K., 2006. Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics: Bacterial motility. *FEMS Microbiology Ecology 55*, 3–16. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2005.00003.x

Mo, J., Raizen, M.G., 2019. Highly Resolved Brownian Motion in Space and in Time. *Annual Review of Fluid Mechanics 51*, 403–428. https://doi.org/10.1146/annurev-fluid-010518-040527

Molaei, M., Barry, M., Stocker, R., Sheng, J., 2014. Failed Escape: Solid Surfaces Prevent Tumbling of *Escherichia coli*. *Physical Review Letters 113*, 068103. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.113.068103

Molaei, M., Sheng, J., 2016. Succeed escape: Flow shear promotes tumbling of *Escherichia coli* near a solid surface. *Scientific Reports 6*, 35290. https://doi.org/10.1038/srep35290

Molaei, M., Sheng, J., 2014. Imaging bacterial 3D motion using digital in-line holographic microscopy and correlation-based de-noising algorithm. *Optics Express 22*, 32119. https://doi.org/10.1364/OE.22.032119

Moller, E., Britt, M., Schams, A., Cetuk, H., Anishkin, A., Sukharev, S., 2023. Mechanosensitive channel MscS is critical for termination of the bacterial hypoosmotic permeability response. *Journal of General Physiology 155*, e202213168. https://doi.org/10.1085/jgp.202213168

Mondino, S., San Martin, F., Buschiazzo, A., 2022. 3D cryo-EM imaging of bacterial flagella: Novel structural and mechanistic insights into cell motility. *Journal of Biological Chemistry 298*, 102105. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102105

Morales-Soto, N., Anyan, M.E., Mattingly, A.E., Madukoma, C.S., Harvey, C.W., Alber, M., Déziel, E., Kearns, D.B., Shrout, J.D., 2015. Preparation, Imaging, and Quantification of Bacterial Surface Motility Assays. *Journal of Visualized Experiments 52338*. https://doi.org/10.3791/52338

Mordant, N., Crawford, A.M., Bodenschatz, E., 2004. Experimental Lagrangian Acceleration Probability Density Function Measurement. *Physica D: Nonlinear Phenomena 193*, 245–251. https://doi.org/10.1016/j.physd.2004.01.041

Morimoto, Y.V., Nakamura, S., Kami-ike, N., Namba, K., Minamino, T., 2010. Charged residues in the cytoplasmic loop of MotA are required for stator assembly into the bacterial flagellar motor. *Molecular Microbiology 78*, 1117–1129. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07391.x

Morimoto, Y.V., Namba, K., Minamino, T., 2020. GFP Fusion to the N-Terminus of MotB Affects the Proton Channel Activity of the Bacterial Flagellar Motor in *Salmonella*. *Biomolecules 10*, 1255. https://doi.org/10.3390/biom10091255

Moser, D.P., Nealson, K.H., 1996. Growth of the facultative anaerobe *Shewanella putrefaciens* by elemental sulfur reduction. *Applied and Environmental Microbiology 62*, 2100–2105. https://doi.org/10.1128/aem.62.6.2100-2105.1996

Mosier, A.P., Cady, N.C., 2011. Analysis of Bacterial Surface Interactions Using Microfluidic Systems. *Science Progress 94*, 431–450. https://doi.org/10.3184/003685011X13201828216868

Mouery, K., Rader, B.A., Gaynor, E.C., Guillemin, K., 2006. The Stringent Response Is Required for *Helicobacter pylori* Survival of Stationary Phase, Exposure to Acid, and Aerobic Shock. *Journal of Bacteriology 188*, 5494–5500. https://doi.org/10.1128/JB.00366-06

Mouton, C., Reynolds, H.S., Genco, R.J., 1980. Characterization of tufted streptococci isolated from the "corn cob" configuration of human dental plaque. *Infection and Immunity 27*, 235–245. https://doi.org/10.1128/iai.27.1.235-245.1980

Mueller, R.F., 1996. Bacterial transport and colonization in low nutrient environments. *Water Research 30*, 2681–2690. https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00181-9

Muñoz-Elías, E. J., McKinney, J. D., 2006. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cellular microbiology 8*(1), 10-22.

Murakami, K., 2015. Structural Biology of Bacterial RNA Polymerase. *Biomolecules 5*, 848–864. https://doi.org/10.3390/biom5020848

Murakami, K.S., Darst, S.A., 2003. Bacterial RNA polymerases: the wholo story. *Current Opinion in Structural Biology 13*, 31–39. https://doi.org/10.1016/S0959-440X(02)00005-2

Myers, C.R., Carstens, B.P., Antholine, W.E., Myers, J.M., 2001. Chromium(VI) reductase activity is associated with the cytoplasmic membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Applied Microbiology 88*, 98–106. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00910.x

Myers, C.R., Nealson, K.H., 1988. Bacterial Manganese Reduction and Growth with Manganese Oxide as the Sole Electron Acceptor. *Science 240*, 1319–1321. https://doi.org/10.1126/science.240.4857.1319

Nakamura, S., Minamino, T., 2024. Structure and Dynamics of the Bacterial Flagellar Motor Complex. *Biomolecules 14*, 1488. https://doi.org/10.3390/biom14121488

Nakamura, S., Minamino, T., 2019. Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules 9*, 279. https://doi.org/10.3390/biom9070279

Nedeljković, M., Sastre, D., Sundberg, E., 2021. Bacterial Flagellar Filament: A Supramolecular Multifunctional Nanostructure. *IJMS 22*, 7521. https://doi.org/10.3390/ijms22147521

Nejadnik, M.R., Van Der Mei, H.C., Busscher, H.J., Norde, W., 2008. Determination of the Shear Force at the Balance between Bacterial Attachment and Detachment in Weak-Adherence Systems, Using a Flow Displacement Chamber. *Applied and Environmental Microbiology 74*, 916–919. https://doi.org/10.1128/AEM.01557-07

Nette, F., Guerra De Souza, A.C., Laskay, T., Ohms, M., Dömer, D., Drömann, D., Rapoport, D.H., 2022. Method for simultaneous tracking of thousands of unlabeled cells within a transparent 3D matrix. *PLoS ONE 17*, e0270456. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270456

Newman, D.K., Kolter, R., 2000. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature 405*, 94–97. https://doi.org/10.1038/35011098

Newton, G.J., Mori, S., Nakamura, R., Hashimoto, K., Watanabe, K., 2009. Analyses of Current-Generating Mechanisms of *Shewanella loihica* PV-4 and *Shewanella oneidensis* MR-1 in Microbial Fuel Cells. *Applied and Environmental Microbiology 75*, 7674–7681. https://doi.org/10.1128/AEM.01142-09

Ng, C.K., Sivakumar, K., Liu, X., Madhaiyan, M., Ji, L., Yang, L., Tang, C., Song, H., Kjelleberg, S., Cao, B., 2013. Influence of outer membrane *c* -type cytochromes on particle size and activity of extracellular nanoparticles produced by *Shewanella oneidensis*. *Biotechnology and Bioengineering 110*, 1831–1837. https://doi.org/10.1002/bit.24856

Nilsson, L., Vanet, A., Vijgenboom, E., Bosch, L., 1990. The role of FIS in trans activation of stable RNA operons of *E. coli. The EMBO Journal 9*, 727–734. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08166.x

Ning, Z., Li, R., Lian, K., Liao, P., Liao, H., Liu, C., 2019. Transport and retention of *Shewanella oneidensis* strain MR-1 in water-saturated porous media with different grain-surface properties. *Chemosphere 233*, 57–66. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.072

Nishiyama, M., Sowa, Y., 2012. Microscopic Analysis of Bacterial Motility at High Pressure. *Biophysical Journal 102*, 1872–1880. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.03.033

Nossal, R., Chen, S.H., 1972. Light scattering from motile bacteria. *Journal of Physics Colloques 33 (1972).* 10.1051/jphyscol:1972131

Nsamela, A., Sharan, P., Garcia-Zintzun, A., Heckel, S., Chattopadhyay, P., Wang, L., Wittmann, M., Gemming, T., Saenz, J., Simmchen, J., 2021. Effect of Viscosity on Microswimmers: A Comparative Study. *ChemNanoMat 7*, 1042–1050. https://doi.org/10.1002/cnma.202100119

Oh, J.K., Yegin, Y., Yang, F., Zhang, M., Li, J., Huang, S., Verkhoturov, S.V., Schweikert, E.A., Perez-Lewis, K., Scholar, E.A., Taylor, T.M., Castillo, A., Cisneros-Zevallos, L., Min, Y., Akbulut, M., 2018. The influence of surface chemistry on the kinetics and thermodynamics of bacterial adhesion. *Scientific Reports 8*, 17247. https://doi.org/10.1038/s41598-018-35343-1

Olsson, A.L.J., Van Der Mei, H.C., Busscher, H.J., Sharma, P.K., 2010. Novel Analysis of Bacterium−Substratum Bond Maturation Measured Using a Quartz Crystal Microbalance. *Langmuir 26*, 11113–11117. https://doi.org/10.1021/la100896a

Oram, J., Jeuken, L.J.C., 2019. Tactic Response of *Shewanella oneidensis* MR-1 toward Insoluble Electron Acceptors. *mBio 10*, e02490-18. https://doi.org/10.1128/mBio.02490-18

Osterman, I.A., Dikhtyar, Yu.Yu., Bogdanov, A.A., Dontsova, O.A., Sergiev, P.V., 2015. Regulation of flagellar gene expression in Bacteria. *Biochemistry Moscow 80*, 1447–1456. https://doi.org/10.1134/s000629791511005x

O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology 30*, 295–304. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x

Otto, K., Silhavy, T.J., 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences 99*, 2287–2292. https://doi.org/10.1073/pnas.042521699

Ouellette, N. T., 2006. Probing the statistical structure of turbulence with measurements of tracer particle tracks. Cornell University.

Ozasa, K., Kang, H., Song, S., Kato, S., Shinomura, T., Maeda, M., 2021. Temporal Evolution of the Gravitaxis of Euglena gracilis from a Single Cell. *Plants 10*, 1411. https://doi.org/10.3390/plants10071411

Padilla-Vaca, F., Vargas-Maya, N.I., Elizarrarás-Vargas, N.U., Rangel-Serrano, Á., Cardoso-Reyes, L.R., Razo-Soria, T., Membrillo-Hernández, J., Franco, B., 2019. Flotillin homologue is involved in the swimming behavior of *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology 201*, 999–1008. https://doi.org/10.1007/s00203-019-01670-8

Padron, G.C., Shuppara, A.M., Palalay, J.-J.S., Sharma, A., Sanfilippo, J.E., 2023a. Bacteria in Fluid Flow. *Journal of Bacteriology 205*, e00400-22. https://doi.org/10.1128/jb.00400-22

Padron, G.C., Shuppara, A.M., Sharma, A., Koch, M.D., Palalay, J.-J.S., Radin, J.N., Kehl-Fie, T.E., Imlay, J.A., Sanfilippo, J.E., 2023b. Shear rate sensitizes bacterial pathogens to H_2O_2 stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences 120*, e2216774120. https://doi.org/10.1073/pnas.2216774120

Pak, O.S., Young, Y.-N., Marple, G.R., Veerapaneni, S., Stone, H.A., 2015. Gating of a mechanosensitive channel due to cellular flows. *Proceedings of the National Academy of Sciences 112*, 9822–9827. https://doi.org/10.1073/pnas.1512152112

Paksanont, S., Sintiprungrat, K., Yimthin, T., Pumirat, P., Peacock, S.J., Chantratita, N., 2018. Effect of temperature on *Burkholderia pseudomallei* growth, proteomic changes, motility and resistance to stress environments. *Scientific Reports 8*, 9167. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27356-7

Palalay, J.-J.S., Simsek, A.N., Reed, J.L., Koch, M.D., Sabass, B., Sanfilippo, J.E., 2023. Shear force enhances adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* by counteracting pilus-driven surface departure. *Proceedings of the National Academy of Sciences 120*. https://doi.org/10.1073/pnas.2307718120

Palma, V., Gutiérrez, M.S., Vargas, O., Parthasarathy, R., Navarrete, P., 2022. Methods to Evaluate Bacterial Motility and Its Role in Bacterial–Host Interactions. *Microorganisms 10*, 563. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030563

Palmer, J., Flint, S., Brooks, J., 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34*, 577–588. https://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4

Pan, M., Li, H., Han, X., Ma, W., Li, X., Guo, Q., Yang, B., Ding, C., Ma, Y., 2022. Effects of hydrodynamic conditions on the composition, spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and the architecture of biofilms. *Chemosphere 307*, 135965. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135965

Paradis, G., Chevance, F.F.V., Liou, W., Renault, T.T., Hughes, K.T., Rainville, S., Erhardt, M., 2017. Variability in bacterial flagella re-growth patterns after breakage. *Scientific Reports 7*, 1282. https://doi.org/10.1038/s41598-017-01302-5

Park, A., Jeong, H.-H., Lee, J., Kim, K.P., Lee, C.-S., 2011. Effect of shear stress on the formation of bacterial biofilm in a microfluidic channel. *BioChip Journal 5*, 236–241. https://doi.org/10.1007/s13206-011-5307-9

Park, B.-J., Abu-Lail, N.I., 2011. The role of the pH conditions of growth on the bioadhesion of individual and lawns of pathogenic Listeria monocytogenes cells. *Journal of Colloid and Interface Science 358*, 611–620. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.03.025

Partridge, J.D., 2022. Surveying a Swarm: Experimental Techniques To Establish and Examine Bacterial Collective Motion. *Applied and Environmental Microbiology 88*, e01853-21. https://doi.org/10.1128/aem.01853-21

Paulick, A., Delalez, N. J., Brenzinger, S., Steel, B. C., Berry, R. M., Armitage, J. P., Thormann, K. M., 2015. Dual stator dynamics in the *Shewanella oneidensis* MR-1 flagellar motor. *Molecular microbiology 96*(5), 993-1001.

Paulick, A., Koerdt, A., Lassak, J., Huntley, S., Wilms, I., Narberhaus, F., Thormann, K.M., 2009. Two different stator systems drive a single polar flagellum in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Molecular Microbiology 71*, 836–850. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06570.x

Penesyan, A., Paulsen, I.T., Kjelleberg, S., Gillings, M.R., 2021. Three faces of biofilms: a microbial lifestyle, a nascent multicellular organism, and an incubator for diversity. *npj Biofilms Microbiomes 7*, 80. https://doi.org/10.1038/s41522-021-00251-2

Peng, Q., Zhou, X., Wang, Z., Xie, Q., Ma, C., Zhang, G., Gong, X., 2019. Three-dimensional bacterial motions near a surface investigated by digital holographic microscopy: effect of surface stiffness. *Langmuir 35*(37), 12257-12263.

Peng, Z., Pak, O.S., Feng, Z., Liu, A.P., Young, Y.-N., 2016. On the gating of mechanosensitive channels by fluid shear stress. *Acta Mechanica Sinica 32*, 1012–1022. https://doi.org/10.1007/s10409-016-0606-y

Pereira, M.O., Kuehn, M., Wuertz, S., Neu, T., Melo, L.F., 2002. Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Biotechnolology and Bioengineering 78*, 164–171. https://doi.org/10.1002/bit.10189

Pérez-Rodríguez, S., García-Aznar, J.M., Gonzalo-Asensio, J., 2022. Microfluidic devices for studying bacterial taxis, drug testing and biofilm formation. *Microbial Biotechnology 15*, 395–414. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13775

Persat, A., 2017. Bacterial mechanotransduction. *Current Opinion in Microbiology 36*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.12.002

Persat, A., Nadell, C.D., Kim, M.K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., Wingreen, N.S., Bassler, B.L., Gitai, Z., Stone, H.A., 2015. The Mechanical World of Bacteria. *Cell 161*, 988–997. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.005

Persat, A., Stone, H.A., Gitai, Z., 2014. The curved shape of *Caulobacter crescentus* enhances surface colonization in flow. *Nature Communications 5*, 3824. https://doi.org/10.1038/ncomms4824

Petrova, O.E., Sauer, K., 2016. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current Opinion in Microbiology 30*, 67–78. https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004

Petrova, O.E., Sauer, K., 2012. Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. *Journal of Bacteriology 194*, 2413–2425. https://doi.org/10.1128/JB.00003-12

Peyronnet, R., Tran, D., Girault, T., Frachisse, J.-M., 2014. Mechanosensitive channels: feeling tension in a world under pressure. *Frontiers in Plant Science 5*. https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00558

Pfeifer, V., Beier, S., Alirezaeizanjani, Z., Beta, C., 2022. Role of the Two Flagellar Stators in Swimming Motility of *Pseudomonas putida*. *mBio 13*, e02182-22. https://doi.org/10.1128/mbio.02182-22

Picart, P., Gross, M., Marquet, P., 2015. Basic Fundamentals of Digital Holography, in: Picart, P. (Ed.), New Techniques in Digital Holography. Wiley, pp. 1–66. https://doi.org/10.1002/9781119091745.ch1

Picart, P., Li, J.-C., 2013. Digital holography. John Wiley & Sons.

Pietrangeli, T., Ybert, C., Cottin-Bizonne, C., Detcheverry, F., 2024. Optimal run-and-tumble in slit-like confinement. *Physical Review Research 6*(2), 023028.

Pinchuk, G.E., Geydebrekht, O.V., Hill, E.A., Reed, J.L., Konopka, A.E., Beliaev, A.S., Fredrickson, J.K., 2011. Pyruvate and Lactate Metabolism by *Shewanella oneidensis* MR-1 under Fermentation, Oxygen Limitation, and Fumarate Respiration Conditions. *Applied and Environmental Microbiology 77*, 8234–8240. https://doi.org/10.1128/AEM.05382-11

Pinck, S., Etienne, M., Dossot, M., Jorand, F.P.A., 2017. A rapid and simple protocol to prepare a living biocomposite that mimics electroactive biofilms. *Bioelectrochemistry 118*, 131–138. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.07.010

Ploux, L., Ponche, A., Anselme, K., 2010. Bacteria/Material Interfaces: Role of the Material and Cell Wall Properties. *Journal of Adhesion Science and Technology 24*, 2165–2201. https://doi.org/10.1163/016942410X511079

Pousti, M., Zarabadi, M.P., Abbaszadeh Amirdehi, M., Paquet-Mercier, F., Greener, J., 2019. Microfluidic bioanalytical flow cells for biofilm studies: a review. *Analyst* 144, 68–86. https://doi.org/10.1039/C8AN01526K

Pratt, L.A., Kolter, R., 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology 30*, 285–293. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x

Procopio Evagrio George, N., Wei, Q., Kyun Shin, P., Konstantopoulos, K., Ross, J.M., 2006. *Staphylococcus aureus* Adhesion via Spa, ClfA, and SdrCDE to Immobilized Platelets Demonstrates Shear-Dependent Behavior. *Asteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 26*, 2394–2400. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000237606.90253.94

Prossliner, T., Skovbo Winther, K., Sørensen, M.A., Gerdes, K., 2018. Ribosome Hibernation. *Annual Review of Genetics 52*, 321–348. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035130

Purcell, E. M., 1977. Life at low Reynolds number. *American Journal of Physics 45*(1).

Qi, M., Gong, X., Wu, B., Zhang, G., 2017. Landing Dynamics of Swimming Bacteria on a Polymeric Surface: Effect of Surface Properties. *Langmuir 33*, 3525–3533. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00439

Qiu, X., Daly, M.J., Vasilenko, A., Omelchenko, M.V., Gaidamakova, E.K., Wu, L., Zhou, J., Sundin, G.W., Tiedje, J.M., 2006. Transcriptome Analysis Applied to Survival of *Shewanella oneidensis* MR-1 Exposed to Ionizing Radiation. *Journal of Bacteriology 188*, 1199–1204. https://doi.org/10.1128/JB.188.3.1199-1204.2006

Qu, Z., Breuer, K.S., 2020. Effects of shear-thinning viscosity and viscoelastic stresses on flagellated bacteria motility. *Physical Review Fluids 5*, 073103. https://doi.org/10.1103/PhysRevFluids.5.073103

Ragi, S., Rahman, M.H., Duckworth, J., Kalimuthu, J., Chundi, P., Gadhamshetty, V., 2021. Artificial Intelligence-driven Image Analysis of Bacterial Cells and Biofilms. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 1–1. https://doi.org/10.1109/TCBB.2021.3138304

Ramachandran, A., Stone, H.A., Gitai, Z., 2024. Free-swimming bacteria transcriptionally respond to shear flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences 121*, e2406688121. https://doi.org/10.1073/pnas.2406688121

Rang, C., Galen, J.E., Kaper, J.B., Chao, L., 2003. Fitness cost of the green fluorescent protein in gastrointestinal bacteria. *Canadian Journal of Microbiology 49*, 531–537. https://doi.org/10.1139/w03-072

Ras, M., Lefebvre, D., Derlon, N., Paul, E., Girbal-Neuhauser, E., 2011. Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Research 45*, 1529–1538. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.021

Rauhamäki, V., Bloch, D.A., Wikström, M., 2012. Mechanistic stoichiometry of proton translocation by cytochrome *cbb$_3$*. *Proceedings of the National Academy of Sciences 109*, 7286–7291. https://doi.org/10.1073/pnas.1202151109

Rauprich, O., Matsushita, M., Weijer, C.J., Siegert, F., Esipov, S.E., Shapiro, J.A., 1996. Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *Journal of Bacteriology 178*, 6525–6538. https://doi.org/10.1128/jb.178.22.6525-6538.1996

Ravel, G., Bergmann, M., Trubuil, A., Deschamps, J., Briandet, R., Labarthe, S., 2022. Inferring characteristics of bacterial swimming in biofilm matrix from time-lapse confocal laser scanning microscopy. *eLife 11*, e76513. https://doi.org/10.7554/eLife.76513

Raza, M. R., George, J. E., Kumari, S., Mitra, M. K., Paul, D., 2023. Anomalous diffusion of *E. coli* under microfluidic confinement and chemical gradient. *Soft Matter 19*(34), 6446-6457.

Renault, T.T., Abraham, A.O., Bergmiller, T., Paradis, G., Rainville, S., Charpentier, E., Guet, C.C., Tu, Y., Namba, K., Keener, J.P., Minamino, T., Erhardt, M., 2017. Bacterial flagella grow through an injection-diffusion mechanism. *eLife 6*, e23136. https://doi.org/10.7554/eLife.23136

Resch, A., Leicht, S., Saric, M., Pásztor, L., Jakob, A., Götz, F., Nordheim, A., 2006. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics 6*, 1867–1877. https://doi.org/10.1002/pmic.200500531

Reynolds, O., 1883. XXIX. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Philosophical Transactions of the Royal society of London* (174), 935-982.

Rijnaarts, H.H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.J.B., 1996. Bacterial Deposition in Porous Media Related to the Clean Bed Collision Efficiency and to Substratum Blocking by Attached Cells. *Environmental Science & Technology 30*, 2869–2876. https://doi.org/10.1021/es960597b

Ringø, E., Stenberg, E., Strøm, A.R., 1984. Amino acid and lactate catabolism in trimethylamine oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735. *Applied and Environmental Microbiology 47*, 1084–1089. https://doi.org/10.1128/aem.47.5.1084-1089.1984

Rodesney, C.A., Roman, B., Dhamani, N., Cooley, B.J., Katira, P., Touhami, A., Gordon, V.D., 2017. Mechanosensing of shear by *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased levels of the cyclic-di-GMP signal initiating biofilm development. *Proceedings of the National Academy of Sciences 114*, 5906–5911. https://doi.org/10.1073/pnas.1703255114

Roggo, C., Picioreanu, C., Richard, X., Mazza, C., Van Lintel, H., Van Der Meer, J.R., 2018. Quantitative chemical biosensing by bacterial chemotaxis in microfluidic chips. *Environmental Microbiology 20*, 241–258. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13982

Romei, M.G., Boxer, S.G., 2019. Split Green Fluorescent Proteins: Scope, Limitations, and Outlook. *Annual Review of Biophysics 48*, 19–44. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-051013-022846

Romine, M.F., Carlson, T.S., Norbeck, A.D., McCue, L.A., Lipton, M.S., 2008. Identification of Mobile Elements and Pseudogenes in the *Shewanella oneidensis* MR-1 Genome. *Applied and Environmental Microbiology 74*, 3257–3265. https://doi.org/10.1128/AEM.02720-07

Ronis, A., Brockman, K., Singh, A.K., Gaytán, M.O., Wong, A., McGrath, S., Owen, C.D., Magrini, V., Wilson, R.K., Van Der Linden, M., King, S.J., 2019. *Streptococcus oralis* subsp. *dentisani* Produces Monolateral Serine-Rich Repeat Protein Fibrils, One of Which Contributes to Saliva Binding via Sialic Acid. *Infection and Immunity 87*, e00406-19. https://doi.org/10.1128/IAI.00406-19

Rosser, G., Baker, R.E., Armitage, J.P., Fletcher, A.G., 2014. Modelling and analysis of bacterial tracks suggest an active reorientation mechanism in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of The Royal Society Interface 11*, 20140320. https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0320

Rossy, T., Nadell, C.D., Persat, A., 2019. Cellular advective-diffusion drives the emergence of bacterial surface colonization patterns and heterogeneity. *Nature Communications 10*, 2471. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10469-6

Rosu, V., Hughes, K. T., 2006. σ28-dependent transcription in *Salmonella enterica* is independent of flagellar shearing. *Journal of Bacteriology 188*(14), 5196-5203.

Rowe, I., Elahi, M., Huq, A., Sukharev, S., 2013. The mechanoelectrical response of the cytoplasmic membrane of *Vibrio cholerae*. *Journal of General Physiology 142*, 75–85. https://doi.org/10.1085/jgp.201310985

Rummel, C.D., Lechtenfeld, O.J., Kallies, R., Benke, A., Herzsprung, P., Rynek, R., Wagner, S., Potthoff, A., Jahnke, A., Schmitt-Jansen, M., 2021. Conditioning Film and Early Biofilm Succession on Plastic Surfaces. *Environmental Science & Technology 55*, 11006–11018. https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07875

Rusconi, R., Guasto, J.S., Stocker, R., 2014. Bacterial transport suppressed by fluid shear. *Nature Physics 10*, 212–217. https://doi.org/10.1038/nphys2883

Rusconi, R., Stocker, R., 2015. Microbes in flow. *Current Opinion in Microbiology 25*, 1–8. https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.03.003

Rzhepishevska, O., Hakobyan, S., Ruhal, R., Gautrot, J., Barbero, D., Ramstedt, M., 2013. The surface charge of anti-bacterial coatings alters motility and biofilm architecture. *Biomaterials Science 1*, 589. https://doi.org/10.1039/c3bm00197k

Saintillan, D., 2018. Rheology of active fluids. *Annual review of fluid mechanics 50*(1), 563-592.

Sala, A., Bordes, P., Genevaux, P., 2014. Multitasking SecB chaperones in bacteria. *Frontiers in Microbiology 5*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00666

Sampson, M.M., Mai, C., Sinnott, J.T., 2018. The Genus *Shewanella*: a Hard-Wired Pathogen. *Clinical Microbiology Newsletter 40*, 17–18. https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2018.01.002

Sanchez-Vizuete, P., Dergham, Y., Bridier, A., Deschamps, J., Dervyn, E., Hamze, K., Aymerich, S., Le Coq, D., Briandet, R., 2022. The coordinated population redistribution between *Bacillus subtilis* submerged biofilm and liquid-air pellicle. *Biofilm 4*, 100065. https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2021.100065

Sandt, C., Smith-Palmer, T., Pink, J., Brennan, L., Pink, D., 2007. Confocal Raman microspectroscopy as a tool for studying the chemical heterogeneities of biofilms in situ: Biofilm Raman microspectroscopy. *Journal of Applied Microbiology 103*, 1808–1820. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03413.x

Sanfilippo, J.E., Lorestani, A., Koch, M.D., Bratton, B.P., Siryaporn, A., Stone, H.A., Gitai, Z., 2019. Microfluidic-based transcriptomics reveal force-independent bacterial rheosensing. *Nature Microbiology 4*, 1274–1281. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0455-0

Santore, M.M., 2022. Interplay of physico-chemical and mechanical bacteria-surface interactions with transport processes controls early biofilm growth: A review. *Advances in Colloid and Interface Science 304*, 102665. https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102665

Saragosti, J., Calvez, V., Bournaveas, N., Perthame, B., Buguin, A., Silberzan, P., 2011. Directional persistence of chemotactic bacteria in a traveling concentration wave. *Proceedings of the National Academy of Sciences 108*, 16235–16240. https://doi.org/10.1073/pnas.1101996108

Saragosti, J., Silberzan, P., Buguin, A., 2012. Modeling *E. coli* Tumbles by Rotational Diffusion. Implications for Chemotaxis. *PLoS ONE 7*, e35412. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035412

Sato, M., Machida, K., Arikado, E., Saito, H., Kakegawa, T., Kobayashi, H., 2000. Expression of Outer Membrane Proteins in *Escherichia coli* Growing at Acid pH. *Applied and Environmental Microbiology 66*, 943–947. https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.943-947.2000

Satpathy, S., Sen, S.K., Pattanaik, S., Raut, S., 2016. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 7*, 56–66. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.002

Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P.S., Bjarnsholt, T., 2022. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology 20*, 608–620. https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0

Saur, T., Morin, E., Habouzit, F., Bernet, N., Escudié, R., 2017. Impact of wall shear stress on initial bacterial adhesion in rotating annular reactor. *PLoS ONE 12*, e0172113. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172113

Saville, R.M., Dieckmann, N., Spormann, A.M., 2010. Spatiotemporal activity of the mshA gene system in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms: mshA gene system in *Shewanella oneidensis*. *FEMS Microbiology Letters 308*, 76–83. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01995.x

Scheidweiler, D., Miele, F., Peter, H., Battin, T.J., De Anna, P., 2020. Trait-specific dispersal of bacteria in heterogeneous porous environments: from pore to porous medium scale. *Journal of the Royal Society interface 17*, 20200046. https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0046

Schneider, W.R., Doetsch, R.N., 1974. Effect of Viscosity on Bacterial Motility. *Journal of Bacteriology 117*, 696–701. https://doi.org/10.1128/jb.117.2.696-701.1974

Schniederberend, M., Williams, J.F., Shine, E., Shen, C., Jain, R., Emonet, T., Kazmierczak, B.I., 2019. Modulation of flagellar rotation in surface-attached bacteria: A pathway for rapid surface-sensing after flagellar attachment. *PLoS Pathogens 15*, e1008149. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008149

Schweinitzer, T., Josenhans, C., 2010. Bacterial energy taxis: a global strategy? *Archives of Microbiology 192*, 507–520. https://doi.org/10.1007/s00203-010-0575-7

Secchi, E., Savorana, G., Vitale, A., Eberl, L., Stocker, R., Rusconi, R., 2022. The structural role of bacterial eDNA in the formation of biofilm streamers. *Proceedings of the National Academy of Sciences 119*, e2113723119. https://doi.org/10.1073/pnas.2113723119

Secchi, E., Vitale, A., Miño, G.L., Kantsler, V., Eberl, L., Rusconi, R., Stocker, R., 2020. The effect of flow on swimming bacteria controls the initial colonization of curved surfaces. *Nature Communications 11*, 2851. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16620-y

Seixas, A.F., Quendera, A.P., Sousa, J.P., Silva, A.F.Q., Arraiano, C.M., Andrade, J.M., 2022. Bacterial Response to Oxidative Stress and RNA Oxidation. *Frontiers in Genetics 12*, 821535. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.821535

Sentenac, H., Loyau, A., Leflaive, J., Schmeller, D.S., 2022. The significance of biofilms to human, animal, plant and ecosystem health. *Functional Ecology 36*, 294–313. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13947

Serrazanetti, D.I., Ndagijimana, M., Sado-Kamdem, S.L., Corsetti, A., Vogel, R.F., Ehrmann, M., Guerzoni, M.E., 2011. Acid Stress-Mediated Metabolic Shift in *Lactobacillus sanfranciscensis* LSCE1. *Applied and Environmental Microbiology 77*, 2656–2666. https://doi.org/10.1128/AEM.01826-10

Serres, M.H., Riley, M., 2006. Genomic Analysis of Carbon Source Metabolism of *Shewanella oneidensis* MR-1: Predictions versus Experiments. *Journal of Bacteriology 188*, 4601–4609. https://doi.org/10.1128/JB.01787-05

Shen, J., Gao, P., Han, S., Kao, R.Y.T., Wu, S., Liu, X., Qian, S., Chu, P.K., Cheung, K.M.C., Yeung, K.W.K., 2020. A tailored positively-charged hydrophobic surface reduces the risk of implant associated infections. *Acta Biomaterialia 114*, 421–430. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.040

Shen, Y., Siryaporn, A., Lecuyer, S., Gitai, Z., Stone, H.A., 2012. Flow Directs Surface-Attached Bacteria to Twitch Upstream. *Biophysical Journal 103*, 146–151. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.05.045

Sheng, X., Ting, Y.P., Pehkonen, S.O., 2008. The influence of ionic strength, nutrients and pH on bacterial adhesion to metals. *Journal of Colloid and Interface Science 321*, 256–264. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.02.038

Shi, M., Wu, L., Xia, Y., Chen, H., Luo, Q., Sun, L., Gao, H., 2013. Exoprotein Production Correlates with Morphotype Changes of Nonmotile *Shewanella oneidensis* Mutants. *Journal of Bacteriology 195*, 1463–1474. https://doi.org/10.1128/JB.02187-12

Shirai, H., Ito, C., Tsukada, K., 2022. pH-taxis drives aerobic bacteria in duodenum to migrate into the pancreas with tumors. *Scientific Reports 12*, 1783. https://doi.org/10.1038/s41598-022-05554-8

Simões, L.C., Gomes, I.B., Sousa, H., Borges, A., Simões, M., 2022. Biofilm formation under high shear stress increases resilience to chemical and mechanical challenges. *Biofouling 38*, 1–12. https://doi.org/10.1080/08927014.2021.2006189

Sinnecker, D., Voigt, P., Hellwig, N., Schaefer, M., 2005. Reversible Photobleaching of Enhanced Green Fluorescent Proteins. *Biochemistry 44*, 7085–7094. https://doi.org/10.1021/bi047881x

Skerker, J.M., Berg, H.C., 2001. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences 98*, 6901–6904. https://doi.org/10.1073/pnas.121171698

Skurnik, D., Roux, D., Aschard, H., Cattoir, V., Yoder-Himes, D., Lory, S., Pier, G.B., 2013. A Comprehensive Analysis of In Vitro and In Vivo Genetic Fitness of *Pseudomonas aeruginosa* Using High-Throughput Sequencing of Transposon Libraries. *PLoS Pathogens 9*, e1003582. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003582

Smith, D.R., Chapman, M.R., 2010. Economical Evolution: Microbes Reduce the Synthetic Cost of Extracellular Proteins. *mBio 1*. https://doi.org/10.1128/mbio.00131-10

Sohan, M., Sai Ram, T., Rami Reddy, Ch.V., 2024. A Review on YOLOv8 and Its Advancements, in: Jacob, I.J., Piramuthu, S., Falkowski-Gilski, P. (Eds.), Data Intelligence and Cognitive Informatics, Algorithms for Intelligent Systems. Springer Nature Singapore, Singapore, pp. 529–545. https://doi.org/10.1007/978-981-99-7962-2_39

Sokurenko, E.V., Vogel, V., Thomas, W.E., 2008. Catch-Bond Mechanism of Force-Enhanced Adhesion: Counterintuitive, Elusive, but Widespread? *Cell Host & Microbe 4*, 314–323. https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.005

Son, K., Guasto, J.S., Stocker, R., 2013. Bacteria can exploit a flagellar buckling instability to change direction. *Nature Physics 9*, 494–498. https://doi.org/10.1038/nphys2676

Song, F., Brasch, M.E., Wang, H., Henderson, J.H., Sauer, K., Ren, D., 2017. How Bacteria Respond to Material Stiffness during Attachment: A Role of *Escherichia coli* Flagellar Motility. *ACS Applied Materials & Interfaces 9*, 22176–22184. https://doi.org/10.1021/acsami.7b04757

Song, F., Ren, D., 2014. Stiffness of Cross-Linked Poly(Dimethylsiloxane) Affects Bacterial Adhesion and Antibiotic Susceptibility of Attached Cells. *Langmuir 30*, 10354–10362. https://doi.org/10.1021/la502029f

Song, Y., Zhang, H., Chon, C.H., Chen, S., Pan, X., Li, D., 2010. Counting bacteria on a microfluidic chip. *Analytica Chimica Acta 681*, 82–86. https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.035

Sourjik, V., Wingreen, N.S., 2012. Responding to chemical gradients: bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology 24*, 262–268. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.11.008

Soutourina, O.A., Semenova, E.A., Parfenova, V.V., Danchin, A., Bertin, P., 2001. Control of Bacterial Motility by Environmental Factors in Polarly Flagellated and Peritrichous Bacteria Isolated from Lake Baikal. *Applied and Environmental Microbiology 67*, 3852–3859. https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.3852-3859.2001

Spatola Rossi, C., Coulon, F., Ma, S., Zhang, Y.S., Yang, Z., 2023. Microfluidics for Rapid Detection of Live Pathogens. *Advanced Functional Materials 33*, 2212081. https://doi.org/10.1002/adfm.202212081

Stock, A. M., Robinson, V. L., Goudreau, P. N, 2000. Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry 69*(1), 183-215.

Stock, G. B., Jenkins, T. C., 1978. The measurement of bacterial translation by photon correlation spectroscopy. *Biophysical Journal 22*(1), 79-96.

Stoodley, P., Lewandowski, Z., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., 1999. The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environmental Microbiology 1*, 447–455. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.1999.00055.x

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology 56*, 187–209. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705

Straub, H., Bigger, C.M., Valentin, J., Abt, D., Qin, X., Eberl, L., Maniura-Weber, K., Ren, Q., 2019. Bacterial Adhesion on Soft Materials: Passive Physicochemical Interactions or Active Bacterial Mechanosensing? *Advanced Healthcare Materials 8*, 1801323. https://doi.org/10.1002/adhm.201801323

Straub, H., Eberl, L., Zinn, M., Rossi, R.M., Maniura-Weber, K., Ren, Q., 2020. A microfluidic platform for in situ investigation of biofilm formation and its treatment under controlled conditions. *Journal of Nanobiotechnology 18*, 166. https://doi.org/10.1186/s12951-020-00724-0

Stricker, L., Guido, I., Breithaupt, T., Mazza, M.G., Vollmer, J., 2020. Hybrid sideways/longitudinal swimming in the monoflagellate *Shewanella oneidensis*: from aerotactic band to biofilm. *Journal of the Royal Society interface 17*, 20200559. https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0559

Su, T.-W., Choi, I., Feng, J., Huang, K., Ozcan, A., 2016. High-throughput analysis of horse sperms' 3D swimming patterns using computational on-chip imaging. *Animal Reproduction Science 169*, 45–55. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.12.012

Subramanian, P., Pirbadian, S., El-Naggar, M.Y., Jensen, G.J., 2018. Ultrastructure of *Shewanella oneidensis* MR-1 nanowires revealed by electron cryotomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences 115*. https://doi.org/10.1073/pnas.1718810115

Subramanian, S., Kearns, D.B., 2019. Functional Regulators of Bacterial Flagella. *Annual Review of Microbiology 73*, 225–246. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115725

Sultan, S.Z., Manne, A., Stewart, P.E., Bestor, A., Rosa, P.A., Charon, N.W., Motaleb, M.A., 2013. Motility Is Crucial for the Infectious Life Cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Infection and Immunity 81*, 2012–2021. https://doi.org/10.1128/IAI.01228-12

Sun, L., Jin, M., Ding, W., Yuan, J., Kelly, J., & Gao, H., 2013. Posttranslational modification of flagellin FlaB in *Shewanella oneidensis*. *Journal of Bacteriology 195*(11), 2550-2561.

Sun, H., Wang, M., Liu, Y., Wu, P., Yao, T., Yang, W., Yang, Q., Yan, J., Yang, B., 2022. Regulation of flagellar motility and biosynthesis in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut Microbes 14*, 2110822. https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2110822

Tai, C.-W., Ahmadzadegan, A., Ardekani, A., Narsimhan, V., 2023. A forward reconstruction, holographic method to overcome the lens effect during 3D detection of semi-transparent, non-spherical particles. *Soft Matter 19*, 115–127. https://doi.org/10.1039/D2SM00738J

Tamiev, D., Furman, P.E., Reuel, N.F., 2020. Automated classification of bacterial cell sub-populations with convolutional neural networks. *PLoS ONE 15*, e0241200. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241200

Tang, P.-C., Eriksson, O., Sjögren, J., Fatsis-Kavalopoulos, N., Kreuger, J., Andersson, D.I., 2022. A Microfluidic Chip for Studies of the Dynamics of Antibiotic Resistance Selection in Bacterial Biofilms. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology* 12, 896149. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.896149

Tanner, L. H., 1966. Some applications of holography in fluid mechanics. *Journal of Scientific Instruments 43*(2), 81.

Tatusov, R.L., 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Research* 28, 33–36. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.33

Taute, K.M., Gude, S., Tans, S.J., Shimizu, T.S., 2015. High-throughput 3D tracking of bacteria on a standard phase contrast microscope. *Nature Communications 6*, 8776. https://doi.org/10.1038/ncomms9776

Teal, T.K., Lies, D.P., Wold, B.J., Newman, D.K., 2006. Spatiometabolic Stratification of *Shewanella oneidensis* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology 72*, 7324–7330. https://doi.org/10.1128/AEM.01163-06

Terada, A., Okuyama, K., Nishikawa, M., Tsuneda, S., Hosomi, M., 2012. The effect of surface charge property on *Escherichia coli* initial adhesion and subsequent biofilm formation. *Biotechnology and Bioengineering 109*, 1745–1754. https://doi.org/10.1002/bit.24429

Theng, S., Williamson, K.S., Franklin, M.J., 2020. Role of Hibernation Promoting Factor in Ribosomal Protein Stability during *Pseudomonas aeruginosa* Dormancy. *IJMS 21*, 9494. https://doi.org/10.3390/ijms21249494

Thomas, A.D., Booth, I.R., 1992. The regulation of expression of the porin gene ompC by acid pH. *Journal of General Microbiology 138*, 1829–1835. https://doi.org/10.1099/00221287-138-9-1829

Thomas, W. E., Nilsson, L. M., Forero, M., Sokurenko, E. V., Vogel, V., 2004. Shear-dependent 'stick-and-roll'adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Molecular microbiology 53*(5), 1545-1557.

Thomas, W. E., Trintchina, E., Forero, M., Vogel, V., & Sokurenko, E. V., 2002. Bacterial adhesion to target cells enhanced by shear force. *Cell 109*(7), 913-923.

Thomas, W., Forero, M., Yakovenko, O., Nilsson, L., Vicini, P., Sokurenko, E., Vogel, V., 2006. Catch-Bond Model Derived from Allostery Explains Force-Activated Bacterial Adhesion. *Biophysical Journal 90*, 753–764. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.066548

Thomas, W.E., Vogel, V., Sokurenko, E., 2008. Biophysics of Catch Bonds. *Annual Review of Biophysics 37*, 399–416. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125804

Thomen, P., Robert, J., Monmeyran, A., Bitbol, A.-F., Douarche, C., Henry, N., 2017. Bacterial biofilm under flow: First a physical struggle to stay, then a matter of breathing. *PLoS ONE 12*, e0175197. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175197

Thormann, K.M., Beta, C., Kühn, M.J., 2022. Wrapped Up: The Motility of Polarly Flagellated Bacteria. *Annual Review of Microbiology 76*, 349–367. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041122-101032

Thormann, K.M., Duttler, S., Saville, R.M., Hyodo, M., Shukla, S., Hayakawa, Y., Spormann, A.M., 2006. Control of Formation and Cellular Detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms by Cyclic di-GMP. *Journal of Bacteriology 188*, 2681–2691. https://doi.org/10.1128/JB.188.7.2681-2691.2006

Thormann, K.M., Saville, R.M., Shukla, S., Pelletier, D.A., Spormann, A.M., 2004. Initial Phases of Biofilm Formation in *Shewanella oneidensis* MR-1. *Journal of Bacteriology 186*, 8096–8104. https://doi.org/10.1128/JB.186.23.8096-8104.2004

Thormann, K.M., Saville, R.M., Shukla, S., Spormann, A.M., 2005. Induction of Rapid Detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 Biofilms. *Journal of Bacteriology 187*, 1014–1021. https://doi.org/10.1128/JB.187.3.1014-1021.2005

Tian, Y., Li, X., Chen, Y., Hu, X., Liu, Y., Luo, H., Jing, G., 2024. Swimming Modes of Bacteria Escaping from a Soft Confined Space. *Langmuir 40*, 25698–25707. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c03808

Tipping, M.J., Delalez, N.J., Lim, R., Berry, R.M., Armitage, J.P., 2013. Load-Dependent Assembly of the Bacterial Flagellar Motor. *mBio 4*, e00551-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00551-13

Tokárová, V., Sudalaiyadum Perumal, A., Nayak, M., Shum, H., Kašpar, O., Rajendran, K., Mohammadi, M., Tremblay, C., Gaffney, E.A., Martel, S., Nicolau, D.V., Nicolau, D.V., 2021. Patterns of bacterial motility in microfluidics-confining environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences 118*, e2013925118. https://doi.org/10.1073/pnas.2013925118

Torres Maldonado, B.O., Théry, A., Tao, R., Brosseau, Q., Mathijssen, A.J.T.M., Arratia, P.E., 2024. Enhancement of bacterial rheotaxis in non-Newtonian fluids. *Proceedings of the National Academy of Sciences 121*. https://doi.org/10.1073/pnas.2417614121

Tran, V.N., Khan, F., Han, W., Luluil, M., Truong, V.G., Yun, H.G., Choi, S., Kim, Y.-M., Shin, J.H., Kang, H.W., 2022. Real-time monitoring of mono- and dual-species biofilm formation and eradication using microfluidic platform. *Scientific Reports 12*, 9678. https://doi.org/10.1038/s41598-022-13699-9

Trinh, K.T.L., Chae, W.R., Lee, N.Y., 2022. Recent advances in the fabrication strategies of paper-based microfluidic devices for rapid detection of bacteria and viruses. *Microchemical Journal 180*, 107548. https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107548

Tuck, B., Watkin, E., Somers, A., Forsyth, M., Machuca, L.L., 2022. Conditioning of metal surfaces enhances *Shewanella chilikensis* adhesion. *Biofouling 38*, 207–222. https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2039349

Turner, L., Ryu, W. S., Berg, H. C., 2000. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments. *Journal of bacteriology 182*(10), 2793-2801.

Turner, L, Stern, A.S., Berg, H.C., 2012. Growth of Flagellar Filaments of *Escherichia coli* Is Independent of Filament Length. *Journal of Bacteriology 194*, 2437-2442. https://doi.org/10.1128/JB.06735-11

Tuson, H.H., Weibel, D.B., 2013. Bacteria–surface interactions. *Soft Matter 9*, 4368. https://doi.org/10.1039/c3sm27705d

Ueshima, M., Tanaka, S., Nakamura, S., Yamashita, K., 2002. Manipulation of bacterial adhesion and proliferation by surface charges of electrically polarized hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research 60*, 578–584. https://doi.org/10.1002/jbm.10113

Ueta, M., Ohniwa, R.L., Yoshida, H., Maki, Y., Wada, C., Wada, A., 2008. Role of HPF (Hibernation Promoting Factor) in Translational Activity in *Escherichia coli. The Journal of Biochemistry 143*, 425–433. https://doi.org/10.1093/jb/mvm243

Ugolini, G.S., Wang, M., Secchi, E., Pioli, R., Ackermann, M., Stocker, R., 2024. Microfluidic approaches in microbial ecology. *Lab on a Chip 24*, 1394–1418. https://doi.org/10.1039/D3LC00784G

Ukleja, M., Kricks, L., Torrens, G., Peschiera, I., Rodrigues-Lopes, I., Krupka, M., García-Fernández, J., Melero, R., Del Campo, R., Eulalio, A., Mateus, A., López-Bravo, M., Rico, A.I., Cava, F., Lopez, D., 2024. Flotillin-mediated stabilization of unfolded proteins in bacterial membrane microdomains. *Nature Communications 15*, 5583. https://doi.org/10.1038/s41467-024-49951-1

Ullrich, S., Karrasch, B., Hoppe, H., Jeskulke, K., Mehrens, M., 1996. Toxic effects on bacterial metabolism of the redox dye 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride. *Applied and Environmental Microbiology 62*, 4587–4593. https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4587-4593.1996

Urwin, L., Savva, O., Corrigan, R.M., 2024. Microbial Primer: What is the stringent response and how does it allow bacteria to survive stress? This article is part of the Microbial Primers collection. *Microbiology 170*. https://doi.org/10.1099/mic.0.001483

Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H.J., Norde, W., De Vries, J., Van Der Mei, H.C., 2004. Atomic force microscopic corroboration of bond aging for adhesion of *Streptococcus thermophilus* to solid substrata. *Journal of Colloid and Interface Science 278*, 251–254. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.05.045

Valiei, A., Kumar, A., Mukherjee, P.P., Liu, Y., Thundat, T., 2012. A web of streamers: biofilm formation in a porous microfluidic device. *Lab on a Chip 12*, 5133. https://doi.org/10.1039/c2lc40815e

Van Loenhout, M.T.J., Stefan Kooij, E., Wormeester, H., Poelsema, B., 2009. Hydrodynamic flow induced anisotropy in colloid adsorption. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 342*, 46–52. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.03.058

Van Teeffelen, S., Shaevitz, J.W., Gitai, Z., 2012. Image analysis in fluorescence microscopy: Bacterial dynamics as a case study. *BioEssays 34*, 427–436. https://doi.org/10.1002/bies.201100148

Vater, S.M., Weiße, S., Maleschlijski, S., Lotz, C., Koschitzki, F., Schwartz, T., Obst, U., Rosenhahn, A., 2014. Swimming Behavior of *Pseudomonas aeruginosa* Studied by Holographic 3D Tracking. *PLoS ONE 9*, e87765. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087765

Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor, B.J., Ringelberg, D.B., White, D.C., Nishijima, M., Sano, H., Burghardt, J., Stackebrandt, E., Nealson, K.H., 1999. Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 49*, 705–724. https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-705

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H., Smith, H.O., 2004. Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science 304*, 66–74. https://doi.org/10.1126/science.1093857

Vigué, A., Vautier, D., Kaytoue, A., Senger, B., Arntz, Y., Ball, V., Ben Mlouka, A., Gribova, V., Hajjar-Garreau, S., Hardouin, J., Jouenne, T., Lavalle, P., Ploux, L., 2022. *Escherichia coli* Biofilm Formation, Motion and Protein Patterns on Hyaluronic Acid and Polydimethylsiloxane Depend on Surface Stiffness. *Journal of Functional Biomaterials 13*, 237. https://doi.org/10.3390/jfb13040237

Vilain, S., Pretorius, J.M., Theron, J., Brözel, V.S., 2009. DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* Requires Extracellular DNA To Form Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology 75*, 2861–2868. https://doi.org/10.1128/AEM.01317-08

Virgile, C., Hauk, P., Wu, H., Bentley, W.E., 2019. Plasmid-encoded protein attenuates *Escherichia COLI* swimming velocity and cell growth, not reprogrammed regulatory functions. *Biotechnology Progress 35*, e2778. https://doi.org/10.1002/btpr.2778

Wadhwa, N., Berg, H.C., 2022. Bacterial motility: machinery and mechanisms. *Nature Reviews Microbiology 20*, 161–173. https://doi.org/10.1038/s41579-021-00626-4

Wan, J., Tokunaga, T. K., Tsang, C. F., 1995. Bacterial sedimentation through a porous medium. *Water Resources Research 31*(7), 1627-1636.

Wang, A., Garmann, R.F., Manoharan, V.N., 2016. Tracking *E. coli* runs and tumbles with scattering solutions and digital holographic microscopy. *Optics Express 24*, 23719. https://doi.org/10.1364/OE.24.023719

Wang, F., Fan, F., Yuan, D., Wang, X., 2022a. In-Line and Off-Axis Hybrid Digital Holographic Imaging Method Based on Off-Axis Hologram Constraints. *International Journal of Optics*, *2022*(1), 6577057.

Wang, G., Huang, G., Gong, X., Zhang, G., 2020a. Method for 3D tracking behaviors of interplaying bacteria individuals. *Optics Express 28*, 28060. https://doi.org/10.1364/OE.401032

Wang, H., Zhang, Y., Bartlett, D.H., Xiao, X., 2021. Transcriptomic Analysis Reveals Common Adaptation Mechanisms Under Different Stresses for Moderately Piezophilic Bacteria. *Microbial Ecology 81*, 617–629. https://doi.org/10.1007/s00248-020-01609-3

Wang, J., Blount, P., 2023. Feeling the tension: the bacterial mechanosensitive channel of large conductance as a model system and drug target. *Current Opinion in Physiology 31*, 100627. https://doi.org/10.1016/j.cophys.2022.100627

Wang, S., Chang, X., Zhao, K., Gao, K., Liu, C., & Xie, X., 2025. Coupling Hydrodynamics and Biofilm Detachment to Predict Iron Bioreduction by *Shewanella oneidensis* MR-1. *ACS ES&T Water 5*(9), 5416-5425.

Wang, S., Liang, H., Liu, L., Jiang, X., Wu, S., Gao, H., 2020b. Promiscuous Enzymes Cause Biosynthesis of Diverse Siderophores in *Shewanella oneidensis*. *Applied and Environmental Microbiology 86*, e00030-20. https://doi.org/10.1128/AEM.00030-20

Wang, S., Zhu, H., Zheng, G., Dong, F., Liu, C., 2022b. Dynamic Changes in Biofilm Structures under Dynamic Flow Conditions. *Applied and Environmental Microbiology 88*, e01072-22. https://doi.org/10.1128/aem.01072-22

Wang, T., Flint, S., Palmer, J., 2019. Magnesium and calcium ions: roles in bacterial cell attachment and biofilm structure maturation. *Biofouling 35*, 959–974. https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1674811

Wang, Y., Haitjema, C.H., Fuqua, C., 2014. The Ctp Type IVb Pilus Locus of *Agrobacterium tumefaciens* Directs Formation of the Common Pili and Contributes to Reversible Surface Attachment. *Journal of Bacteriology 196*, 2979–2988. https://doi.org/10.1128/JB.01670-14

Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics 10*, 57–63. https://doi.org/10.1038/nrg2484

Wassmann, T., Kreis, S., Behr, M., Buergers, R., 2017. The influence of surface texture and wettability on initial bacterial adhesion on titanium and zirconium oxide dental implants. *International Journal of Implant Dentistry 3*, 32. https://doi.org/10.1186/s40729-017-0093-3

Watari, N., Larson, R.G., 2010. The Hydrodynamics of a Run-and-Tumble Bacterium Propelled by Polymorphic Helical Flagella. *Biophysical Journal 98*, 12–17. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.044

Wei, D., Hu, S., Tang, T., Yang, Y., Meng, F., Peng, Y., 2025. Confinement reduces surface accumulation of swimming bacteria. *Physical Review Letters 135*, 188401. https://doi.org/10.1103/dvc8-tlh1

Weibel, D.B., DiLuzio, W.R., Whitesides, G.M., 2007. Microfabrication meets microbiology. *Nature Reviews Microbiology 5*, 209–218. https://doi.org/10.1038/nrmicro1616

Wheeler, J.D., Secchi, E., Rusconi, R., Stocker, R., 2019. Not Just Going with the Flow: The Effects of Fluid Flow on Bacteria and Plankton. *Annual Review of Cell and Developmental Biology 35*, 213–237. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125119

Wilson, L.G., Martinez, V.A., Schwarz-Linek, J., Tailleur, J., Pusey, P.N., Bryant, G., Poon, W.C.K., 2011. Differential Dynamic Microscopy of Bacterial Motility. *Physical Review Letters 106*, 018101. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.106.018101

Wu, C., Cheng, Y.-Y., Yin, H., Song, X.-N., Li, W.-W., Zhou, X.-X., Zhao, L.-P., Tian, L.-J., Han, J.-C., Yu, H.-Q., 2013. Oxygen promotes biofilm formation of *Shewanella putrefaciens* CN32 through a diguanylate cyclase and an adhesin. *Scientific Reports 3*, 1945. https://doi.org/10.1038/srep01945

Wu, L., Wang, J., Tang, P., Chen, H., Gao, H., 2011. Genetic and Molecular Characterization of Flagellar Assembly in *Shewanella oneidensis. PLoS ONE 6*, e21479. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021479

Wu, X.-L., Libchaber, A., 2000. Particle Diffusion in a Quasi-Two-Dimensional Bacterial Bath. *Physical Review Letters 84*, 3017–3020. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.84.3017

Xie, P., Xu, Y., Tang, J., Wu, S., Gao, H., 2024. Multifaceted regulation of siderophore synthesis by multiple regulatory systems in *Shewanella oneidensis*. *Communications Biology 7*, 498. https://doi.org/10.1038/s42003-024-06193-7

Xu, L.-C., Vadillo-Rodriguez, V., Logan, B.E., 2005. Residence Time, Loading Force, pH, and Ionic Strength Affect Adhesion Forces between Colloids and Biopolymer-Coated Surfaces. *Langmuir 21*, 7491–7500. https://doi.org/10.1021/la0509091

Xu, S., Hu, E., Cai, Y., Xie, Z., Luo, X., Zhan, L., Tang, W., Wang, Q., Liu, B., Wang, R., Xie, W., Wu, T., Xie, L., Yu, G., 2024. Using clusterProfiler to characterize multiomics data. *Nature Protocols 19*, 3292–3320. https://doi.org/10.1038/s41596-024-01020-z

Xu, Z., Niu, W.A., Rivera, S.L., Tuominen, M.T., Siegrist, M.S., Santore, M.M., 2021. Surface Chemistry Guides the Orientations of Adhering *E. coli* Cells Captured from Flow. *Langmuir 37*, 7720–7729. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00764

Yakovenko, O., Sharma, S., Forero, M., Tchesnokova, V., Aprikian, P., Kidd, B., Mach, A., Vogel, V., Sokurenko, E., Thomas, W.E., 2008. FimH Forms Catch Bonds That Are Enhanced by Mechanical Force Due to Allosteric Regulation. *Journal of Biological Chemistry 283*, 11596–11605. https://doi.org/10.1074/jbc.M707815200

Yang, C., Rodionov, D.A., Li, X., Laikova, O.N., Gelfand, M.S., Zagnitko, O.P., Romine, M.F., Obraztsova, A.Y., Nealson, K.H., Osterman, A.L., 2006. Comparative Genomics and Experimental Characterization of N-Acetylglucosamine Utilization Pathway of *Shewanella oneidensis*. *Journal of Biological Chemistry 281*, 29872–29885. https://doi.org/10.1074/jbc.M605052200

Yang, J., Kikuchi, K., Ishikawa, T., 2023. High shear flow prevents bundling of bacterial flagella and induces lateral migration away from a wall. *Communications Physics 6*, 354. https://doi.org/10.1038/s42005-023-01471-y

Yang, R.-S., Chen, Y.-T., 2020. Flagellation of *Shewanella oneidensis* Impacts Bacterial Fitness in Different Environments. *Current Microbiology 77*, 1790–1799. https://doi.org/10.1007/s00284-020-01999-0

Yang, Y., Harris, D.P., Luo, F., Wu, L., Parsons, A.B., Palumbo, A.V., Zhou, J., 2008. Characterization of the *Shewanella oneidensis* Fur gene: roles in iron and acid tolerance response. *BMC Genomics 9*, S11. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-S1-S11

Yawata, Y., Nguyen, J., Stocker, R., Rusconi, R., 2016. Microfluidic Studies of Biofilm Formation in Dynamic Environments. *Journal of Bacteriology 198*, 2589–2595. https://doi.org/10.1128/JB.00118-16

Yawata, Y., Toda, K., Setoyama, E., Fukuda, J., Suzuki, H., Uchiyama, H., Nomura, N., 2010. Monitoring biofilm development in a microfluidic device using modified confocal reflection microscopy. *Journal of Bioscience and Bioengineering 110*, 377–380. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.04.002

Yin, Y., Yu, H.-T., Tan, H., Cai, H., Chen, H.-Y., Lo, C.-J., Guo, S., 2022. Escaping speed of bacteria from confinement. *Biophysical Journal 121*, 4656–4665. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.10.023

Yoda, I., Koseki, H., Tomita, M., Shida, T., Horiuchi, H., Sakoda, H., Osaki, M., 2014. Effect of surface roughness of biomaterials on *Staphylococcus epidermidis* adhesion. *BMC Microbiology 14*, 234. https://doi.org/10.1186/s12866-014-0234-2

Young, K.D., 2006. The Selective Value of Bacterial Shape. *Microbiology and Molecular Biology Reviews 70*, 660–703. https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-06

Yu, G., Wang, L.-G., Han, Y., He, Q.-Y., 2012. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. *OMICS: A Journal of Integrative Biology 16*, 284–287. https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118

Yu, J., Zhang, Y., Liu, H., Liu, Y., Mohsin, A., Liu, Z., Zheng, Y., Xing, J., Han, J., Zhuang, Y., Guo, M., Wang, Z., 2024. Temporal dynamics of stress response in *Halomonas elongata* to NaCl shock: physiological, metabolomic, and transcriptomic insights. *Microbial Cell Factories 23*, 88. https://doi.org/10.1186/s12934-024-02358-5

Yuan, L., Straub, H., Shishaeva, L., Ren, Q., 2023. Microfluidics for Biofilm Studies. *Annual Review of Analytical Chemistry 16*, 139–159. https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-091522-103827

Yuan, Y., Hays, M.P., Hardwidge, P.R., Kim, J., 2017. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Advances 7*, 14254–14261. https://doi.org/10.1039/C7RA01571B

Zarkani, A.A., López-Pagán, N., Grimm, M., Sánchez-Romero, M.A., Ruiz-Albert, J., Beuzón, C.R., Schikora, A., 2020. *Salmonella* Heterogeneously Expresses Flagellin during Colonization of Plants. *Microorganisms 8*, 815. https://doi.org/10.3390/microorganisms8060815

Zeng, Z., Liu, X., Yao, J., Guo, Y., Li, B., Li, Y., Jiao, N., Wang, X., 2016. Cold adaptation regulated by cryptic prophage excision in *Shewanella oneidensis*. *ISME JOURNAL 10*, 2787–2800. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.85

Zhang, H., Wetherington, M.T., Ko, H., FitzGerald, C.E., Munro, E.M., Nirody, J.A., 2024. Bacterial motility patterns adapt smoothly in response to spatial confinement and disorder. https://doi.org/10.1101/2024.09.29.615714

Zhang, J., Fu, Y., Fong, C.Y., Hua, H., Li, W., Khoo, B.L., 2025. Advancements in microfluidic technology for rapid bacterial detection and inflammation-driven diseases. *Lab on a Chip 25*, 3348–3373. https://doi.org/10.1039/D4LC00795F

Zhang, Jiawei, Li, C., Rahaman, M.M., Yao, Y., Ma, P., Zhang, Jinghua, Zhao, X., Jiang, T., Grzegorzek, M., 2022. A comprehensive review of image analysis methods for microorganism counting: from classical image processing to deep learning approaches. *Artificial Intelligence Review 55*, 2875–2944. https://doi.org/10.1007/s10462-021-10082-4

Zhang, X.-Y., Sun, K., Abulimiti, A., Xu, P.-P., Li, Z.-Y., 2019. Microfluidic System for Observation of Bacterial Culture and Effects on Biofilm Formation at Microscale. *Micromachines 10*, 606. https://doi.org/10.3390/mi10090606

Zhang, Z., Liao, X., Tong, W., Wang, J., Wang, C., 2023. Emerging advances in optical-based analysis of bacterial motility. *Trends in Analytical Chemistry 167*, 117218. https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117218

Zhao, K., Liu, M., Burgess, R.R., 2007. Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. *Nucleic Acids Research 35*, 4441–4452. https://doi.org/10.1093/nar/gkm456

Zheng, C., Yu, Z., Du, C., Gong, Y., Yin, W., Li, X., He, J., 2020. 2-Methylcitrate cycle: a well-regulated controller of Bacillus sporulation. *Environmental Microbiology 22*(3), 1125-1140.

Zheng, S., Bawazir, M., Dhall, A., Kim, H.-E., He, L., Heo, J., Hwang, G., 2021. Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology 9*, 643722. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.643722

Zhou, G., Yuan, J., Gao, H., 2015. Regulation of biofilm formation by BpfA, BpfD, and BpfG in *Shewanella oneidensis*. *Frontiers in Microbiology 6*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00790

Zhu, J., Wang, M., Zhang, H., Yang, S., Song, K. Y., Yin, R., & Zhang, W., 2020. Effects of hydrophilicity, adhesion work, and fluid flow on biofilm formation of PDMS in microfluidic systems. *ACS Applied Bio Materials 3*(12), 8386-8394.

Zhu, M., Dai, X., 2023. Stringent response ensures the timely adaptation of bacterial growth to nutrient downshift. *Nature Communications 14*, 467. https://doi.org/10.1038/s41467-023-36254-0

Zhu, X., Jańczewski, D., Guo, S., Lee, S.S.C., Parra Velandia, F.J., Teo, S.L.-M., He, T., Puniredd, S.R., Vancso, G.J., 2015. Polyion Multilayers with Precise Surface Charge Control for Antifouling. *ACS Applied Materials & Interfaces 7*, 852–861. https://doi.org/10.1021/am507371a

Zhuang, J., Du, X., Liu, K., Hao, J., Wang, H., An, R., Liang, X., 2024. DNase II Can Efficiently Digest RNA and Needs to Be Redefined as a Nuclease. *Cells 13*, 1525. https://doi.org/10.3390/cells13181525

Zöttl, A., Stark, H., 2016. Emergent behavior in active colloids. *Journal of Physics: Condensed Matter 28*, 253001. https://doi.org/10.1088/0953-8984/28/25/253001

Zöttl, A., Stark, H., 2012. Nonlinear Dynamics of a Microswimmer in Poiseuille Flow. *Physical Review Letters 108*, 218104. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.108.218104

Zou, L., Wu, X., Huang, Y., Ni, H., Long, Z., 2019. Promoting *Shewanella* Bidirectional Extracellular Electron Transfer for Bioelectrocatalysis by Electropolymerized Riboflavin Interface on Carbon Electrode. *Frontiers in Microbiology 9,* 3293. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03293

Zou, Y., Qu, Y., Zhang, Y., Yu, Q., 2025. Multifunctional antibiofilm materials: surface engineering and nanotherapeutic strategies for biofilm prevention and eradication. *Acta Biomaterialia 203*, 155–180. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2025.07.029

Approches pluridisciplinaires pour l'étude de l'adhésion et du transport de *Shewanella oneidensis* en écoulement confiné

Ce travail de thèse vise à la compréhension des premières étapes de l'adhésion bactérienne aux surfaces, de la dynamique de transport jusqu'à la colonisation initiale par les bactéries pionnières, grâce au développement d'approches pluridisciplinaires. Ces dernières nous ont permis d'accéder aux hétérogénéités populationnelles en travaillant à l'échelle individuelle, tout en analysant simultanément un grand nombre de bactéries. Plus spécifiquement, les objectifs de ce travail sont de déterminer comment l'écoulement influence (1) la dynamique d'adhésion des bactéries pionnières à la paroi, (2) les mécanismes de transport en amont du contact avec la paroi et (3) la réponse biologique des bactéries soumises au stress hydrodynamique. Pour y répondre, des expériences ont été menées au sein d'un système microfluidique en utilisant une bactérie modèle *Shewanella oneidensis MR-1*, une bactérie monotriche polaire que nous avons exposée à différents taux de cisaillement. Le développement d'une approche automatisée de traitement d'image, basée sur le Deep Learning, a permis dans un premier temps de quantifier de manière robuste la dynamique d'adhésion bactérienne à la paroi sous flux en accédant à des paramètres clés tels que le temps de résidence, l'orientation et les déplacements des bactéries à la paroi. Les résultats mettent en évidence une dualité marquée de l'effet de cisaillement sur cette dynamique, caractérisée par un comportement bactérien très transitoire à la paroi (70 % des bactéries y restent moins d'une minute) et une orientation préférentielle dans le sens de l'écoulement. L'impact de l'écoulement sur la dynamique de nage et de transport de *S. oneidensis* dans le volume a ensuite été exploré en trois dimensions grâce à la mise en œuvre de la microscopie holographique numérique sous flux. Cette approche a permis de caractériser les propriétés de nage de *S. oneidensis*, une bactérie se déplaçant à des vitesses relativement élevées (~ 40 µm/s), selon des trajectoires particulièrement rectilignes (longs *runs*) et avec une forte persistance directionnelle. En présence d'un écoulement, cette dynamique est fortement modifiée : les trajectoires deviennent contraintes, la liberté d'exploration du volume est réduite, et des comportements spécifiques émergent, tels que la rhéotaxie bactérienne et le *shear trapping*. Enfin, la réponse biologique de *S. oneidensis* au stress hydrodynamique a été analysée par transcriptomique, révélant l'activation d'une réponse multifactorielle coordonnée sous écoulement. Celle-ci se caractérise à la fois par une reprogrammation métabolique orientée vers la production d'énergie, un ralentissement global des activités de transcription et de traduction, ainsi qu'une surexpression des gènes impliqués dans l'assemblage des flagelles. Ces signaux suggèrent la mise en place d'une stratégie de survie fondée sur une réallocation des ressources énergétiques au détriment de la croissance. Les approches pluridisciplinaires de ce travail ont permis d'accéder à de nouvelles grandeurs quantitatives, obtenues par l'expérience, qui sont caractéristiques de la dynamique individuelle des bactéries sous écoulement à la paroi et dans le bulk. Elles constituent des preuves de concepts révélant la modulation à la fois des comportements physiques des bactéries (adhésion, transport, nage) et de leur réponse cellulaire au stress hydrodynamique.

Mots clés : Adhésion pionnière, Transport bactérien, Hydrodynamique, Deep Learning, Microscopie holographique, *Shewanella oneidensis*

Multidisciplinary approaches for studying the adhesion and transport of *Shewanella oneidensis* in confined flow

This thesis work aims at understanding the first steps of bacterial adhesion to surfaces, from transport dynamics to initial colonization by pioneer bacteria, through the development of multidisciplinary approaches. These approaches have enabled us to study population heterogeneity on an individual scale while analyzing a large number of bacteria simultaneously. More specifically, the objectives are to determine how hydrodynamics influence (1) the adhesion dynamics of pioneer bacteria to the wall, (2) transport mechanisms occurring prior to wall contact, and (3) the bacterial cellular response to hydrodynamic stress. To meet these objectives, experiments were conducted in a microfluidic system using Shewanella oneidensis MR-1, a polar monotrichous bacterium, which was exposed to varying shear rates. The development of an automated image processing approach based on deep learning first enabled robust quantification of pioneer bacterial adhesion dynamics at the wall under flow, by extracting key parameters such as residence time, orientation, and bacterial displacement along the wall. These results highlight a clear duality in the effect of shear on this process, characterized by transient bacterial behavior at the wall (70 % of bacteria remaining for less than one minute) and preferential orientation in the direction of flow. The impact of flow on the swimming and transport dynamics of *S. oneidensis* in the bulk was then explored in three dimensions using digital holographic microscopy. This approach enabled the characterization of the swimming properties of *S. oneidensis*, a bacterium that moves at relatively high speeds (~ 40 µm/s), following particularly smooth trajectories (long runs) with strong directional persistence. This dynamic is strongly altered under flow: trajectories become constrained, freedom to explore the volume is reduced, and specific behaviors emerge, such as bacterial rheotaxis and shear trapping. Finally, the biological response of *S. oneidensis* to hydrodynamic stress was investigated using a transcriptomic analysis. This revealed the activation of a coordinated, multifactorial response under flow conditions. This response is characterized by metabolic reprogramming geared towards energy production, a general slowdown in transcription and translation activities, and the overexpression of genes involved in flagellum assembly. Together, these findings suggest the implementation of a survival strategy involving the reallocation of energy resources at the expense of growth. The multidisciplinary approaches used in this work have provided access to new quantitative parameters, obtained through experimentation, which are characteristic of the individual dynamics of bacteria under flow conditions, whether at the wall or in the bulk. They constitute proof of concept, revealing how the physical behaviour of bacteria (adhesion, transport, motility) and their cellular response to hydrodynamic stress are modulated.

Keywords: Pioneer adhesion / Bacterial transport / Hydrodynamics / Deep Learning / Holographic microscopy / *Shewanella oneidensis*