



HAL
open science

Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms.

Marine Baudin

► **To cite this version:**

Marine Baudin. Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms.. Autre. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLC013 . tel-01552488v2

HAL Id: tel-01552488

<https://theses.hal.science/tel-01552488v2>

Submitted on 10 Jul 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2017SACL013

THESE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY

Préparée à CentraleSupélec

ECOLE DOCTORALE N°573

Interfaces | Approches interdisciplinaires : fondements, applications et innovation

Spécialité : Biologie

Par

Marine Baudin

« Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms. »

Thèse soutenue publiquement à Cachan, le 28 février 2017

Composition du jury :

M. Romain Briandet	Directeur de recherche, INRA	Président du jury
Mme Corinne Dorel-Flamant	Maître de conférences, INSA Lyon	Rapportrice
M. Konstantin Brodolin	Chargé de recherche, Université de Montpellier	Rapporteur
Mme Sylvie Rimsky	Directrice de recherche, Collège de France	Examinatrice
Mme Dominique Pareau	Professeure, CentraleSupélec	Directrice de thèse
Mme Bianca Sclavi	Chargée de recherche, ENS Paris-Saclay	Co-directrice de thèse
Mme Filipa Lopes	Maître de conférences, CentraleSupélec	Co-encadrante, invitée

A mes grands-pères, Max Baudin et Jacques Sabatier

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse qui auront pris le temps de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de doctorat.

Je remercie ensuite mes directrices de thèse Dominique Pareau et Bianca Scavi ainsi que mes encadrants Filipa Lopes, Rachel Méallet-Renault et Gilles Clavier de m'avoir fait confiance en me sélectionnant pour le projet « NANOGENOBIOFILM », de m'avoir accompagnée, orientée, conseillée au cours de ces trois dernières années, et sans qui mon sujet de thèse n'aurait jamais vu le jour. Ils ont été en quelque sorte ma famille de substitution pendant trois ans. Je dis ça non seulement parce qu'en terme de fréquence – et donc de quantité – je les ai vus plus de fois que ma famille biologique pendant mon doctorat, mais aussi pour le soutien d'acier et l'aide précieuse qu'ils m'ont apportés tout au long de ma thèse.

Mes travaux ont été réalisés au sein des laboratoires de biologie et de pharmacologie appliquée (LBPA), de génie des procédés et matériaux (LGPM) et de photophysique et photochimie supramoléculaires et macromoléculaires (PPSM). Je remercie donc les directeurs de ces laboratoires, respectivement Malcolm Buckle, Patrick Perré et Fabien Miomandre, de m'avoir accueillie au sein de leur structure et de m'avoir permis d'y mener mes recherches. Je remercie l'Institut d'Alembert (IDA) d'avoir également contribué au financement de ce projet. Je remercie finalement toutes les personnes qui ont de près ou de loin pu me venir en aide à un moment donné au cours de ma thèse, au LBPA, au LGPM, au PPSM, ou à n'importe quel autre endroit d'ailleurs.

Je souhaite remercier tout particulièrement Cédric Absalon (anciennement LGPM), Jeff Audibert (PPSM) et Bertrand Cinquin (LBPA) pour le rôle clé qu'ils ont joué dans mon doctorat.

* Cédric, quand je ne connaissais rien aux biofilms, aux milieux de culture, à la croissance en microfluidique ou à l'utilisation de COMSTAT (Heydorn et al, 2000). Je le remercie pour ses précieux conseils techniques et pour l'écriture du script Icy de renom des fichiers au bon format pour une utilisation dans COMSTAT (avec la version 2.0, la version 2.1 supportant un nouveau format).

* Jeff, quand je ne connaissais pas grand-chose à la microscopie optique ni à la physique quantique. Je le remercie de m'avoir formée au départ sur le microscope à épifluorescence ainsi que sur les logiciels d'acquisition et d'analyse d'images. Je le remercie également d'avoir toujours été disponible pour mes demandes (parfois farfelues), de la sonde thermique à la régulation de température en pièce H9 de l'IDA, en passant par la construction d'un meuble spécial en pièce H5, meuble que je n'aurais finalement jamais utilisé (mais d'autres en auront profité, ça valait le coup). Je le remercie finalement pour la production des masques de repositionnement adaptés à mes chambres fluidiques, pour les ROI (region of interest) correspondantes sur Micro-Manager, pour les *time-lapses* macroscopiques où l'on s'est improvisés photographes, ainsi que pour la construction de la plateforme adaptée à mes cellules de flux pour la fixation plane et stable des échantillons au confocal.

* Bertrand, quand je commençais à perdre espoir et à ne plus croire en mon sujet. Je n'aurais peut-être jamais terminé ma thèse s'il n'était pas arrivé au LBPA en décembre 2015. Je le remercie d'avoir développé la macro ImageJ pour la caractérisation des biofilms en termes de structures et d'intensités de fluorescence associées, outil si précieux et croustillant de ma thèse, un bébé nommé BIAM (Biofilm Intensity and Architecture Measurement). Notre travail collaboratif m'a permis de retrouver force et ambition à un moment où je pensais avoir perdu le cap. Je le remercie aussi d'avoir cru en moi (sans doute parfois plus que moi) et de m'avoir sincèrement encouragée ; je me sentais souvent regagnée de confiance et d'énergie positive à son contact. La vie est un kaléidoscope.

Mes derniers remerciements vont à mes proches.

Je remercie mes chers amis qui savent qu'ils sont chers à mes yeux et à mon cœur. Je les remercie de m'avoir soutenue et d'avoir humblement compris que je serais moins disponible avec mon projet de thèse.

Je remercie Jeff pour nos discussions essentielles et futiles, profondes et légères, éternelles et éphémères, réelles et abstraites, scientifiques et philosophiques ; ces conversations faites de tout et de rien, de vie et d'inertie, celles à refaire le monde et à le contempler en même temps. Je le remercie pour sa grande ouverture d'esprit, son respect profond et sa liberté immense. Je suis chanceuse que la vie m'ait donné en sa personne un véritable ami.

Je remercie tout particulièrement une personne – qui se reconnaîtra – ayant veillé à mon bien-être au long de ces années. Le soin et l'écoute qu'elle a portés à mes doutes et mes questionnements ont été d'une aide fondamentale pour surmonter les épreuves tant professionnelles que personnelles de ma vie. Les portes qu'elle m'a permis d'ouvrir laissent infini le champ des possibles.

Je remercie enfin ma famille. J'ai une grande famille, et il ne me faudrait pas loin d'un second manuscrit pour remercier chaque membre en particulier. Merci donc à toute ma famille pour son soutien pluriel, tant émotionnel, psychologique, culinaire que financier, et pour l'amour qu'elle m'a toujours donné. Plus spécifiquement, je souhaite remercier mes parents et mes deux sœurs. Sans eux, je ne serais ni là aujourd'hui, ni arrivée jusqu'ici. Ma mère, Carolyne, ma plus grande fan. Merci pour le soutien sans faille et l'amour inconditionnel qu'elle me porte, et qui me portent. Mon père, Stéphane, mon plus fidèle supporter. Merci pour les encouragements, les leçons de vie et les valeurs qu'il me transmet. Ma grande sœur, Morgane, ma grande amie, ma confidente, mon modèle. Merci d'avoir toujours été là pour moi et d'être cette oreille attentive, cette voix réconfortante, cette main généreuse, ce cœur aimant. Ma petite sœur, Mathilde, mon petit cœur, mon arc-en-ciel, ma combattante. Merci d'avoir été ce compagnon d'enfance et d'être cette alliée fidèle, cette âme protectrice, cet amour sincère, cette aventure intense. Ils m'ont tant donné. J'espère pouvoir être un jour une source d'inspiration et de liberté à leurs yeux en retour.

Last but not least, je remercie Guillaume. Je le remercie pour tout ce qu'il est, pour tout ce qu'il m'a donné, pour le soutien précieux, l'aide incommensurable, la confiance immense, l'altruisme pur et le respect sans nom dont il a toujours fait preuve à mon égard. Je le remercie d'avoir été cette épaule solide, ce cœur tendre, cet esprit critique, cette âme bienveillante. Je le remercie de m'avoir tendu la main, de m'avoir montré qu'il existait un « autrement », d'avoir souvent mis au défi mon ouverture d'esprit, de m'avoir prouvé qu'il est possible de poursuivre ses rêves même les plus fous et d'avoir ravivé ceux de l'enfant que j'étais. Je n'aurais sans nul doute jamais les mots justes pour décrire combien la croisée de nos chemins aura changé ma vie. On dit souvent que les rencontres font les plus beaux voyages ; j'ai foi en celui que je m'appête à entreprendre et j'aspire à ce qu'il soit le plus épique des chapitres de mon existence.

« Certes, la science s'efforce de décrire la nature et de distinguer le rêve de la réalité. Mais il ne faut pas oublier que l'être humain a probablement autant besoin de rêve que de réalité. C'est l'espoir qui donne son sens à la vie. Et l'espoir se fonde sur la perspective de pouvoir un jour transformer le monde présent en un monde possible qui paraît meilleur. »

François Jacob, *Le Jeu des possibles*, 1981, chapitre « Le temps et l'invention de l'avenir ».

« Vous pouvez avoir le don de la prédiction scientifique et comprendre le rôle des molécules, vous pouvez violer les secrets de la nature et en tirer de nouveaux succès, vous pouvez gravir les hauteurs des réussites académiques, en sorte d'avoir toute science, et vous pouvez vous glorifier de vos grandes institutions d'enseignement et de l'extension illimitée de vos diplômes ; mais sans l'amour, tout cela ne signifie absolument rien. »

Martin Luther King, *La Force d'aimer*, chapitre « Lettre de Paul aux chrétiens d'Amérique ».

“A smooth sea never made a skilled sailor.”

— Franklin D. Roosevelt

Sommaire

Introduction générale.....	1
1. Contexte bibliographique	3
1.1 L'ère « biofilmienne ».....	3
1.2 Qu'est-ce qu'un biofilm ?.....	3
1.2.1 Définition des biofilms	3
1.2.2 Cycle de vie des biofilms	6
1.3 Ubiquité des biofilms	11
1.3.1 Biofilms et nature	11
1.3.2 Biofilms et Homme	12
1.3.3 Biofilms et applications.....	13
1.4 Problèmes relatifs aux biofilms	14
1.4.1 Biofilms problématiques en santé.....	14
1.4.2 Biofilms problématiques en industrie.....	17
1.5 Stratégies de lutte contre les biofilms.....	18
1.5.1 Inhibition de l'attachement microbien.....	19
1.5.2 Inhibition du développement microbien.....	20
1.5.3 Induction de la dispersion.....	22
1.6 Objectifs des travaux et choix de la stratégie d'étude	25
1.6.1 Choix de l'organisme modèle.....	25
1.6.2 Choix de la technologie d'étude	27
1.6.3 Choix du système d'étude	28
1.6.4 Bilan	28
2. Matériel & Méthodes	29
2.1 Microbiologie	29
2.1.1 Milieux de culture.....	29
2.1.2 Microorganismes	30
2.2 Biologie moléculaire	31
2.2.1 Construction des rapporteurs génétiques.....	31
2.2.2 Délétion du gène de résistance à la kanamycine (<i>kan^R</i>)	39
2.3 Fluorimétrie.....	41
2.3.1 Préparation des microplaques.....	41
2.3.2 Lecture des microplaques	42
2.3.3 Analyse des données de fluorimétrie.....	42
2.4 Microfluidique.....	42
2.4.1 Développement de biofilms en microfluidique	42

2.4.2	Marquage des biofilms développés en microfluidique.....	44
2.4.3	Expériences de dispersion en microfluidique.....	44
2.5	Imagerie.....	45
2.5.1	Microscopie à épifluorescence	45
2.5.2	Microscopie confocale à balayage laser (CLSM).....	46
2.5.3	Analyse d'images	46
2.6	Statistique	46
3.	Développement et caractérisation de biofilms d'<i>E. coli</i> formés en bioréacteur microfluidique.....	47
3.1	Conception du système d'étude.....	47
3.1.1	Système microfluidique initial	47
3.1.2	Système microfluidique modifié	48
3.1.3	Sélection de la cellule de flux.....	49
3.1.4	Inoculation des chambres fluidiques	52
3.2	Conditions d'opération de croissance des biofilms	55
3.2.1	Concentration de l'inoculum bactérien.....	55
3.2.2	Milieu de culture et vitesse spécifique de croissance	56
3.2.3	Débit volumique	58
3.2.4	Température.....	59
3.2.5	Vérification de la croissance des biofilms	60
3.3	Marquage des biofilms	62
3.3.1	Principe de marquage des biofilms.....	62
3.3.2	Marquage des biofilms <i>in situ</i>	64
3.3.3	Détermination des concentrations d'utilisation des marqueurs	67
3.4	Caractérisation des biofilms marqués.....	69
3.4.1	Caractérisation de la biomasse bactérienne	69
3.4.2	Caractérisation de la matrice extracellulaire	70
3.4.3	Caractérisation de la biomasse bactérienne non-viable au sein du biofilm	73
3.5	Discussion et perspectives du chapitre 3	75
3.6	Conclusion du chapitre 3.....	78
4.	Construction et caractérisation de rapporteurs génétiques pour l'étude de la dispersion ...	80
4.1	Sélection des candidats rapporteurs.....	80
4.1.1	Gènes caractéristiques d'un mode de vie sessile	81
4.1.2	Gènes caractéristiques d'un mode de vie planctonique	84
4.1.3	Gène caractéristique d'un état transitoire entre les deux modes de vie	87
4.2	Stratégie générale de construction des souches génétiquement modifiées.....	90

4.3	Caractérisation des rapporteurs génétiques en croissance planctonique	93
4.3.1	Présentation des résultats de fluorimétrie	93
4.3.2	Expression des rapporteurs génétiques en vecteur plasmidique.....	95
4.3.3	Expression des rapporteurs génétiques en insertion chromosomique	101
4.3.4	Délétion du gène de résistance à la kanamycine (<i>kan^R</i>)	103
4.4	Caractérisation des rapporteurs génétiques au sein des biofilms	106
4.5	Discussion et perspectives du chapitre 4	111
4.6	Conclusion du chapitre 4	114
5.	Etude de la dispersion des biofilms d'<i>E. coli</i> formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA	116
5.1	Effets du CDA sur les bactéries en mode de vie planctonique.....	116
5.1.1	Effets du CDA sur la croissance des souches.....	116
5.1.2	Effets du CDA sur l'expression des rapporteurs	117
5.2	Effets du CDA sur les bactéries en mode de vie communautaire.....	119
5.2.1	Effets du CDA sur les structures des biofilms.....	119
5.2.2	Effets du CDA sur l'expression des rapporteurs au sein des biofilms	128
5.3	Discussion et perspectives du chapitre 5	151
5.4	Conclusion du chapitre 5	154
	Conclusion générale et perspectives de recherche.....	155
	Références bibliographiques.....	159
	Annexes	179

Liste des symboles et abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNe	acide désoxyribonucléique extracellulaire
Ag43	antigène 43
Amp	ampicilline
ANOVA	analysis of variance
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomique
ATP	adénosine triphosphate
BDSF	acide <i>cis</i> -2-dodécénoïque (<i>Burkholderia cenocepacia</i> diffusible signal factor)
BIAM	Biofilm Intensity and Architecture Measurement
CAA	casamino acids
CaCl ₂	chlorure de calcium
CBE	Center for Biofilm Engineering
CDA	acide <i>cis</i> -2-décénoïque
c-di-GMP	bis-(3',5')-cyclic-dimeric-guanosine monophosphate
CH ₃ CO ₂ K	acétate de potassium
CLSM	confocal laser scanning microscopy
Cm	chloramphénicol
ConA	concanavaline A
CP	contraste de phase
Cy	cyanine
DGC	diguanylate cyclase
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
DO	densité optique
dpi	dot per inch
DSF	acide <i>cis</i> -11-méthyl-2-dodécénoïque (diffusible signal factor)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique
ENS	Ecole Normale Supérieure
FDA	fluorescein diacetate
FITC	fluorescein isothiocyanate
FLP	flippase
<i>FRT</i>	flippase recognition target

GFP	green fluorescent protein
Glc	glucose
GMP	guanosine monophosphate
GTP	guanosine triphosphate
h	heure
HCl	chlorure d'hydrogène
HPLC	high performance liquid chromatography
HyD	hybride
IDA	Institut D'Alembert
IP	iodure de propidium
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
Kan	kanamycine
KCl	chlorure de potassium
KH ₂ PO ₄	potassium di-hydrogène phosphate
LB	Lysogeny Broth
LBPA	Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée
LGPM	Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux
LPS	lipopolysaccharides
MFI	mean fluorescence intensity
MgCl ₂	chlorure de magnésium
MgSO ₄	sulfate de magnésium
min	minute
MnCl ₂	chlorure de manganèse
MOPS	acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique
NA	ouverture numérique
NaCl	chlorure de sodium
NaClO	hypochlorite de sodium
Na ₂ HPO ₄	di-sodium hydrogène phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NH ₄ Cl	chlorure d'ammonium
NIH	National Institutes of Health
NO	monoxyde d'azote
NPF	nanoparticule fluorescente
ORF	open reading frame
ORL	otorhinolaryngologique
pb	paire de bases

PCR	polymerase chain reaction
PDE	phosphodiesterase
PGA	poly- β -1,6-N-acetylglucosamine
pGpG	5'-phosphoguananylyl-(3'-5')-guanosine
PMT	tube photomultiplicateur
PNA	peanut agglutinin
ppGpp	guanosine pentaphosphate
PPSM	Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires
PSM	poste de sécurité microbiologique
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
QS	quorum sensing
RbCl	chlorure de rubidium
RBS	ribosome binding site
ROI	région d'intérêt
rpm	rotation par minute
s	seconde
sfGFP	superfolder GFP
STIM	Société de Tôlerie Industrielle et Mécanique
TAE	tampon tris-HCl acétate EDTA
T _m	température de fusion
UPEC	<i>E. coli</i> uropathogène
WGA	wheat germ agglutinin
WT	souche sauvage
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Liste des figures

Figure 1.1. Hétérogénéité chimique au sein des biofilms.....	4
Figure 1.2. Cycle de vie des biofilms	6
Figure 1.3. Détachement de biofilms.....	9
Figure 1.4. Stratégies de lutte contre les biofilms	19
Figure 1.5. Structure moléculaire du CDA.....	24
Figure 1.6. Micrographies d' <i>E. coli</i> par microscopie électronique	26
Figure 1.7. Schéma de principe d'un CLSM.....	28
Figure 2.1. Protocole général de clonage des promoteurs d'intérêt en vecteur plasmidique.....	31
Figure 2.2. Carte plasmidique du pGEM [®] -T Easy	33
Figure 2.3. Carte plasmidique du pKK.....	34
Figure 2.4. Carte plasmidique du pDOCK	36
Figure 2.5. Protocole général d'insertion chromosomique.....	37
Figure 2.6. Carte de la région chromosomique ori3 après insertion.....	38
Figure 2.7. Protocole général de délétion du gène <i>kan^R</i> par la technologie de recombinaison site-spécifique FLP/ <i>FRT</i>	40
Figure 2.8. Carte de la région chromosomique ori3 où se situe l'insert après délétion du gène <i>kan^R</i> ..	40
Figure 2.9. Schéma du programme de dilution au 10 000 ^{ème} en microplaque opéré par le robot.....	42
Figure 2.10. Schéma de l'assemblage des pièces du système microfluidique.....	43
Figure 2.11. Protocole général des épreuves de dispersion	45
Figure 3.1. Montage du système microfluidique.....	47
Figure 3.2. Modifications apportées au montage microfluidique.....	48
Figure 3.3. Dimensions et photographies des cellules de flux « danoise » et ibidi [®]	49
Figure 3.4. Photomicrographies des biofilms à 1 h et à 48 h après inoculation des cellules de flux « danoise » et ibidi [®]	50
Figure 3.5. Photomicrographies du fond de la cellule de flux « danoise » après autoclavage en position centrale et en extrémité de canal	51
Figure 3.6. Différences macroscopiques entre inoculations traditionnelle et assistée, 72 h après inoculation.....	52
Figure 3.7. Stratégies d'inoculation par injection de 200 µL d'une solution de bleu de dextran dans chaque canal de la cellule « danoise ».....	53
Figure 3.8. Influence du volume d'inoculation par injection d'une solution de bleu de dextran	54
Figure 3.9. Photomicrographies de la surface interne des canaux après le processus d'inoculation....	55
Figure 3.10. Comparaison de biofilms développés en microfluidique en fonction de la concentration bactérienne de l'inoculum	56
Figure 3.11. Croissance planctonique de la souche BW25113 WT d' <i>E. coli</i> à 37°C en fonction de la concentration en Glc du milieu minimal M9.....	57
Figure 3.12. Vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle pour la souche BW25113 WT d' <i>E. coli</i> à 37°C en fonction de la concentration en Glc	58
Figure 3.13. Température de croissance des biofilms développés en bioréacteur microfluidique	60
Figure 3.14. Observation macroscopique des biofilms d' <i>E. coli</i> dans les chambres fluidiques à 24, 48 et 72 h de croissance.....	61

Figure 3.15. Observation microscopique des biofilms d' <i>E. coli</i> dans les chambres fluidiques à 24, 48 et 72 h de croissance.....	61
Figure 3.16. Composition de la matrice extracellulaire d' <i>E. coli</i>	63
Figure 3.17. Principe de marquage des biofilms avec le SYTO9 et la WGA/Alexa Fluor® 633	64
Figure 3.18. Marquage des biofilms avec le SYTO9 et la WGA/Alexa Fluor® 633.....	66
Figure 3.19. Comparaison du marquage des biofilms en fonction de la concentration en SYTO9.....	67
Figure 3.20. Comparaison du marquage de la matrice extracellulaire des biofilms en fonction de la concentration en WGA.....	68
Figure 3.21. Caractérisation des biofilms d' <i>E. coli</i> formés en bioréacteur microfluidique par marquage avec le SYTO9 à 7,5 µM.....	69
Figure 3.22. Caractérisation de la matrice extracellulaire des biofilms d' <i>E. coli</i> formés en bioréacteur microfluidique par marquage avec la WGA/Alexa Fluor® 633 à 100 µg/mL.....	70
Figure 3.23. Caractérisation de la matrice extracellulaire des biofilms d' <i>E. coli</i> formés en bioréacteur microfluidique par marquage simultané avec les lectines WGA et ConA	72
Figure 3.24. Principe de marquage des biofilms avec le couple SYTO9/IP	73
Figure 3.25. Caractérisation de la proportion de bactéries non-viables au sein des biofilms d' <i>E. coli</i> formés en bioréacteur microfluidique par marquage simultané avec le SYTO9 et l'IP.....	74
Figure 3.26. Procédé d'injection alternatif <i>via</i> boucle d'injection en dérivation	76
Figure 4.1. Gènes et opérons candidats pour caractériser la dispersion des biofilms d' <i>E. coli</i>	81
Figure 4.2. Le gène <i>wza</i> impliqué dans la biosynthèse et la protéine Wza impliquée dans l'export de l'acide colanique.....	83
Figure 4.3. Expression de l'appendice flagellaire bactérien.....	85
Figure 4.4. Nombre et fraction de ribosomes par cellule en fonction de la vitesse de croissance chez <i>E. coli</i>	86
Figure 4.5. Comparaison des versions longue et courte du promoteur <i>rrmBP1</i>	87
Figure 4.6. Structure, régulation et fonctions physiologiques du c-di-GMP	88
Figure 4.7. Signaux environnementaux impactant la concentration intracellulaire de c-di-GMP et voies de régulation cibles de la molécule	89
Figure 4.8. Stratégie générale de construction des rapporteurs génétiques	91
Figure 4.9. Planche explicative de présentation des données acquises en fluorimétrie.....	94
Figure 4.10. Caractérisation des promoteurs <i>P1</i> , <i>wza</i> , <i>bdcA</i> et <i>fliC</i> clonés sur le plasmide pKK au cours de la croissance planctonique	96
Figure 4.11. Région promotrice du gène <i>wza</i>	98
Figure 4.12. Zoom sur la construction <i>fliC</i>	99
Figure 4.13. Comparaison des concentrations en GFP et des activités promotrices de <i>fliC</i> cloné avec les couples d'amorces F1/R1, F2/R1, F2/R2 et F2/R3 ainsi qu'avec le plasmide pUA66.....	100
Figure 4.14. Caractérisation des promoteurs <i>P1</i> , <i>bdcA</i> et <i>fliC</i> insérés en position <i>ori3</i> du chromosome bactérien au cours de la croissance planctonique	102
Figure 4.15. Surenroulement négatif de la séquence d'ADN des promoteurs divergents du gène <i>kan^R</i> généré par la transcription de celui-ci	103
Figure 4.16. Principe de délétion du gène <i>kan^R</i> <i>via</i> la technologie de recombinaison site-spécifique FLP/ <i>FRT</i>	104
Figure 4.17. Comparaison des activités promotrices des rapporteurs <i>P1</i> , <i>bdcA</i> et <i>fliC</i> avec et sans <i>kan^R</i>	105
Figure 4.18. Expression des rapporteurs génétiques <i>P1</i> , <i>bdcA</i> et <i>fliC</i> au sein des biofilms d' <i>E. coli</i> à 72 h de croissance.....	107

Figure 4.19. Comparaison des marquages cellulaires SYTO61 et GFP.....	109
Figure 4.20. Comparaison de la biomasse des biofilms entre les images acquises avec le signal SYTO61 et celles acquises avec le signal GFP, pour différents seuils de segmentation des images SYTO61	110
Figure 4.21. Expression de <i>fliC</i> au sein d'une culture planctonique d' <i>E. coli</i> BW25113 pKK <i>fliC</i> (construction F1/R1) en milieu minimal M9 en phase exponentielle de croissance	112
Figure 5.1. Vitesse spécifique de croissance des bactéries planctoniques sans et avec CDA pour les souches BW25113 P1, <i>bdcA</i> et <i>fliC</i>	117
Figure 5.2. Activité des promoteurs et concentration en GFP en croissance planctonique, sans et avec CDA, pour les souches BW25113 P1, <i>bdcA</i> et <i>fliC</i>	118
Figure 5.3. Dispersion des biofilms d' <i>E. coli</i> souche BW25113 P1 formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA	121
Figure 5.4. Effet de la présence d'éthanol lors de la dispersion des biofilms d' <i>E. coli</i> souche BW25113 P1 formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA.....	122
Figure 5.5. Effet du lavage lors de la dispersion des biofilms d' <i>E. coli</i> souche BW25113 P1 formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA	123
Figure 5.6. Schéma de l'impact de l'hétérogénéité des biofilms sur les résultats des épreuves de dispersion	124
Figure 5.7. Masque de la cellule de flux ibidi®	125
Figure 5.8. Test <i>in vitro</i> de repositionnement des chambres par recouvrement des ROI.....	126
Figure 5.9. Dispersion des biofilms d' <i>E. coli</i> souche BW25113 P1 formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA avec repositionnement des chambres par recouvrement des ROI	127
Figure 5.10. Dispersion des biofilms d' <i>E. coli</i> souches BW25113 pKK <i>bdcA</i> et pKK <i>fliC</i> formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA	130

Article

Figure 1. Presentation of the Biofilm Intensity Architecture Measurement (BIAM) tool.....	135
Figure 2. Output imaging and measurements	140
Figure 3. Comparison of segmentation strategies between BIAM and COMSTAT for a given biofilm	142
Figure 4. Effects of CDA on 3-days old <i>E. coli</i> <i>rrnBP1-gfpmut2</i> biofilms developed in flow cell chambers.....	143

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Structures de surface impliquées pendant le cycle de vie des biofilms d' <i>Escherichia coli</i>	7
Tableau 1.2. Microbiote humain	13
Tableau 1.3. Molécules dispersantes	23
Tableau 2.1. Composition détaillée du milieu de culture M9	29
Tableau 2.2. Concentration des antibiotiques utilisés pour la sélection des souches	29
Tableau 2.3. Liste des souches utilisées dans ces travaux	30
Tableau 2.4. Propriétés spectrales et concentrations des marqueurs utilisés dans ces travaux	44
Tableau 2.5. Longueurs d'onde d'excitation des fluorophores avec les lasers des confocaux SP2 et SP8	46
Tableau 3.1. Tableau comparatif des cellules de flux « danoise » et ibidi®	50
Tableau 5.1. Résultats de dispersion sans et avec repositionnement des chambres fluidiques	128

Introduction générale

Les biofilms sont des écosystèmes microbiens sessiles. Ils sont composés de microorganismes adhérant les uns aux autres et à un support par une matrice de substances polymériques extracellulaires produite par les microorganismes eux-mêmes (Costerton et al, 1995). Les biofilms sont partout dans l'environnement ; certains estiment même qu'ils représentent plus de la moitié de la biomasse terrestre (<https://www.cs.montana.edu/>). On les trouve ainsi dans les forêts, les océans, sur les coques des navires, en symbiose avec des organismes supérieurs, dans les habitations et installations humaines, dans certains aliments ou encore à la surface de nos dents.

L'homme a su tirer profit de ces communautés microbiennes en développant de nombreux procédés industriels mettant en œuvre des microorganismes immobilisés sur des supports solides : production biotechnologique de molécules d'intérêt, production d'énergie, procédés de bioremédiation (épuration d'eaux usées, traitement d'effluents...). Ils permettent souvent en effet des vitesses de réaction plus importantes que les réacteurs à microorganismes en suspension.

Toutefois, du fait de leur nature ubiquitaire, les biofilms se développent parfois dans des endroits où leur présence n'est pas souhaitée et deviennent problématiques. Ils sont ainsi impliqués dans plus de 80 % des infections bactériennes humaines (Sauer et al, 2007), infections aussi variées que gingivites, endocardites, prostatites ou encore infections pulmonaires des patients atteints de mucoviscidose. De plus, en milieu hospitalier, les biofilms peuvent coloniser les dispositifs médicaux (cathéters, *pacemakers*, implants orthopédiques, sondes gastriques par exemple) et certaines surfaces métalliques (rebords de lit, poignées de porte, plaques de porte) ; ils présentent donc un risque important d'infection pour le patient et/ou ses visiteurs. En industrie, les biofilms se développent dans les canalisations d'eau et échangeurs de chaleur, provoquant corrosion, encrassement, obstruction et détérioration des équipements. En industrie agroalimentaire, de tels biofilms peuvent être à l'origine de contamination des denrées alimentaires ou de l'eau, altérant les qualités organoleptiques de celles-ci et constituant un réservoir pathogène potentiel pour le consommateur.

On comprend donc vite que dans beaucoup de situations, il est d'une importance capitale d'être en capacité de contrôler et/ou d'éradiquer les biofilms. Il existe différentes stratégies de lutte contre ces derniers. Certaines de ces stratégies visent à appliquer des agents antimicrobiens, d'autres à empêcher l'attachement des microorganismes aux surfaces, d'autres à déstabiliser la matrice extracellulaire, d'autres encore à induire la dispersion des biofilms. Cette dernière stratégie consiste à renvoyer à un mode de vie planctonique les microorganismes du biofilm.

Différents signaux peuvent déclencher la dispersion du biofilm. Ils viennent de l'environnement dans lequel évolue le biofilm ; on peut citer entre autres l'épuisement des ressources nutritives du milieu, la variation de concentration de certains gaz, la présence de bactériophages, les informations véhiculées par le quorum sensing ou encore la présence de certaines molécules à effet dispersant. Dans cette famille de molécules, un acide gras, l'acide *cis*-2-décénoïque (CDA), semble être prometteur par l'étendue de son action dispersante sur les espèces microbiennes (Davies et Marques, 2009). Cependant les mécanismes de dispersion des biofilms par le CDA sont encore aujourd'hui peu connus. Il paraît donc intéressant, compte tenu de l'ampleur du problème posé par les biofilms, d'étudier plus précisément leur dispersion par cette molécule afin d'en identifier les différents mécanismes, démarche nécessaire avant de pouvoir proposer des procédés de dispersion optimisés.

C'est dans ce contexte qu'a été développée une collaboration entre l'Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay (ENSPS, anciennement ENS de Cachan) et CentraleSupélec (CS, anciennement Ecole Centrale

Paris) et que ce projet doctoral s'insère, soutenu par un financement spécifique dû au rapprochement des deux écoles. Plus particulièrement, il s'agit d'une collaboration entre trois laboratoires : le Laboratoire de Génie des Procédés et Matériaux de CS (LGPM, EA 4038), le Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée de l'ENSPS (LBPA, UMR 8113) et le laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires de l'ENSPS (PPSM, UMR 8531).

L'objectif de mon travail de thèse est d'identifier les effets de la molécule CDA sur les biofilms, de les quantifier et d'apporter un éclairage sur leur nature physicochimique ou génétique *in vivo*. Pour ce faire, des biofilms de souches bactériennes génétiquement modifiées ont été développés dans un système microfluidique permettant leur observation microscopique *in situ* et leur dispersion *via* la molécule CDA a été étudiée. Le choix du microorganisme d'étude s'est porté sur l'espèce *Escherichia coli* (*E. coli*) pour sa renommée en tant que modèle microbiologique ainsi que pour la diversité des données bibliographiques et des outils moléculaires disponibles à ce jour pour cette espèce.

Les études menées au cours de mes travaux pour répondre à cet objectif sont présentées dans ce manuscrit, par le biais de cinq chapitres : (1) contexte bibliographique, (2) matériel et méthodes, (3) développement et caractérisation de biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique, (4) construction et caractérisation de rapporteurs génétiques pour l'étude de la dispersion et (5) étude de la dispersion des biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA.

Le premier chapitre présente un état de l'art qui a permis de situer le contexte et de définir les problématiques à étudier dans la thèse. Il consiste en une revue de la littérature sur les biofilms, leur ubiquité, les problèmes qu'ils causent, les stratégies de lutte existantes, la dispersion en particulier, ainsi que la stratégie que nous proposons pour l'avancée des recherches dans ce domaine.

Le second chapitre détaille le matériel et les méthodes utilisés en microbiologie et biologie moléculaire, le dispositif expérimental microfluidique développé dans le cadre de ce projet ainsi que les diverses méthodes de caractérisation des microorganismes employées (fluorimétrie, microscopie etc).

Les résultats sont regroupés dans les trois chapitres suivants. La première partie de résultats (chapitre 3) présente la mise au point d'un système microfluidique pour l'étude *in situ* des biofilms d'*E. coli*, l'optimisation des conditions opératoires pour la croissance de ces derniers ainsi que leur caractérisation en terme de biomasse bactérienne et matrice extracellulaire. La deuxième partie de résultats (chapitre 4) décrit la sélection de rapporteurs génétiques pour l'étude de la dispersion des biofilms, la stratégie de construction de ces souches ainsi que leur caractérisation en croissance planctonique et au sein des communautés sessiles. Dans la troisième et dernière partie de résultats (chapitre 5), des biofilms des souches spécifiques d'*E. coli* construites précédemment ont été développés dans le système microfluidique mis en place et l'étude de la dispersion par la molécule modèle de ces travaux, le CDA, a été réalisée. Ce chapitre inclut l'article que nous avons soumis dans *Journal of Microbiological Methods* décrivant l'approche d'analyse d'images développée au cours de ces travaux, approche permettant de quantifier l'intensité de fluorescence *in situ* de marqueurs spécifiques en fonction des propriétés structurales des biofilms à partir de données de microscopie confocale à balayage laser. Enfin, une conclusion générale et des perspectives de recherche clôturent le manuscrit.

1. Contexte bibliographique

1.1 L'ère « biofilmienne »

Tout commence dans la nature. C'est en 1978 lors d'une randonnée en montagne canadienne que John William (Bill) Costerton va prendre conscience d'une chose : la grande majorité des microorganismes ne sont pas présents en suspension dans les fluides et les liquides terrestres, mais regroupés le long des surfaces et interfaces terrestres (Costerton et al, 1978). C'est plus d'un siècle de recherche en microbiologie qui vient de se remettre en question, les cartes sont battues et redistribuées. En effet, les recherches scientifiques microbiologiques se sont jusqu'alors principalement concentrées sur l'étude du microorganisme isolé en suspension dans un milieu de culture ou sur une boîte de pétri. Une nouvelle ère commence pour les microbiologistes, une ère où lesdits microbes ne sont plus vus comme de modestes individus indépendants et solitaires, mais comme des individus appartenant à une communauté plus grande et plus complexe. Costerton propose alors le terme de biofilm pour définir ces communautés microbiennes. L'ère « biofilmienne » voit le jour.

En 1990 naît ensuite le premier institut entièrement dédié à l'étude des biofilms, le Center for Biofilm Engineering (CBE) à la Montana State University aux Etats-Unis d'Amérique. Pourtant, trois siècles plus tôt, Antoni van Leeuwenhoek avait déjà découvert les biofilms à son insu. Il observe en effet en 1683 la présence de microorganismes issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire. Il appellera ces microorganismes des « animalcules » : « The number of these animalcules in the scurf of a man's teeth are so many that I believe they exceed the number of men in a kingdom. », Antoni van Leeuwenhoek dans un rapport de 1684 à la Royal Society of London, document considéré comme le premier rapport scientifique sur les biofilms (Sauer et al, 2007).

1.2 Qu'est-ce qu'un biofilm ?

1.2.1 Définition des biofilms

« Biofilms are defined as matrix-enclosed bacterial populations adherent to each other and/or to surfaces or interfaces. » (Costerton et al, 1995). Les biofilms sont ainsi définis comme des communautés de microorganismes adhérant à une surface et encastrées dans une substance produite par les cellules même du système, dite matrice extracellulaire.

Les deux entités composant les biofilms sont donc les microorganismes et la matrice extracellulaire. Les structures formées par ces entités sont très variées (Costerton et al, 1995) et renferment généralement des canaux dans lesquels peuvent circuler l'eau et les nutriments (De Beer et al, 1994). Les propriétés physiques du biofilm sont plutôt déterminées par la matrice extracellulaire, alors que ses propriétés physiologiques plutôt par les microorganismes eux-mêmes (De Beer et Stoodley, 2006).

1.2.1.1 Microorganismes

Dans la nature, les biofilms sont composés d'espèces vivantes extrêmement variées. On trouve ainsi au sein des biofilms aussi bien des organismes procaryotes comme les bactéries ou les archées que des organismes eucaryotes tels que les protozoaires, les champignons, les microalgues ou les petits animaux. On trouve également des virus dans les biofilms. En laboratoire, les biofilms sont généralement développés à partir d'une ou de quelques espèces microbiennes connues et maîtrisées.

Une des grandes caractéristiques des biofilms, c'est qu'ils sont hétérogènes. Il existe en effet au sein des biofilms des hétérogénéités physique, chimique et biologique (Stewart et Franklin, 2008), sachant que les deux premières sont en partie une conséquence de la dernière et qu'elles ont aussi une influence sur celle-ci. Ces hétérogénéités dépendent intrinsèquement des microorganismes qui constituent le biofilm. L'hétérogénéité physique résulte de la structure des biofilms. Les topographies et formes tridimensionnelles que peuvent adopter les biofilms sont en effet très diverses et varient en fonction des espèces impliquées, des souches d'une même espèce, des conditions environnementales dans lesquelles se développe le biofilm ou encore de l'âge du biofilm. L'hétérogénéité chimique est associée aux gradients de concentration des métabolites dus à leurs différentes vitesses de diffusion au sein du biofilm et à la différenciation cellulaire (consommation/production par les microorganismes). Trois grandes catégories d'hétérogénéité chimique existent au sein des biofilms (Figure 1.1) : hétérogénéité de concentration d'un nutriment (sa concentration diminue de façon centripète depuis la partie externe du biofilm jusqu'à son centre), hétérogénéité de concentration d'un produit (inversement sa concentration diminue de façon centrifuge du cœur du biofilm jusqu'à sa surface externe) et hétérogénéité intermédiaire (accumulation locale de métabolites produits ou consommés) (Stewart et Franklin, 2008). L'hétérogénéité biologique regroupe enfin les hétérogénéités phylogénique, physiologique, métabolique, phénotypique et génétique existant au sein d'un biofilm (Costerton et al, 1994). En effet, les microorganismes dans différentes régions du biofilm présentent différents patterns d'expression génique (Davies et al, 1993 ; Sauer et al, 2002), ce qui résulte en une variation du phénotype, de la physiologie et du métabolisme de ces derniers. Cette variabilité d'expression est due aux variations micro-environnementales que subissent les cellules au sein du biofilm, aux mutations génétiques aléatoires liées à la réplication du génome, au transfert accru de matériel génétique au sein des biofilms (Ehrlich et al, 2010) ou encore à l'expression génique stochastique des microorganismes, pouvant même conduire à l'état de dormance (Lewis, 2010).

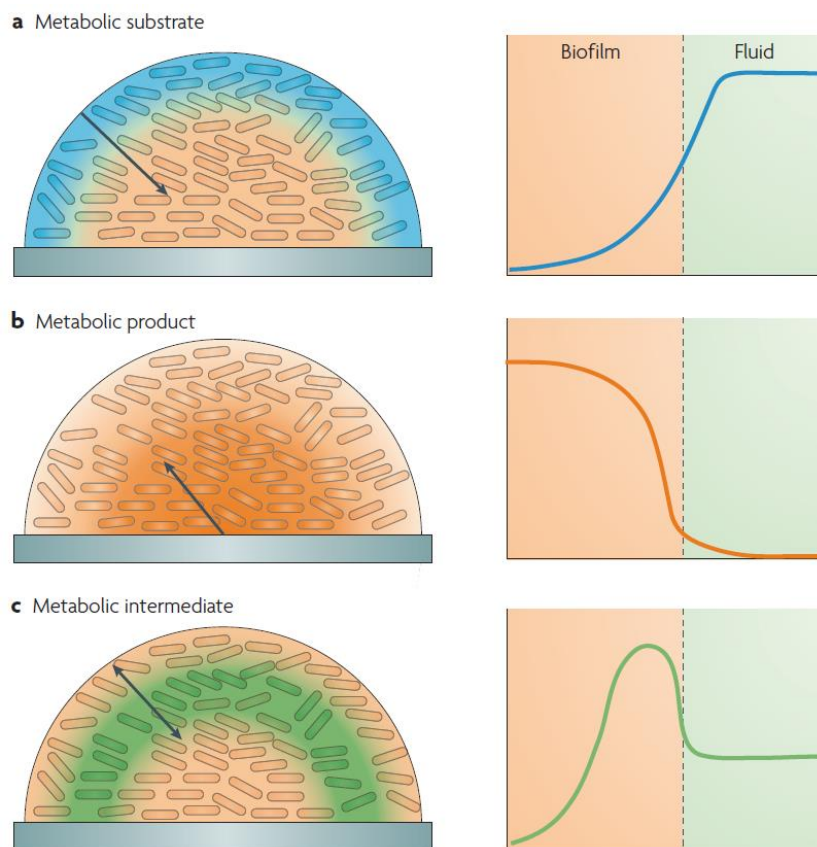


Figure 1.1. Hétérogénéité chimique au sein des biofilms (Stewart et Franklin, 2008).

1.2.1.2 Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est produite par les microorganismes du biofilm et représente la « colle » fixant les cellules entre elles et au substrat (surface sur laquelle il est attaché). D'abord nommée « glycocalyx » (Costerton et al, 1981), puis polysaccharide extracellulaire, elle a ensuite été renommée substance polymérique extracellulaire ou matrice extracellulaire par la communauté scientifique.

1.2.1.2.1 Composition de la matrice extracellulaire

Des études de microscopie confocale ont montré que 50 à 90 % de l'aire occupée par les biofilms à chaque coupe optique est de la matrice extracellulaire et/ou de l'espace vide (Costerton et al, 1995).

La matrice extracellulaire est constituée à 97 % d'eau (Zhang et al, 1998). Bien qu'on ait considéré initialement qu'elle était composée essentiellement de polysaccharides extracellulaires (Sutherland, 1982 ; Decho, 1990 ; Sutherland, 1994 ; Veiga et al, 1997 ; Sutherland, 2001), on sait aujourd'hui qu'elle est beaucoup plus complexe et fait intervenir des macromolécules organiques comme les lipopolysaccharides, les glycolipides, les lipides, les protéines, les acides nucléiques et d'autres composés inorganiques tels que les phosphates ou les sulfates issus du milieu externe (Flemming et Wingender, 2010). La composition chimique de la matrice dépend toutefois de la ou des espèce(s) microbienne(s) mise(s) en jeu au sein du biofilm, de son (leur) expression génique, ainsi que de l'environnement dans lequel évolue le biofilm. Les conditions environnementales vont donc déterminer les propriétés physicochimiques du biofilm et de sa matrice extracellulaire.

1.2.1.2.2 Fonction de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire joue trois rôles principaux : (i) structure, (ii) alimentation et (iii) protection (Flemming et Wingender, 2010).

Rôle structurel. La matrice, de par sa composition, établit un maillage autour des cellules et constitue un véritable échafaudage donnant au biofilm la stabilité mécanique à ses structures tridimensionnelles (Körstgens et al, 2001). Elle est également le ciment immobilisant les cellules entre elles et permettant au biofilm d'être fermement attaché à la surface sur laquelle il se développe. Les processus d'adhésion, d'agrégation et de cohésion au sein des biofilms sont intimement liés à la matrice. Des études ont démontré que la présence d'exopolysaccharides et d'acide désoxyribonucléique extracellulaire (ADNe) dans la matrice de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* joue également un rôle dans la maturation des biofilms : l'absence de ces composés altère la formation des structures tridimensionnelles (Lavery et al, 2014).

Rôle alimentaire. La structure complexe de la matrice permet une rétention d'enzymes extracellulaires qui dégradent des polymères dissous, colloïdaux et solides alors métabolisables par les cellules ainsi que l'accumulation de nutriments venant de l'environnement direct des cellules (Flemming et Wingender, 2010). Elle renferme également les canaux à eau permettant la circulation d'eau et de gaz dissous à l'intérieur du biofilm.

Rôle protecteur. La matrice, de par sa complexité, protège les cellules de dangers venant du milieu extérieur tels que les prédateurs, les antimicrobiens (désinfectants et antibiotiques), les toxines ou le système immunitaire de l'hôte infecté (Flemming et Wingender, 2010). Elle permet également aux biofilms de résister contre la déshydratation.

La matrice favorise également l'échange de matériel génétique au sein du biofilm, en facilitant le transfert horizontal de gènes entre les cellules du biofilm (Flemming et Wingender, 2010).

1.2.2 Cycle de vie des biofilms

Comme tout organisme, les biofilms ont un cycle de vie. Celui-ci permet aux microorganismes de passer de la forme microbienne isolée dite planctonique à la forme microbienne attachée ou sessile dite communautaire ou biofilm. Il existe cinq principales étapes du cycle de vie des biofilms : (i) attachement réversible (ou initial), (ii) attachement irréversible, (iii) prolifération, (iv) maturation et (v) dispersion (Sauer et al, 2002). Chaque étape de la formation du biofilm est régulée et requiert une reprogrammation de l'expression génique des microorganismes sessiles, résultant d'une réponse à un environnement changeant (Schembri et al, 2003). Les microorganismes au sein du biofilm sont distincts des microorganismes planctoniques par plusieurs caractéristiques : l'association à une surface, la présence d'une matrice extracellulaire, une haute densité cellulaire (ordre de 10^{10} cellules par mL de biofilm hydraté) ou une hétérogénéité accrue (De Beer et Stoodley, 2006). De plus, les cellules sessiles et les cellules planctoniques d'une même espèce démontrent des phénotypes profondément différents résultant d'une expression différente d'un ensemble de gènes (Stoodley et al, 2002). La Figure 1.2 présente les grandes étapes du cycle de développement des biofilms.

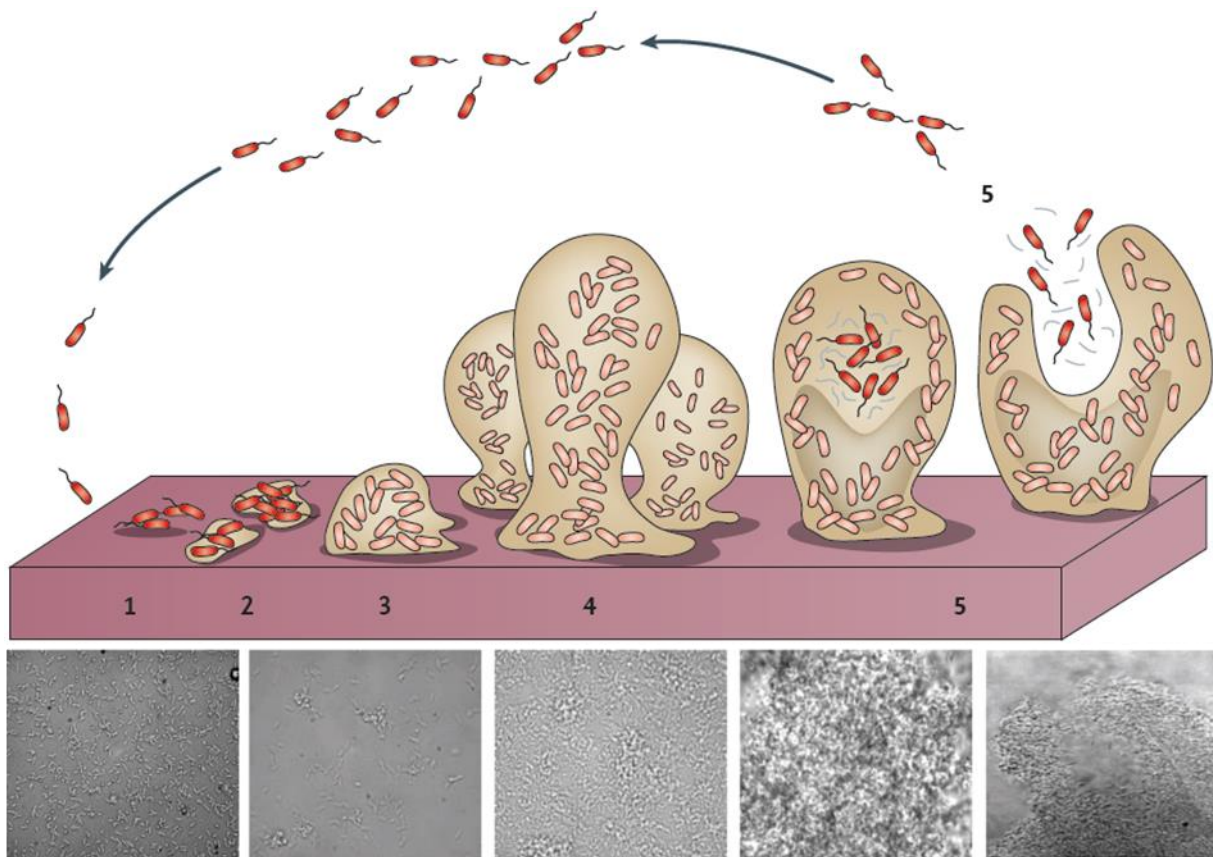


Figure 1.2. Cycle de vie des biofilms. Le développement des biofilms est divisé en cinq grandes étapes : attachement initial ou réversible (1), attachement irréversible (2), prolifération (3), maturation (4) et dispersion (5). Le cycle permet aux microbes de passer du mode de vie planctonique au mode de vie communautaire, et inversement. Le schéma du haut est issu de la publication de Lappin-Scott et collaborateurs ayant eux-mêmes reproduit la figure des travaux de Stoodley et collaborateurs (Stoodley et al, 2002 ; Lappin-Scott et al, 2014). Le panneau du bas montre des photomicrographies des bactéries de *Pseudomonas aeruginosa* à chacune des étapes du développement des biofilms et est issu du livre « Biofilm Highlights » paru en 2011 (édition : Flemming, Wingender et Szewzyk), chapitre « Biofilm Dispersion » (auteur : Davies) (Davies, 2011).

Le développement des biofilms est ainsi le résultat d'une expression génique spécifique et d'un phénotype microbien particulier à chaque étape (Sauer et al, 2002 ; Karatan et Watnick, 2009). En effet, une production différentielle de protéines a lieu à des stades spécifiques du développement

(Southey-Pillig et al, 2005) et les structures exprimées à la surface cellulaire sont différentes en fonction du stade de développement du biofilm. Le Tableau 1.1 présente les structures synthétisées à la surface bactérienne de l'espèce modèle *Escherichia coli* à chaque étape du cycle de vie du biofilm.

1	Surface contact and reversible attachment	Flagella and motility
2	Irreversible attachment	Type 1 fimbriae (fimbriae) Curli PGA polysaccharide (EPS)
3	Microcolony formation and early development of biofilm architecture	Motility Curli Antigen 43 (autotransporter protein) Colanic acid (EPS) PGA polysaccharide (EPS)
4	Maturation	Colanic acid (EPS) Curli Conjugative pili
5	Dispersal	Flagella and motility

Tableau 1.1. Structures de surface impliquées pendant le cycle de vie des biofilms d'*Escherichia coli*. Le tableau est issu des travaux de Van Houdt et Michiels (Van Houdt et Michiels, 2005). EPS est l'acronyme de la matrice extracellulaire, « Extracellular Polymeric Substances » en anglais.

Les différentes étapes du cycle de vie des biofilms sont décrites dans les prochains paragraphes.

1.2.2.1 Premières étapes du cycle de vie des biofilms : attachement microbien

La couche de conditionnement est tout d'abord nécessaire à l'attachement microbien. Il s'agit de la couche composée de nombreuses particules organiques ou inorganiques se déposant sur la surface du support sur lequel va s'établir le biofilm (Garrett et al, 2008).

L'attachement microbien à une surface est divisé en deux étapes : l'attachement initial, mettant en jeu des interactions faibles entre le microorganisme et la surface, et l'attachement irréversible, mettant en jeu des liaisons permanentes entre ces derniers (Characklis, 1990). Il est grandement dépendant des espèces microbiennes et des propriétés physicochimiques du matériau de la surface en jeu (Renner et Weibel, 2011).

L'attachement initial est réversible : il fait intervenir des interactions physicochimiques de faible énergie telles que les forces de van der Waals et électrostatiques. C'est également une étape courte, de l'ordre de la minute (Boks et al, 2008), et pendant cette période, les forces d'adhésion entre les bactéries et la surface augmentent rapidement. Ce phénomène semble être dû plus à des effets physicochimiques que biologiques (Busscher et van der Mei, 2006). L'attachement initial implique souvent le flagelle, qui permet aux microorganismes planctoniques d'atteindre les surfaces.

La seconde étape de l'attachement est irréversible : elle fait intervenir des interactions de plus forte énergie telles que des interactions moléculaires et cellulaires spécifiques. Il s'agit d'une étape plus longue, de l'ordre de l'heure. A cette étape, les interactions spécifiques entre les structures de la surface microbienne et la surface du matériau deviennent prédominantes. En effet, cette étape requiert des liaisons solides entre support et microorganisme *via* les fonctions adhésines (généralement en bout d'appendices) des structures polymériques de surface bactérienne comme les curli, les pili, les

fimbriae ou les capsules (Prigent-Combaret et al, 2000 ; Van Houdt et Michiels, 2005 ; Prüß et al, 2006). Le flagelle est généralement perdu à cette étape pour laisser place à l'élaboration de ces structures adhésives. C'est également à cette étape que les cellules commencent à synthétiser et à sécréter les polymères de la matrice extracellulaire.

Certaines protéines jouent un rôle dans la transition entre attachement initial et irréversible. Chez *E. coli*, les lipopolysaccharides (LPS) et les pili de la surface membranaire interviennent en augmentant le taux d'attachement initial et en favorisant la transition vers l'attachement irréversible (Chao et Zhang, 2011).

L'attachement microbien est un mécanisme complexe affecté par de nombreux paramètres environnementaux tels que les conditions hydrodynamiques, la présence de protéines ou d'antibiotiques dans le milieu, les propriétés bactériennes de/des espèce(s) en jeu ou les caractéristiques de surface du matériau sur lequel se développent les biofilms (An et Friedman, 1997).

1.2.2.2 Etapes intermédiaires du cycle de vie des biofilms : prolifération et maturation

Une fois les microorganismes solidement attachés à la surface – notamment par la production des exopolymères – la croissance des biofilms peut se poursuivre. Le développement de microcolonies est observé. L'augmentation de la taille des microcolonies par la division cellulaire et la production de matrice extracellulaire aboutit aux structures tridimensionnelles complexes du biofilm (Chmielewski et Frank, 2003). Certaines de ces structures sont dites en « champignon » comme celles développées par les biofilms de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* en présence d'homosérine lactone. D'autres sont plutôt de forme « conique ». D'autres encore sont relativement plates.

Le développement et la maturation des biofilms impliquent une communication entre les cellules constituant le biofilm (Davies et al, 1998). Cette communication intercellulaire s'appelle le « quorum sensing » (QS) (Bassler, 1999). Bassler définit le QS comme « the control of gene expression in response to cell density ». Il s'agit de la capacité des microorganismes à entreprendre un comportement collectif par la détection de molécules signal produites par les microorganismes eux-mêmes et leur donnant une indication sur la densité de cellules présentes dans le milieu. Avec la maturation du biofilm, des changements environnementaux en son sein ont lieu, notamment associés à une diminution de la disponibilité en nutriments, une augmentation de la concentration de métabolites sécrétés dont des molécules de QS, entraînant une modification de l'expression génique des cellules du biofilm. Dans certains cas, les cellules, en réponse à ces stress, peuvent alors entrer en phase de dispersion pour retourner à un mode de vie planctonique.

1.2.2.3 Dernière étape du cycle de vie des biofilms : dispersion

La dispersion est l'étape permettant aux microorganismes au sein du biofilm de retourner à un état planctonique. Celle-ci permet aux individus de fuir un environnement défavorable ou bien de coloniser de nouvelles niches (Sauer et al, 2002).

En effet, la dispersion n'est pas nécessairement associée à une fuite du milieu néfaste. Elle peut aussi avoir lieu sous conditions environnementales favorables. Elle permet aux microorganismes dispersés de coloniser d'autres environnements en s'attachant à de nouvelles surfaces et en formant de nouveaux biofilms. La dispersion est ainsi essentielle pour la dissémination des individus, l'extension de la population et la survie de l'espèce microbienne. La dispersion périodique a, par exemple, été mise en évidence chez l'espèce *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kaplan, 2010).

La dispersion est considérée comme duelle : dispersion active et dispersion passive. La dispersion active est initiée par les bactéries mêmes du biofilm qui modifient leur expression génique afin de s'échapper de celui-ci. Il s'agit donc d'une dispersion relevant de mécanismes biologiques. La dispersion passive est quant à elle relayée par des forces externes appliquées au biofilm qui décrochent les bactéries du biofilm. Il s'agit donc d'une dispersion relevant de mécanismes physicochimiques (Davies, 2011 ; McDougald et al, 2012).

Aujourd'hui, la dispersion *stricto sensu* fait référence à la dispersion active, et on parle de détachement pour définir la dispersion passive (Davies, 2011). La dispersion implique plutôt les cellules situées à l'intérieur du biofilm alors que le détachement concerne principalement celles en surface de ce dernier.

1.2.2.3.1 Le détachement (dispersion passive)

Le détachement est le processus par lequel les bactéries se décrochent du biofilm de manière passive. Le détachement concerne également le relargage de la matrice extracellulaire du biofilm dans le milieu environnant. Les forces physiques externes que subit le biofilm en sont la cause ; celles-ci sont par exemple les forces de cisaillement causées par le fluide dans lequel évolue le biofilm. Ces forces sont aussi bien tangentielle que normale par rapport à la surface du biofilm. Il existe quatre mécanismes de détachement (Breyers, 1988 ; Brading et al, 2003) : abrasion, érosion, déversement (*sloughing* en anglais) et grignotage (*grazing* en anglais). La Figure 1.3 schématise ces quatre mécanismes.

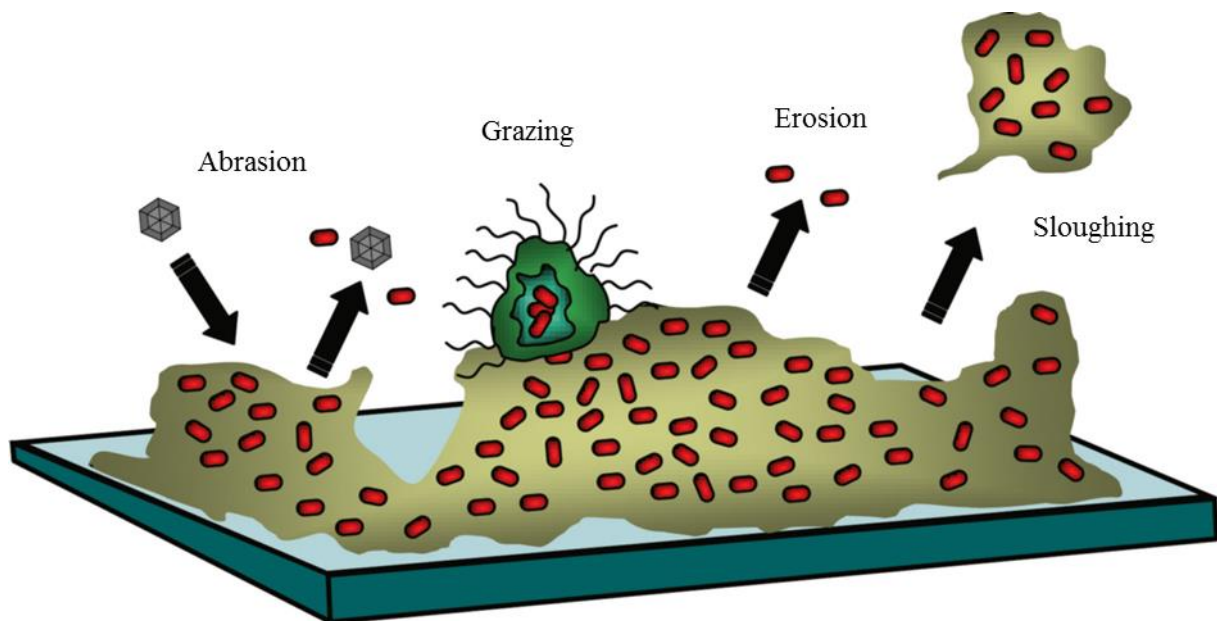


Figure 1.3. Détachement de biofilms. Les quatre mécanismes de détachement microbien sont l'abrasion, l'érosion, le déversement (*sloughing*) et le grignotage (*grazing*). La figure est issue du livre « Biofilm Highlights » paru en 2011 (édition : Flemming, Wingender et Szewzyk), chapitre « Biofilm Dispersion » (auteur : Davies, 2011) (Davies, 2011).

Le mécanisme d'érosion implique un enlèvement continu de petites portions du biofilm par le cisaillement du fluide (ou par la présence de bulles d'air dans ce fluide) alors que le déversement (*sloughing*) est un enlèvement massif et rapide de ce dernier. L'abrasion induit le détachement du biofilm par collision de particules provenant du liquide environnant avec celui-ci. Le grignotage (*grazing*) résulte de l'action de cellules/organismes eucaryotes dégradant le biofilm.

Les mécanismes de détachement peuvent également jouer un rôle lors de la dispersion, en emportant la biomasse bactérienne dispersée induite par des processus biologiques au sein du biofilm.

1.2.2.3.2 La dispersion (active)

La dispersion est le processus par lequel les bactéries se décrochent du biofilm de manière active. La production de cellules dispersées à ce stade final du cycle de vie des biofilms relève d'une réponse active hautement régulée (McDougald et al, 2012). La dispersion active implique souvent l'expression concomitante d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire et d'un appareil de motilité comme le flagelle (Garrett et al, 2008).

Par exemple, l'opéron *rpf* sauvage est nécessaire pour la dispersion des biofilms de l'espèce *Xanthomonas campestris* (Dow et al, 2003), l'expression du gène *bdIA* est essentielle pour la dispersion de *Pseudomonas aeruginosa* (Morgan et al, 2006) et la dispersion des biofilms d'*Escherichia coli* semble être sous le contrôle du régulateur global CsrA (Jackson et al, 2002).

Il existe de nombreux mécanismes conduisant à la dispersion (Kaplan, 2010), peut-être aussi nombreux qu'il y a d'espèces microbiennes s'établissant en biofilms : dégradation de la matrice extracellulaire, induction d'une motilité cellulaire, dégradation du support sur lequel le biofilm se développe, augmentation de la division cellulaire à la surface externe du biofilm, répression de la production d'éléments adhésifs dans la matrice extracellulaire, production de surfactants extracellulaires comme les rhamnolipides ou des composés phénoliques (Wang et al, 2011), modulation de l'adhésion intercellulaire en réprimant certaines structures (comme les fimbriae) et lyse d'une sous-population cellulaire du biofilm.

Par exemple, la dispersine B produite par l'espèce *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dégrade des polymères de sa matrice par son activité β -hexosaminidase (Kaplan et al, 2003) ; une augmentation des propriétés adhésives des biofilms ainsi qu'une augmentation de la concentration intracellulaire du messenger secondaire c-di-GMP ont été observées chez *Pseudomonas aeruginosa* lorsque le gène *bdIA* est muté (Morgan et al, 2006) ; la lysine oxydase AlpP de *Pseudoalteromonas tunicata* tue les cellules du biofilm en produisant du peroxyde d'hydrogène à partir de résidus L-lysine (Mai-Prochnow et al, 2008).

Trois principaux mécanismes de dispersion peuvent être définis : *swarming*, *clumping* et de surface (Hall-Stoodley et al, 2004). La dispersion *swarming* (appelée aussi *seeding*) résulte en la formation d'un trou au sein du biofilm par lequel les microorganismes s'échappent (Tolker-Nielsen et al, 2000 ; Sauer et al, 2002 ; Purevdorj-Gage et al, 2005). La dispersion *clumping* consiste en un glissement du biofilm (Stoodley et al, 2001). La dispersion de surface est le mouvement de cellules, de microcolonies ou de toute une partie du biofilm le long de la surface (Stoodley et al, 1999).

De nombreux signaux externes (du milieu environnant) ou internes (du biofilm) induisent la dispersion. Les signaux externes regroupent la disponibilité en nutriments (Sauer et al, 2004 ; Gjermansen et al, 2010), les variations de concentration de certains gaz comme l'oxygène (Thormann et al, 2006) ou le monoxyde d'azote (Barraud et al, 2006), la présence de bactériophages lytiques ou l'action de certains types de molécules. Les signaux internes concernent la modulation du messenger intracellulaire c-di-GMP, l'information véhiculée par les molécules du QS (Solano et al, 2014) ou l'activité de prophages (Webb et al, 2003).

Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* entre en dispersion après un changement soudain de la concentration en substrats du milieu (augmentation ou diminution) (Sauer et al, 2004 ; Hunt et al, 2004). Des conditions de famine induisent la dispersion des biofilms de l'espèce *Pseudomonas putida* (Gjermansen et al, 2010) ; des signaux nutritifs ou de QS conduisent à la dispersion chez l'espèce *Serratia marcescens* (Rice et al, 2005). L'expression du prophage filamenteux Pfl-like de

Pseudomonas aeruginosa provoque la mort cellulaire de certains groupes de bactéries ce qui engendre la dispersion des biofilms de cette espèce (Webb et al, 2003 ; Rice et al, 2009).

1.3 Ubiquité des biofilms

Les microorganismes sont apparus il y a 3,5 à 3,8 milliards d'années (Schopf et Packer, 1987 ; Schidlowski, 1988 ; Kumada et al, 1993) et leur nombre total sur Terre est aujourd'hui estimé à $2,9 \cdot 10^{29}$ (Kallmeyer et al, 2012). On les trouve dans presque tous les milieux terrestres connus à ce jour (Whitman et al, 1998), jusque dans les stromatolithes – structures sédimentaires macroscopiques en couches superposées produites par des communautés microbiennes – situés en Australie et découverts en septembre 2016 au Groenland permettant de dater l'émergence de la vie sur Terre à au moins 3,7 milliards d'années (Nutman et al, 2016). Il se trouve que la majorité des microorganismes de la biosphère vit au sein de communautés adhérant aux surfaces. En effet, plus de 99,9 % des bactéries d'un écosystème hydraté se trouvent au sein des communautés sessiles (Geesey et al, 1978 ; Costerton et al, 1978). La prédominance des biofilms sur Terre n'est aujourd'hui plus à démontrer : « Direct observations have clearly shown that biofilm bacteria predominate, numerically and metabolically, in virtually all nutrient-sufficient ecosystems. » (Costerton et al, 1995).

1.3.1 Biofilms et nature

Dans la nature, les biofilms se trouvent à peu près partout, dans les sols, les eaux et même dans l'air.

1.3.1.1 Sol

Il est généralement admis que les microorganismes ont habité au sein des biofilms depuis au moins 3,5 milliards d'années, âge des stromatolithes du Warrawoona Group du Pilbara Craton en Australie (Walter et al, 1980 ; Hofmann et al, 1999 ; Allwood et al, 2007 ; Van Kranendonk et al, 2008). Les biofilms se rencontrent ainsi dans divers endroits naturels : grand prisme du Parc du Yellowstone (Etats-Unis d'Amérique), stromatolithes modernes de la Shark Bay (Australie), surface des plantes (feuilles, écorces et racines), dans la plupart des sols etc. En particulier, les biofilms jouent un rôle fondamental dans le recyclage de la biomasse des sols sur Terre. Ils permettent la décomposition de la matière organique, sont impliqués dans les cycles biogéochimiques de la plupart des éléments, entrent en jeu dans de nombreux processus tels que l'oxydation, la réduction, l'incorporation, la dégradation, la minéralisation, la conversion ou encore le recyclage des éléments.

1.3.1.2 Eau

Dans les environnements terrestres en contact avec l'eau, la grande majorité des microorganismes se développent sur les surfaces immergées au sein de biofilms (Geesey et al, 1978 ; Costerton et al, 1978). On trouve ainsi des biofilms sur les roches des lacs, dans les fonds marins abyssaux et même aux interfaces air-liquide des eaux stagnantes. Les biofilms sont par exemple responsables de la fameuse couleur pourpre de la Mer Rouge : la cyanobactérie *Trichodesmium erytraeum* prolifère parfois à sa surface et la recouvre de biofilms. Ils participent également aux processus des écosystèmes immergés. En effet, ils jouent des rôles dans la modification physique et chimique des microhabitats des cours d'eau, notamment par la rétention de particules en suspension (Battin et al, 2003).

1.3.1.3 Air

Les biofilms peuvent aussi être présents dans l'air. En effet, de récentes recherches montrent la présence de microorganismes vivants – incluant bactéries, champignons et levures – dans les phases

liquides de l'atmosphère telles que le brouillard ou les nuages (Delort et al, 2010). De plus, les échantillons d'eau de nuages présentent une grande biodiversité microbienne et une composition chimique complexe (Vaïtilingom et al, 2013). Ces résultats suggèrent que les microorganismes jouent un rôle dans la chimie atmosphérique et les processus de nucléation. Par ailleurs, des fragments de biofilms de l'espèce *Pseudomonas syringae* s'établissant sur les feuilles peuvent se retrouver dispersés par les vents.

1.3.2 Biofilms et Homme

Les biofilms chez l'homme se rencontrent en deux endroits : autour de lui dans ses lieux de vie, et sur lui dans sa flore endogène.

1.3.2.1 Habitation humaine

L'homme cultive effectivement des biofilms chez lui à son insu. Ces derniers se retrouvent plutôt dans les pièces à plus haut taux d'humidité (Else et al, 2003) et notamment dans les salles de bains : robinets, siphons, pommeaux de douches, jouets de bain, porte-savons et brosses à dents (Sammons et al, 2004). Il est en effet estimé que des biofilms – comprenant notamment les espèces bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* – se forment sur plus de 38 % des brosses à dents (Abubakar et al, 2013).

1.3.2.2 Microbiote humain

Les biofilms naturellement développés sur l'homme constituent sa flore endogène. On parle de microbiote. Ils ont notamment une fonction protectrice et sont une barrière biologique prévenant la prolifération de microorganismes pathogènes et/ou opportunistes (Reid et al, 2001). On les rencontre ainsi à la surface de la peau, dans la bouche ou encore au sein des appareils des grandes fonctions biologiques (systèmes digestif, respiratoire et urogénital). Le Tableau 1.2 présente les principaux genres et espèces retrouvés dans les différents microbiotes humains.

Microbiote	#	Microorganismes
Intestinal	10 ¹⁴	Estomac <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Streptococcus</i>
		Intestin grêle bactéries lactiques, entérocoques, entérobactéries, bifidobactéries, <i>Bacteroides</i>
		Colon entérocoques, entérobactéries, <i>Clostridium</i> , méthanogènes, bactéries lactiques, <i>Bacteroides</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i>
Cutané	10 ¹²	<i>Staphylococcus</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Bacillus</i>
Buccal	10 ¹⁰	streptocoques, lactobacilles, <i>Actinomyces</i> , <i>Fusobacterium</i>
Respiratoire		Narines staphylocoques, corynébactéries, <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i>
		Pharynx streptocoques, <i>Neisseria</i> , <i>Mycoplasma</i>
Urogénital		Urètre antérieur <i>Streptococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , staphylocoques,

		corynébactéries, entérobactéries
		Vagin <i>Lactobacillus, Streptococcus, Candida albicans, corynébactéries</i>

Tableau 1.2. Microbiote humain. Les données de ce tableau sont issues du livre « Biofilms, quand les microbes s’organisent » (Briandet et al, 2012) et du livre « Microbial Life » (Staley et Lory, 2007).

1.3.3 Biofilms et applications

De manière empirique ou scientifique, l’homme a su tirer profit des biofilms dans divers domaines. Des applications bénéfiques faisant intervenir des biofilms ont ainsi été développées.

1.3.3.1 Alimentation

Les biofilms sont utiles pour la production de certains aliments comme le fromage, le saucisson ou le vinaigre. En effet, les caves d’affinage de fromages et de saucissons comportent des biofilms sur les parois de leurs murs et sur les planches d’affinage en bois, biofilms quiensemencent naturellement les produits. Différents ferments induisent différents produits, avec différentes qualités organoleptiques. C’est aussi pourquoi il y a autant de types et goûts de fromages que de producteurs : les croûtes de fromages comportent des biofilms. Les fromages comme le brie ou le camembert ont par exemple des biofilms de champignons *Geotrichum candidum* et *Penicillium camemberti* se développant à leur surface. Par ailleurs, les biofilms du genre *Acetobacter* oxydent l’éthanol du vin en acide acétique. Ce procédé permet la fabrication « traditionnelle » du vinaigre.

1.3.3.2 Biotechnologie

Les biofilms de l’espèce *Aspergillus niger* sont utilisés en industrie pour produire l’enzyme cellulase. Cet enzyme est utilisé en industrie agroalimentaire et textile, par exemple pour la finition de certains vêtements comme les jeans délavés (Briandet et al, 2012). Les biofilms indigènes d’autres espèces sont également utilisés dans la production de molécules et composés d’intérêt comme des acides, des polysaccharides ou encore des biosurfactants. Des biofilms d’espèces génétiquement modifiées permettent également de produire de telles molécules. Des biofilms de l’espèce bactérienne *Bacillus subtilis* sont par exemple développés pour sécréter des peptides antimicrobiens spécifiques *in situ*, peptides inhibant la croissance de bactéries sulfo-réductrices au sein des biofilms (Jayaraman et al, 1999), notamment impliquées dans les problématiques de biocorrosion.

1.3.3.3 Dépollution

Les biofilms sont utilisés depuis plus d’un siècle dans le traitement des eaux usées (Wuertz et al, 2003). Le principe est d’utiliser les propriétés métaboliques des biofilms pour dégrader les matières organiques des effluents. Deux types de systèmes existent : les systèmes à biofilms statiques où les biofilms adhèrent à un support fixe (réacteur type biofiltre) et les systèmes à biofilms circulants où les biofilms sont sur un support en mouvement dans le bioréacteur (par exemple les lits bactériens). Dans les stations d’épuration à boues activées les biofilms sont aussi sous forme d’auto-agglomération microbienne, on parle alors de floccs. Les biofilms sont également utilisés dans les procédés de bioremédiation (fonction biodégradative des polluants), de biostimulation (ajout de nutriments spécifiques) et de bioaugmentation (injection de souches spécialisées) des sols pour l’élimination de nombreux polluants environnementaux tels que les composés aromatiques substitués ou les métaux lourds (Singh et al, 2006). L’espèce bactérienne *Escherichia hermannii* est par exemple capable de dégrader les chlorobenzènes. Une souche recombinante de *Pseudomonas fluorescens* permet

également de dégrader le trichloroéthylène dans les racines des plantes (Yee et al, 1998). On parle alors de rhizoremédiation.

1.3.3.4 Energie

La production d'énergie par les biofilms peut être directe, comme celle produite par les piles à combustible microbiennes, ou indirecte, par la valorisation des biogaz issus de la digestion anaérobie (méthanisation) des déchets. Ces biogaz sont utilisés en tant que carburant, pour la production de chaleur et/ou pour la production d'électricité. Les microorganismes ont des propriétés électro-actives (Kim et al, 1999) qui sont exploitées par l'homme pour produire de l'électricité : ces systèmes sont appelés biopiles, ou piles à combustible microbiennes (Lovley, 2006b). En effet, des biofilms – tels que ceux des espèces *Geobacter sulfurreducens* ou *Rhodospirillum rubrum* – peuvent se développer à la surface des anodes et dégrader des déchets/substrats organiques ; l'oxydation de cette matière organique produit des électrons transmis aux électrodes (Bond et al, 2002 ; Tender et al, 2002 ; Lovley, 2006a). Ces biopiles sont intéressantes pour produire de l'électricité à faible coût et représentent une biotechnologie d'avenir.

1.4 Problèmes relatifs aux biofilms

Du fait de leur nature ubiquitaire et de leur facilité à coloniser bon nombre d'environnements sur Terre, il n'est pas surprenant que les biofilms se développent aussi dans des endroits où leur présence n'est pas souhaitée et devient problématique.

Les biofilms ont tout d'abord été reconnus comme problématiques dans l'industrie, en conduisant à la corrosion de tuyauteries et canalisations (Beech et Sunner, 2004 ; Dobretsov et al, 2009), en augmentant les pertes de charges ou en colmatant des membranes. Ce n'est qu'ensuite qu'on a reconnu leur caractère problématique dans le domaine médical, notamment en mettant en évidence leur responsabilité dans les infections persistantes liées à l'implantation de dispositifs médicaux chez l'homme (Costerton et al, 1999). Les biofilms sont impliqués dans la plupart des maladies infectieuses et inflammatoires chroniques bactériennes (Sauer et al, 2007) et associés à beaucoup de maladies nosocomiales.

1.4.1 Biofilms problématiques en santé

1.4.1.1 Infections nosocomiales

Les infections nosocomiales sont les infections acquises en milieu hospitalier et clinique. Il faut savoir qu'« environ 5 % des patients qui séjournent à l'hôpital contractent une infection au sein de l'établissement » (source INSERM). Aux Etats-Unis, les infections nosocomiales touchent environ 10 % des patients et constituent la quatrième cause de mortalité du pays (Wenzel, 2007). Et entre 60 et 70 % des infections nosocomiales sont associées à l'implantation de matériel médical chez le patient (Bryers, 2008).

Les biofilms de l'espèce bactérienne *Staphylococcus epidermidis* sont par exemple impliqués dans presque 80 % des infections associées au matériel médical implanté chez le patient (Götz, 2002).

Les biofilms peuvent coloniser la surface de nombreux – si ce n'est de tous – dispositifs médicaux (Glitz et Peters, 2000) : implants orthopédiques, prothèses artificielles (vasculaires, oculaires, ou valves cardiaques par exemple), *pacemakers*, sondes urinaires ou gastriques, cathéters, canules d'intubation, respirateurs artificiels, fils de suture ou encore dispositifs intra-utérins contraceptifs. La

contamination du matériel implanté constitue alors une source d'infection persistante pour le patient qui devient chroniquement malade (Costerton et al, 1999). Cette contamination peut venir des microbes commensaux du patient lui-même (auto-contamination), d'autres personnes telles que les équipes médicales ou les visiteurs du patient (allo-contamination), ou bien de microbes présents dans l'environnement (exo-contamination).

Ainsi les microorganismes du microbiote humain sont souvent responsables de la contamination de ces dispositifs.

Par exemple, les biofilms des espèces *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* contaminent les cathéters, ceux des espèces *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis* se forment à la surface des prothèses orthopédiques et ceux de l'espèce *Escherichia coli* colonisent les sondes urinaires (Costerton et al, 1999).

Ces biofilms provoquent ensuite des infections persistantes et des inflammations chroniques pour le patient, pour qui le meilleur traitement demeure alors le retrait du matériel implanté. Des épisodes de bactériémie sont également fréquents chez ces patients (Marrie et al, 1982), dont le risque septicémique est présent.

Les biofilms sont donc problématiques pour les patients, mais aussi pour leurs visiteurs. En effet, les biofilms se développant sur les surfaces métalliques telles que les poignées ou plaques de porte, les rebords de lit ou encore présents dans les conduits d'alimentation en eau représentent une source d'infection potentielle.

1.4.1.2 Infections chroniques

Le National Institutes of Health (NIH) a estimé que les biofilms sont impliqués dans plus de 80 % des infections et inflammations chroniques bactériennes (Sauer et al, 2007). Il est également estimé que les maladies impliquant les biofilms sont responsables de 19 millions d'infections aux Etats-Unis d'Amérique chaque année, causant des centaines de milliers de morts et coûtant des milliards de dollars de frais médicaux (Wolcott et al, 2010).

De nombreuses espèces microbiennes représentent des pathogènes opportunistes profitant de l'état de santé affaibli ou de blessures du patient pour s'introduire et s'établir sous forme de biofilms dans son organisme. A l'instar de la flore commensale humaine, de telles infections se rencontrent dans toutes les grandes fonctions du corps. Les paragraphes suivants présentent quelques-unes de ces infections imputées aux biofilms.

- ***Infections pulmonaires***

Un des plus grands modèles de biofilms étudié à travers le monde est l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa*. Ceci vient sans doute du fait qu'il s'agit du microorganisme responsable du décès de nombreuses personnes atteintes de mucoviscidose. L'espèce trouve en effet en les poumons de ces patients un environnement favorable pour s'établir sous forme de biofilms (Koch et Høiby, 1993 ; Singh et al, 2000 ; Lyczak et al, 2002). Le fait que l'un des enfants de Bill Costerton était atteint de mucoviscidose a probablement dû jouer un rôle historique. Bien que *Pseudomonas aeruginosa* soit l'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les infections persistantes des poumons de ces malades, l'espèce *Burkholderia cepacia* est aussi responsable de leur pneumonie (Govan et Deretic, 1996).

- ***Infections urinaires***

Les biofilms sont impliqués dans de nombreuses infections urinaires telles que les urétrites, les cystites ou les prostatites chroniques (Nickel et Costerton, 1993). Les bactéries de l'espèce *Escherichia coli* et d'autres bactéries Gram négatives sont souvent en cause. En particulier, les souches uropathogènes d'*Escherichia coli* (UPEC) sont responsables de 90 % des infections du tractus urinaire. Des biofilms de l'espèce *Proteus mirabilis* se développent aussi parfois sur l'épithélium urinaire avant l'invasion des reins causant les pyélonéphrites (Nickel et al, 1994). Les infections du tractus urinaire résultent chaque année en plus de 8 millions de visites médicales aux Etats-Unis d'Amérique (Foxman, 2002).

- ***Infections gastro-intestinales***

Les biofilms sont la cause de certaines infections du tractus gastro-intestinal. La prévalence du syndrome de Barrett est de 1,6 % et de 6,8 % dans la population collective et dans celle ayant subi un examen endoscopique, respectivement (Ronkainen et al, 2005 ; Rex et al, 2003). On retrouve des biofilms du genre *Campylobacter* dans le mucus de ces patients (Macfarlane et al, 2007). Un autre exemple est celui de la colite ulcéraire où la croissance des biofilms – de plus de 70 taxons – dans le mucus intestinal est important dans la pathogenèse de cette infection (Macfarlane et al, 2004).

- ***Infections cardiaques***

Les biofilms peuvent coloniser l'endothélium vasculaire – notamment lorsque celui-ci est endommagé et que des fibronectines sont produites par l'organisme hôte – des valves du cœur et être à l'origine d'endocardites. En effet, des espèces bactériennes comme *Staphylococcus aureus* ou du genre *Streptococcus* possèdent des récepteurs à fibronectine capables de lier ces protéines (Livornese et Korzeniowski, 1992) et de former des biofilms au niveau du thrombus. Les microorganismes rejoignent initialement le système sanguin principalement *via* l'oropharynx, le tractus gastro-intestinal et le tractus urogénital.

- ***Infections buccales***

Les biofilms sont responsables de plaques dentaires, de caries, de gingivites ou de périodontites en se développant à la surface de l'email dentaire ou sur les membranes buccales. Les espèces du genre *Streptococcus* sont souvent impliquées.

- ***Infections otorhinolaryngologiques (ORL)***

Les biofilms sont à la source d'infections ORL. En effet, en colonisant la muqueuse de l'oreille moyenne, les biofilms bactériens – notamment ceux de l'espèce *Haemophilus influenzae* – sont responsables d'otites chroniques chez l'enfant (Ehrlich et al, 2002 ; Hall-Stoodley et al, 2006). Les biofilms, comme ceux de l'espèce *Staphylococcus aureus*, peuvent également provoquer des rhinosinusites chroniques en s'établissant de manière persistante au niveau du mucus des sinus paranasaux (Shields et al, 2013).

- ***Infections oculaires***

Les biofilms peuvent causer des kératites ou endophtalmites en contaminant soit la surface d'un dispositif oculaire, soit directement les tissus de l'œil humain. Par exemple, les biofilms de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* se développent sur les lentilles de contact et ceux des streptocoques sur le stroma de la cornée (Bispo et al, 2015).

- ***Infections osseuses***

L'ostéomyélite est la conséquence de biofilms développés sur les tissus osseux humains. Les espèces impliquées sont nombreuses : *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*... (Brady et al, 2008). Les microorganismes arrivent sur le site par inoculation directe (plaie, fracture osseuse, chirurgie) ou par voie hématogène indirecte.

- ***Infections cutanées***

Les plaies chroniques telles que les escarres, les ulcères de jambes ou ceux des pieds des personnes diabétiques sont également causées par des biofilms notamment bactériens des genres *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* et *Proteus* (James et al, 2008). Les brûlures et blessures constituent un environnement adéquat pour la formation de biofilms, notamment ceux de *Pseudomonas aeruginosa*.

- ***Infections gynécologiques obstétriques***

Des biofilms microbiens ont finalement été identifiés pour la première fois en 2008 dans un cas d'infection intra-amniotique sur épanchement de fluide amniotique (Romero et al, 2008). Les microscopies électronique et confocale ont permis de mettre en évidence ces derniers dans des échantillons amniotiques transvaginaux.

1.4.2 Biofilms problématiques en industrie

Les biofilms sont problématiques dans de nombreux secteurs et procédés industriels. Des industries telles que les industries pétrolière, nucléaire, papetière, textile, agroalimentaire, entre autres, sont impactées par les biofilms.

1.4.2.1 Encrassement industriel

Les biofilms colonisent les canalisations et les équipements industriels en se logeant généralement au niveau des anfractuosités des matériaux et dans les zones mortes ou protégées (coudes, courbures, jointures). De tels biofilms se retrouvent dans les conduits d'à peu près toutes les industries utilisant l'eau comme matière première, comme fluide de refroidissement etc. Ils peuvent ainsi endommager les matériaux en provoquant l'encrassement et l'obstruction des tuyauteries, affecter la performance des échangeurs thermiques en augmentant la résistance au transfert de chaleur, et conduire à la biocorrosion et la détérioration des réservoirs. La biocorrosion consiste en la détérioration accélérée des métaux (Beech et Sunner, 2004) et d'autres matériaux, tels que le béton, due à la présence de biofilms à leur surface. Il est à noter que la corrosion coûte chaque année des milliards de dollars à l'industrie américaine (Etude « Corrosion Costs and Preventive Strategies in the United States » publiée par la U.S. Federal Highway Administration ; Koch et al).

1.4.2.2 Industrie agroalimentaire

En industrie agroalimentaire, les biofilms peuvent aussi se développer sur les surfaces en acier inoxydable utilisées dans la préparation des aliments et favoriser ainsi la présence de bactéries d'altération ou de bactéries pathogènes dans les produits finis (Chmielewski et Frank, 2003). Les bactéries d'altération dégradent les qualités organoleptiques des denrées alimentaires alors que les bactéries pathogènes représentent un danger pour la santé du consommateur. Il faut savoir que l'« on considère que 40 % des infections alimentaires pourraient être liées à des contaminations croisées dues aux biofilms lors de la chaîne de transformation des produits. » (Briandet et al, 2012). Les toxi-

infections alimentaires peuvent ainsi résulter de contaminations des produits dans les usines de transformation alimentaire. Par exemple, les souches entérohémorragiques de l'espèce bactérienne *Escherichia coli* (EHEC) sont responsables d'infections alimentaires du tractus gastro-intestinal et il y a chaque année aux Etats-Unis plus de 76 millions d'infections d'origine alimentaire conduisant à 325 000 hospitalisations (Mead et al, 1999), 5000 morts (Mead et al, 1999) et un coût de 1426 milliards de dollars (Roberts, 2007). L'espèce *Listeria monocytogenes* est également un redoutable pathogène de l'industrie agroalimentaire, notamment de produits laitiers et de poissons. La bactérie est en effet capable de se développer à la température de réfrigération des produits, dans des endroits frais et humides, où elle s'établit sous forme de biofilm.

1.4.2.3 Industrie de l'eau

L'une des principales technologies de production d'eau douce à partir de sources d'eaux salées ou d'eaux usées est l'osmose inverse. Cependant, l'une des problématiques majeures de cette technologie est l'encrassement des membranes par des biofilms, conduisant à une limitation de la capacité de production et des coûts d'exploitation augmentés pour l'industriel. Les biofilms colonisent également les tours de refroidissement, les systèmes de purification et les réseaux de distribution de l'eau potable. Ils constituent ainsi une source de contamination de l'eau potable et représentent un danger potentiel pour le consommateur.

1.4.2.4 Industrie navale

Le *biofouling* des coques de navires en métal commencent généralement par la colonisation de ces derniers par les biofilms bactériens auxquels se rajoutent ensuite de plus gros organismes marins (coquillages, crustacés, algues, coraux...) et ce malgré l'utilisation de revêtements *antifouling*. Il est estimé que de tels encrassements coûtent chaque année 56 millions de dollars à la Marine américaine et ce uniquement pour une seule classe de navires (Schultz et al, 2011). Les coûts associés au *biofouling* des coques navales concernent notamment leur revêtement (application et retrait), leur nettoyage et entretien ainsi que les dépenses supplémentaires en carburant. Cette surconsommation de carburant (de 20 à 50 %) est attribuée aux forces de frottement provoquant une résistance à l'avancée du navire dans l'eau.

1.4.2.5 Industrie pétrolière

En plus de la corrosion des matériaux en industrie (Lopes et al, 2006 ; Lopes et al, 2007 ; Kjellerup et al, 2009), les biofilms de bactéries sulfate-réductrices posent également des problèmes dans l'industrie pétrolière du fait de la dégradation du pétrole.

1.5 Stratégies de lutte contre les biofilms

La nature robuste et récalcitrante des biofilms – c'est-à-dire leur capacité à supporter des stress physiques et chimiques (Singh et al, 2006), à persister (Lewis, 2010) et à résister au système immunitaire (Costerton et al, 1999 ; Donlan et Costerton, 2002) et aux antibiotiques (Nickel et al, 1985 ; Mayberry-Carson et al, 1986) – en fait des organismes difficiles à éliminer. Les cellules au sein des biofilms sont en effet 100 à 1000 fois plus résistantes aux biocides et antibiotiques que leurs homologues planctoniques (Gilbert et al, 2002). La résilience des biofilms vient tout d'abord de l'existence de la matrice extracellulaire qui constitue une barrière physique contre certains composés chimiques et prédateurs (Fux et al, 2005). Elle vient ensuite de l'hétérogénéité physiologique même des biofilms (Stewart et Franklin, 2008) qui apporte une protection contre un environnement néfaste.

Par exemple, les cellules dormantes ou persistantes ont une activité métabolique réduite et protègent ainsi les biofilms d'agents environnementaux létaux.

Différentes stratégies de lutte ont toutefois été développées depuis quelques années. Il en existe deux grandes catégories : les stratégies préventives et les stratégies curatives, qui agissent à différentes étapes de la vie du biofilm. Les stratégies préventives empêchent la formation de biofilms sur les surfaces ; les stratégies curatives perturbent les biofilms préétablis. La Figure 1.4 présente ces stratégies.

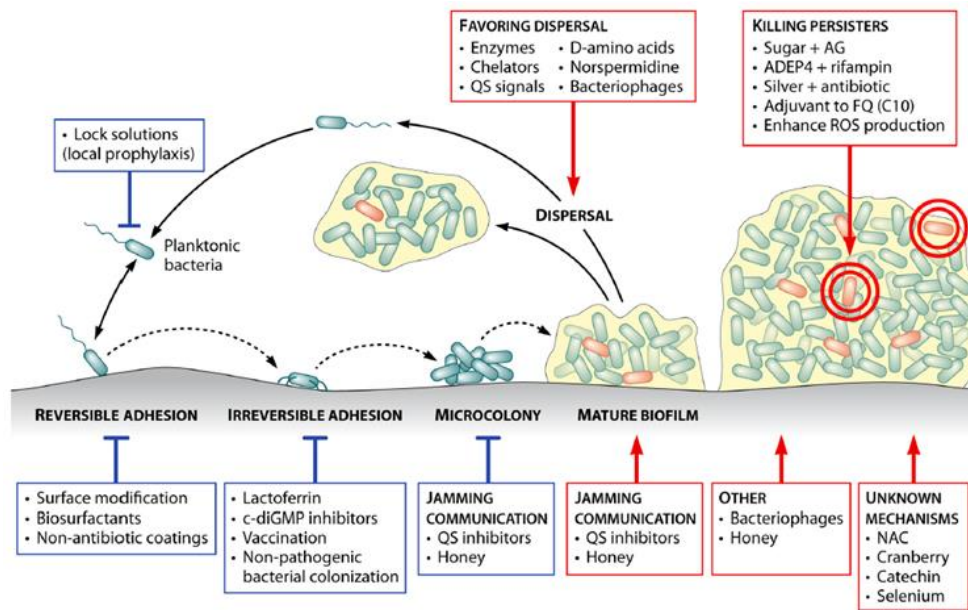


Figure 1.4. Stratégies de lutte contre les biofilms. Les approches visant à empêcher la formation de biofilms sont encadrées en bleu. Les approches visant à l'éradication des biofilms préexistants sont encadrées en rouge. Les cellules persistantes sont en orange. AG, aminoglycosides ; c-diGMP, cyclic di-GMP ; FQ, fluoroquinolones ; NAC, N-acétylcystéine ; QS, quorum sensing ; ROS, espèces réactives d'oxygène. La figure est issue de la publication de Lebeaux et collaborateurs (Lebeaux et al, 2014).

En particulier, à chaque étape du cycle de vie des biofilms est adaptée une stratégie particulière. En effet, certaines stratégies visent à empêcher l'attachement des microorganismes aux surfaces, d'autres à inhiber le développement microbien et d'autres à induire la dispersion des biofilms.

1.5.1 Inhibition de l'attachement microbien

L'inhibition de l'attachement microbien peut relever de quatre types de phénomènes : (i) physiques, (ii) physicochimiques, (iii) biochimiques et (iv) biologiques. Les trois derniers impliquent une modification de la surface du matériau. A ces phénomènes correspondent des stratégies particulières.

Stratégies physiques. Il a été montré que l'utilisation d'ondes acoustiques de surface de faible énergie empêche l'attachement microbien des espèces *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans* aux surfaces des cathéters (Hazan et al, 2006).

Stratégies physicochimiques. Elles impliquent le développement de surfaces modifiées aux propriétés antiadhésives. Par exemple, en milieu industriel et marin, des revêtements *antifouling* de métaux toxiques pour les microorganismes, comme le cuivre et l'étain (Chambers et al, 2006), sont utilisés pour lutter contre les biofilms et la corrosion qui s'en suit. Le nitrate de cérium et le chitosane de faible poids moléculaire inhibent également l'attachement et la croissance microbienne des espèces

Staphylococcus epidermidis, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* et *Candida albicans* sur des cathéters (Cobrado et al, 2012).

Stratégies biochimiques. Ces stratégies consistent en l'immobilisation d'agents chimiques antimicrobiens sur les surfaces. Ces agents antimicrobiens peuvent directement tuer les cellules qui s'attachent aux surfaces, comme certains biocides (Cloete et al, 1998) ; ils peuvent aussi entraver l'attachement microbien et le développement de biofilms subséquents.

Stratégies biologiques. Ces stratégies relèvent de la colonisation des surfaces par des bactéries spécifiques. De nombreuses bactéries sont capables de synthétiser et de sécréter des composés chimiques qui inhibent l'attachement microbien et la formation de biofilms d'autres espèces. Par exemple, la souche probiotique *Lactobacillus acidophilus* réduit la formation des biofilms de l'espèce *Streptococcus mutans*, un cariogène dentaire primaire, par inhibition de l'attachement (Tahmourespour et Kermanshahi, 2011).

1.5.2 Inhibition du développement microbien

L'inhibition du développement microbien correspond aux stratégies interférant soit directement avec les microorganismes du biofilm, soit avec leur matrice extracellulaire, soit avec les voies de signalisation intracellulaire ou encore avec la communication intercellulaire microbienne.

1.5.2.1 Attaque des microorganismes du biofilm

L'attaque ciblant les cellules au sein des biofilms peut être le résultat de trois principaux agents : (i) physiques, (ii) chimiques et (iii) biologiques.

Agents physiques. Les forces mécaniques telles que celles apportées par la sonication ou le rinçage peuvent être utilisées pour l'enlèvement de biofilms. Les ondes acoustiques de surface sont par exemple capables d'éliminer des biofilms des espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus epidermidis* formés sur des cathéters urinaires ; elles augmentent même la susceptibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux traitements antibiotiques (Kopel et al, 2011). Le couplage agents physiques et agents chimiques est une méthode de nettoyage en place utilisée dans de nombreuses industries, notamment agroalimentaires.

Agents chimiques. Des agents antimicrobiens visent également à attaquer ou à tuer les microorganismes au sein des biofilms. Parmi ceux-ci, les biocides et les désinfectants ont été l'arme principale de l'industrie pour se débarrasser des biofilms associés à l'encrassement des surfaces. Les traitements chimiques éliminant plus de 25 % de la biomasse des biofilms sont par exemple NaCl, CaCl₂, les agents chélatants comme l'EDTA et le Dequest 2006, les surfactants (SDS, Tween 20, Triton X-100), l'hypochlorite, la monochloramine et l'urée concentrée (Chen et Stewart, 2000). Par son action négative sur la biogenèse des pili, la virstatine a également montré une diminution de 38 % de la formation des biofilms de l'espèce *Acinetobacter baumannii* (Nait Chabane et al, 2014). De nombreux acides gras libres saturés et insaturés ont par ailleurs la capacité de tuer, d'inactiver ou d'inhiber la croissance bactérienne (Desbois et al, 2008 ; Desbois et Smith, 2010). Les antibiotiques et les anticorps sont d'autres agents ciblant les cellules au sein des biofilms.

Agents biologiques. Les agents biologiques peuvent être naturels ou conçus par ingénierie. Les phages (ou bactériophages, virus infectant les bactéries) constituent des agents anti-biofilms naturels (Curtin et Donlan, 2006 ; Azeredo et Sutherland, 2008 ; Donlan, 2009). Les phages peuvent être lytiques (virulents) ou lysogènes (tempérés). Les phages lytiques infectent les bactéries et provoquent

la lyse cellulaire, nécessaire à leur propagation, alors que les phages lysogènes s'intègrent dans le génome des bactéries hôtes et prolifèrent par amplification générationnelle. Les deux types de virus peuvent être utilisés dans la lutte anti-biofilms. Dans le cas des phages tempérés, ils sont répliqués et exprimés dans les cellules hôtes au sein desquelles ils induisent l'expression de dépolymérase hydrolysant les polymères extracellulaires. Par exemple, des biofilms de l'espèce *Enterobacter cloacae* ont été complètement éradiqués par un cocktail de trois phages exprimant des polysaccharide lyases (Tait et al, 2002). Un phage codant pour une dépolymérase a également été administré par aérosol pour traiter les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose (Schaak, 2003). Les phages conçus par ingénierie (manipulation génétique pour augmenter le spectre d'hôtes ou modifier le type d'hydrolases produites) sont aussi une approche prometteuse dans ce secteur. Un variant du phage T7 a par exemple été conçu pour exprimer la dispersine B, enzyme dégradant le polymère β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine de la matrice extracellulaire de différentes espèces microbiennes (Lu et Collins, 2007). Les bactéries peuvent également être des agents anti-biofilms en ce sens : des bactéries nageuses de l'espèce *Bacillus thuringiensis* conçues pour exprimer la lysostaphine (un bactéricide) sont capables de tuer des biofilms de l'espèce *Staphylococcus aureus* (Houry et al, 2012).

1.5.2.2 Déstabilisation des structures tridimensionnelles

La déstabilisation des structures tridimensionnelles des biofilms revient à altérer leur matrice extracellulaire. L'application d'enzymes hydrolytiques telles que les protéases, les glycosidases, les lipases ou les nucléases, représentent un arsenal à fort potentiel. Par exemple, la dépolymérisation de la β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine par la dispersine B (produite naturellement par l'espèce *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) perturbe le développement des biofilms des espèces *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia pestis* et *Pseudomonas fluorescens* (Itoh et al, 2005). Par ailleurs, l'application d'un cocktail de protéases a réduit à plus de 80 % des biofilms multi-espèces de l'industrie papetière (Marcato-Romain et al, 2012). En outre, le traitement par la déoxyribonucléase NucB réduit les biofilms associés aux rhinosinusites chroniques (Shields et al, 2013).

1.5.2.3 Interférence avec la signalisation intracellulaire

Le bis-(3',5')-cyclic-dimeric-guanosine monophosphate (c-di-GMP) est un messager secondaire bactérien universel (Römling et al, 2013). Il intervient dans de nombreux processus cellulaires et joue un rôle essentiel dans la formation de biofilms (Jenal, 2004 ; Cotter et Stibitz, 2007). Les approches interférant avec le c-di-GMP dans le but d'inhiber la formation de biofilms se présentent comme des stratégies de lutte prometteuses (Sintim et al, 2010). Certaines de ces stratégies visent à interférer directement avec le messager. Des molécules pouvant former des complexes biologiques inactifs avec le c-di-GMP représentent ainsi de potentiels agents chimiques anti-biofilms. C'est le cas des molécules aromatiques iminium et diamidinium qui sont capables de provoquer l'agrégation du c-di-GMP (Kelsey et al, 2012). D'autres de ces stratégies visent à interférer avec le système de régulation et les enzymes synthétisant le c-di-GMP, les diguanylate cyclases (DGC). Des inhibiteurs de DGC inhibent ainsi la formation des biofilms de l'espèce bactérienne *Vibrio cholerae* (Sambanthamoorthy et al, 2012). Il a par ailleurs été montré que la délétion de DGC actives abolit complètement la formation de certains biofilms (Solano et al, 2009 ; Newell et al, 2011). Enfin, de dernières stratégies visent à interférer avec le système de signalisation du c-di-GMP. Il a ainsi été montré que l'ajout de c-di-GMP extracellulaire inhibe les interactions adhésives intercellulaires et réduit la formation des biofilms de l'espèce pathogène *Staphylococcus aureus* (Karaolis et al, 2005).

1.5.2.4 Interférence avec la communication intercellulaire

Le quorum sensing (QS) est une forme de communication chez les microorganismes (voir section 1.2.2.2). Ces derniers l'utilisent pour coordonner des comportements de groupes (bioluminescence, virulence etc). La régulation du QS est effectuée par la synthèse et la sécrétion de petites molécules signal, souvent appelées « autoinducteurs ». Deux principaux types de molécules interférant avec le QS ont été développés : les inhibiteurs de QS et les « quencheurs » de QS. Les inhibiteurs de QS sont analogues aux autoinducteurs ; ils permettent de détourner les récepteurs cibles de ces molécules signal. Parmi ceux-ci se trouvent l'acide salicylique, le nifuroxazide et le chlorzoxazone, perturbant le QS de *Pseudomonas aeruginosa* (Yang et al, 2009). Les quencheurs de QS sont des enzymes dégradant les autoinducteurs (Dong et al, 2007). Le groupe des paraoxonases – molécules naturellement produites par les cellules de mammifères – inactive par exemple le QS de *Pseudomonas aeruginosa* en hydrolysant l'autoinducteur N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (Teiber et al, 2008). L'immobilisation d'enzymes de quorum-quenching sur des surfaces telles que des membranes de nanofiltration a démontré des propriétés anti-biofilms (Kim et al, 2011 ; Ng et al, 2011). Finalement, l'inhibition du QS par des furanones synthétiques a démontré une atténuation des infections du poumon par *Pseudomonas aeruginosa in vivo* chez la souris (Wu et al, 2004).

1.5.3 Induction de la dispersion

La dispersion est la dernière étape du cycle de vie des biofilms, permettant aux microorganismes au sein de la communauté sessile de retourner à un état planctonique. Une ultime stratégie de lutte anti-biofilm est donc de déclencher cette étape. Différents moyens d'induire la dispersion ont été étudiés ces dernières années. Parmi ceux-ci, on trouve l'utilisation de certains gaz comme le monoxyde d'azote (NO), le développement de systèmes biologiques synthétiques ou l'application de molécules à effet dispersant.

1.5.3.1 Monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz naturellement produit par diverses espèces procaryotes et eucaryotes. A forte concentration, NO est une molécule bactéricide, alors qu'à concentration nanomolaire, il fonctionne comme une molécule signal et déclenche la dispersion de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* (Barraud et al, 2006). Des recherches postérieures suggèrent un rôle du c-di-GMP dans la dispersion des biofilms par NO (Barraud et al, 2009). La molécule NO représente un potentiel agent aérosol dans la lutte des patients atteints de mucoviscidose contre *Pseudomonas aeruginosa*.

1.5.3.2 Biologie synthétique

La biologie synthétique est une biotechnologie en plein essor dans de nombreux domaines, y compris dans la recherche en microbiologie. Elle permet notamment le développement de systèmes biologiques capables de réaliser des fonctions spécifiques par assemblage de modules génétiques (Fu, 2006 ; Purnick et Weiss, 2009). Les scientifiques ont aussi cherché à utiliser cette ingénierie dans le but de lutter contre les biofilms (quelques exemples ont déjà été donnés précédemment). La biologie synthétique conçoit ainsi des souches bactériennes et virales induisant la dispersion de biofilms. Par exemple, un consortium de biofilms mettant en jeu un réseau de régulation génique permet de déloger des bactéries « colonisatrices » par des bactéries « dispersantes » (Hong et al, 2012). Une version modifiée du bactériophage T7 a également été conçue pour produire la dispersine B de l'espèce *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lors de l'infection phagique dans le but de dégrader les liaisons

glycosidiques du polymère β -1,6-N-acétyl-D-glucosamine trouvé dans la matrice extracellulaire de certains biofilms (Lu et Collins, 2007).

1.5.3.3 Molécules dispersantes

Il existe différentes molécules dispersantes. Leur nature, leur origine, leur spécificité de cible, leurs effets et leurs mécanismes d'action sont très divers. On trouve aussi bien des composés organiques que des enzymes impliqués dans la dispersion (Kaplan, 2010). Le Tableau 1.3 présente quelques-unes de ces molécules.

Molécule	Mode d'action	Organisme	Références
N-butanoyl-L-homoserine lactone	Module le <i>sloughing</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Rice et al, 2005
Dispersine B	Hydrolyse la matrice extracellulaire	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Lu et Collins, 2007
Acide <i>cis</i> -11-méthyl-2-dodécénoïque (DSF)	Déstabilise la matrice extracellulaire (expression de l'endo- β -1,4-mannanase) Interfère avec le c-di-GMP Induit la dispersion	<i>Xanthomonas campestris</i>	Dow et al, 2003 Dow et al, 2006
Acide <i>cis</i> -2-décénoïque	Inhibe la formation Induit la dispersion	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Davies et Marques, 2009 Jennings et al, 2012 Hibbing et Fuqua, 2012 Rahmani-Badi et al, 2014
5 et 7-hydroxyindole	Réduit la formation	<i>Escherichia coli</i> K-12 et O157:H7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lee et al, 2007a Lee et al, 2009
(5Z)-4-bromo-5-(bromométhylène)-3-butyl-2(5H)-furanone	Inhibe la formation Induit le <i>swarming</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ren et al, 2001
5-fluorouracil	Inhibe la formation (adhésion à la surface)	<i>Escherichia coli</i>	Landini et al, 2010
Lysine oxidase	Induit la dispersion (par mort cellulaire)	Bactéries Gram négatives	Mai-Prochnow et al, 2008
NucB (DNase extracellulaire)	Induit la dispersion	Bactéries Gram négatives et Gram positives	Nijland et al, 2010
D-amino acids	Induit la dispersion (par relâchement des fibres amyloïdes)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Kolodkin-Gal et al, 2010

Tableau 1.3. Molécules dispersantes.

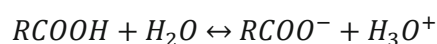
La stratégie de lutte anti-biofilms induisant la dispersion diffère considérablement des autres stratégies proposées jusqu'ici. Là où les autres stratégies attaquent ou inhibent la formation des biofilms, l'induction de la dispersion utilise les mécanismes naturels de développement des biofilms pour les éliminer. En effet, plutôt que d'entamer une bataille entre agents antimicrobiens et biofilms, bataille souvent gagnée par les microbes qui développent des stratégies de résistance très diverses (augmentation de cellules persistantes et de l'état de dormance au sein des biofilms, intensification de

la sécrétion de polymères dans la matrice extracellulaire, activation de pompes d'efflux etc ; Mah et O'Toole, 2001), on utilise dans cette stratégie directement l'énergie des microorganismes du biofilm pour se débarrasser de ce dernier.

Parmi les molécules dispersantes connues à ce jour, l'une d'entre elles a tout particulièrement retenu notre attention : l'acide *cis*-2-décénoïque (CDA). En effet, le CDA est une molécule prometteuse dans la mise au point de procédés de dispersion par l'étendue de son action sur des microorganismes de différents espèces et genres, jusque dans différents règnes du vivant. Le CDA induit en effet la dispersion des biofilms mono-espèces de nombreuses bactéries Gram positives et Gram négatives ainsi que ceux de la levure *Candida albicans* (Davies et Marques, 2009). La molécule est également capable de disperser des biofilms multi-espèces, comme le montre l'étude menée sur des biofilms mixtes d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* (Rahmani-Badi et al, 2014), tout comme le fait son isomère l'acide *trans*-2-décénoïque sur des biofilms multi-espèces de granules aérobies (Cai et al, 2013).

La combinaison du CDA avec d'autres molécules telles que des antibiotiques ou des désinfectants a également démontré une synergie dans l'effet dispersant. En effet, l'utilisation simultanée du CDA et des antibiotiques ampicilline et ciprofloxacine induit une augmentation significative de la dispersion : en absence de CDA, l'ampicilline cause une réduction de la biomasse des biofilms de 21 %, alors qu'en présence de CDA, la réduction observée est de 78 % (Rahmani-Badi et al, 2014). De plus, la combinaison du CDA avec les désinfectants peroxyde d'hydrogène et acide peracétique a démontré une élimination significative des biofilms d'espèces problématiques en industrie agroalimentaire (Sepehr et al, 2014). En outre, le CDA démontre une activité dispersante dans une large gamme de concentration, allant du nanomolaire au millimolaire (Davies et Marques, 2009). Ceci en fait un agent dispersant à fort potentiel dans des applications industrielles ou médicales, où de très faibles concentrations sont attendues à être sans danger pour l'homme et l'environnement. De précédents travaux ont finalement montré que le CDA n'a pas d'effet cytotoxique ou stimulateur sur les fibroblastes humains, même à de fortes concentrations (jusqu'à 250 µg/mL) (Jennings et al, 2012).

Le CDA est un acide gras mono-insaturé dont le squelette comporte dix atomes de carbone. Sa formule brute est C₁₀H₁₈O₂ et sa masse molaire est de 170,25 g/mol. Comme tout acide gras, sa chaîne carbonée est hydrophobe et son groupement acide carboxylique est hydrophile. En solution dans l'eau, sa fonction carboxylique se dissocie partiellement en ion carboxylate selon l'équation-bilan :



Il s'agit d'un acide faible dans l'eau (pKa compris entre 4 et 5). La Figure 1.5 présente la structure moléculaire du CDA.

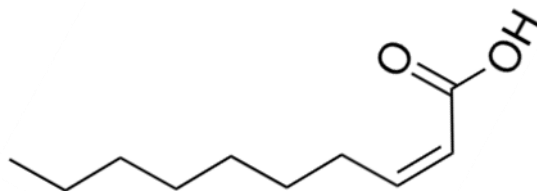


Figure 1.5. Structure moléculaire du CDA.

Le CDA a été initialement identifié comme impliqué dans la dispersion des biofilms de l'espèce bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 qui sécrète ce composé organique dans le milieu environnant – à une concentration de 2,5 nM – pour induire sa propre dispersion (Davies et Marques,

2009 ; Amari et al, 2013). Le CDA serait structurellement et fonctionnellement relié à la classe de molécules signal d'acides gras courts, notamment aux molécules acide *cis*-11-méthyl-2-dodécénoïque connu sous le nom de DSF et acide *cis*-2-dodécénoïque connu sous le nom de BDSF, molécules agissant en tant que vecteur de communication intercellulaire chez les bactéries et les champignons (Davies et Marques, 2009).

Les mécanismes par lesquels le CDA disperse les biofilms sont encore aujourd'hui à élucider. L'étude récente de Rahmani-Badi et collaborateurs par la technologie de puce à ADN démontre que le CDA induit un changement de l'expression génique des biofilms de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* : 91 % des gènes différentiellement exprimés en présence de CDA ont présenté une up-régulation, notamment des gènes impliqués dans la synthèse et la détection du CDA, des gènes de métabolisme et des gènes impliqués dans la biosynthèse du flagelle et la motilité (Rahmani-Badi et al, 2015). Cette méthodologie permet de cribler à haut débit les gènes ou groupes fonctionnels dont l'expression est influencée de près ou de loin par le CDA, et ces résultats constituent un point de départ dans l'élucidation des mécanismes de dispersion *via* la molécule. Cependant, la méthodologie est moins adaptée pour une identification précise des fonctions biologiques directement impactées par le CDA. Il n'existe ainsi à ce jour aucune information évidente concernant les mécanismes de détection du CDA ou de transduction du signal qu'il véhicule au sein de la cellule.

Les avantages majeurs du CDA pour une utilisation potentielle de la molécule dans des procédés de dispersion sont notamment qu'il inhibe le développement des biofilms, qu'il provoque leur désagrégation en induisant la dispersion, qu'il altère leur virulence, qu'il fait revenir les cellules persistantes à un état susceptible aux antimicrobiens, qu'il agit à de faibles concentrations auxquelles il ne présente pas d'activité bactéricide, qu'il n'a pas d'effet cytotoxique et que son efficacité est augmentée quand il est couplé à d'autres agents antimicrobiens (Marques et al, 2014 ; Rahmani-Badi et al, 2014 ; Sepehr et al, 2014 ; Marques et al, 2015). C'est pour toutes ces raisons que le CDA est la molécule qui a été choisie comme modèle de dispersion dans ces travaux.

1.6 Objectifs des travaux et choix de la stratégie d'étude

L'objectif de ces travaux est de caractériser la dispersion des biofilms par la molécule modèle CDA. En effet, la mise au point de procédés dispersants nécessite la compréhension des mécanismes de dispersion, autrement dit du rôle que peut jouer la molécule CDA dans les voies de signalisation intra et intercellulaires, dans la déstabilisation de l'architecture des biofilms, dans la régulation de l'expression génique des microorganismes et dans le comportement phénotypique de ces derniers lors de la dispersion.

Dans le cadre de ce travail, nous nous intéressons à comprendre et à quantifier l'impact de la molécule CDA sur la structure du biofilm et sur la régulation *in situ* de l'expression génique des bactéries sessiles.

1.6.1 Choix de l'organisme modèle

L'organisme modèle qui a été sélectionné pour ces travaux est l'espèce microbienne *Escherichia coli* (*E. coli*).

La taxinomie d'*E. coli* est la suivante :

- Règne : *Bacteria*
 - Embranchement : *Proteobacteria*
 - Classe : *Gamma Proteobacteria*
 - Ordre : *Enterobacteriales*
 - Famille : *Enterobacteriaceae*
 - Genre : *Escherichia*
 - Espèce : *coli*

Il s'agit de l'espèce la plus répandue du genre *Escherichia*. Elle est abondamment représentée dans le tractus gastro-intestinal des animaux et représente environ 80 % de la flore intestinale aérobie de l'Homme. Les bactéries d'*E. coli* sont des bacilles droits à Gram négatif, non sporulés, anaérobie facultatifs, c'est-à-dire à métabolismes respiratoire et fermentaire. Leur taille varie de 0,5 à 3 μm . *E. coli* est sans doute l'espèce bactérienne la plus étudiée. Sa découverte ancienne, par Théodor Escherich en 1885, ainsi que sa rapidité de croissance, environ une division cellulaire toutes les 20 min en milieu riche à 37°C, en ont fait un organisme de choix en microbiologie, en biologie moléculaire ou encore en biotechnologie.

De plus, la propension de cet organisme à s'établir en mode de vie communautaire ainsi que la disponibilité d'un large éventail d'outils génétiques ont contribué à faire d'*E. coli* un modèle pertinent pour l'étude des biofilms (Beloin et al, 2008). *E. coli* est notamment utilisé pour étudier les mécanismes de croissance au sein des communautés sessiles (Schembri et al, 2003). Par ailleurs, les biofilms d'*E. coli* sont problématiques dans différents secteurs comme celui de la santé où ils sont impliqués dans les infections du système biliaire, les prostatites, les cystites associées aux cathéters urinaires ou encore dans la contamination des dispositifs intra-utérins et lentilles de contact (Costerton et al, 1999 ; Donlan et Costerton, 2002).

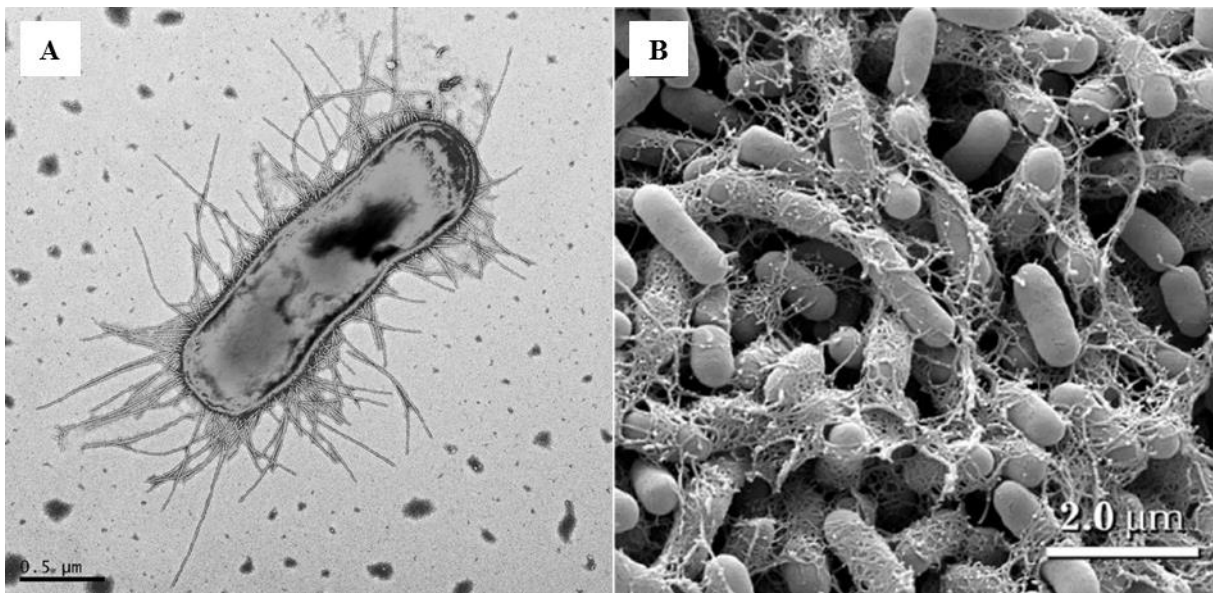


Figure 1.6. Micrographies d'*E. coli* par microscopie électronique. (A) Une bactérie planctonique de la souche pandémique d'*E. coli* H30. (B) Biofilms d'*E. coli* O157:H7 souche 43895OR (rdar) développés sur des coupons de verre. La figure (A) provient du site internet <http://hsnewsbeat.uw.edu> et la figure (B) est issue des travaux de Uhlich et collaborateurs (Uhlich et al, 2006).

E. coli K-12 est une des souches génétiquement caractérisées en laboratoire. Le génome d'*E. coli* K-12 est un ADN double brin circulaire ayant été complètement séquencé en 1997 par Blattner et

collaborateurs : il contient 4,6 millions de paires de bases comprenant 4288 cadres ouverts de lecture (ORF) dont plus du tiers codent pour des protéines inconnues (Blattner et al, 1997).

En particulier, *E. coli* BW25113 est une souche dérivée d'*E. coli* K-12 W1485 (Bachmann, 1996) communément utilisée en laboratoire de recherche au sein de la communauté scientifique. Elle a été créée au laboratoire de Barry L. Wanner à l'Université Purdue aux Etats-Unis et a été utilisée au départ dans une méthode de mutation génétique faisant intervenir le système de recombinaison red du bactériophage lambda (Datsenko et Wanner, 2000). *E. coli* BW25113 est ensuite devenue la souche parentale de la collection Keio, une ressource de biologie moléculaire majeure consistant en près de 4000 souches mutantes contenant la délétion de gènes uniques (Baba et al, 2006 ; Yamamoto et al, 2009). La souche et ses dérivées sont utilisées dans d'innombrables laboratoires à travers le monde et dans de nombreuses études ainsi que dans des enquêtes phénotypiques systématiques (Nichols et al, 2011) ou dans des travaux de biologie synthétique (Mutalik et al, 2013a ; Mutalik et al, 2013b ; Cambray et al, 2013). La séquence complète du génome d'*E. coli* BW25113 a également été déterminée et est disponible sur GenBank sous le numéro d'accès CP009273 (Grenier et al, 2014). Cette puissante ressource en fait une souche idéale pour la création de souches génétiquement modifiées d'*E. coli* et notamment pour la conception d'amorces d'amplification pour le clonage génétique de séquences génomiques spécifiques. Il s'agit finalement de la souche modèle utilisée au LBPA, pour laquelle des outils moléculaires sont déjà établis. C'est donc la souche BW25113 d'*E. coli* qui a été sélectionnée pour réaliser ces travaux.

Plus particulièrement, des souches spécifiques d'*E. coli* BW25113 ont été utilisées dans le but de caractériser la dispersion. Le protocole de construction de ces souches est détaillé au chapitre 2. La sélection des promoteurs d'intérêt, du gène rapporteur, la stratégie générale de construction génétique ainsi que la caractérisation des souches construites en culture planctonique et au sein des biofilms sont décrits au chapitre 4.

1.6.2 Choix de la technologie d'étude

La microscopie confocale à balayage laser (CLSM pour « confocal laser scanning microscopy ») est une technique d'imagerie permettant l'observation microscopique *in situ* et non-invasive d'échantillons. Le principe de la CLSM repose sur le scan de plans optiques d'un échantillon par un laser focalisé en mouvement imageant point par point l'ensemble du plan. Le mouvement du laser est virtuel, il s'agit souvent du mouvement d'un miroir dichroïque. Ce balayage permet la reconstitution numérique de l'image du plan. L'ensemble des plans scannés permettent la reconstruction tridimensionnelle de l'échantillon. Le sectionnement optique de l'échantillon est rendu possible par la présence d'un dispositif optique positionné en amont du détecteur, le « pinhole ». La source laser permet l'excitation lumineuse des fluorophores cibles dont l'émission de photons est collectée par un détecteur (PMT pour « photomultiplier tube » ou HyD pour hybride) qui retransmet alors un signal numérique. La CLSM nécessite donc le marquage des structures à mettre en évidence dans l'échantillon par des colorants fluorescents. L'avantage majeur de l'utilisation de la CLSM pour l'étude de rapporteurs génétiques au sein des biofilms est la résolution spatiale : les fonctions biologiques étudiées peuvent être localisées dans les structures tridimensionnelles des communautés sessiles. La résolution temporelle est également possible avec un module d'acquisition de *time-lapse*. La Figure 1.7 présente le principe de cette technologie.

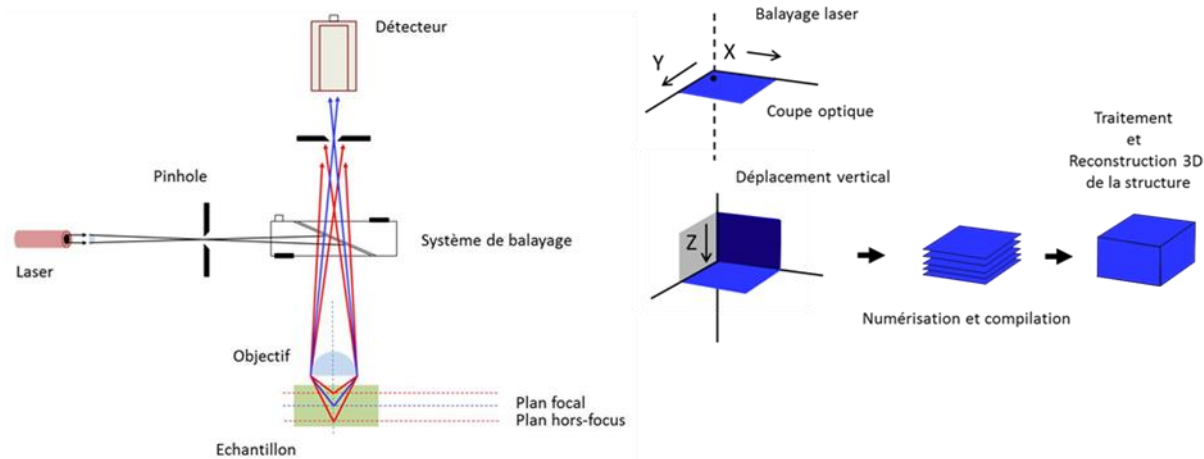


Figure 1.7. Schéma de principe d'un CLSM. La figure est gentiment fournie par Jeff Audibert du PPSM.

Depuis son arrivée sur le marché scientifique, la CLSM a été employée dans de nombreux travaux sur les biofilms, travaux ayant contribué à une meilleure connaissance de leur structure, de leur composition ou de leur physiologie (Azeredo et al, 2016). Le couplage de la technologie avec l'utilisation de rapporteurs génétiques a notamment concouru à mettre en lumière divers processus physiologiques ayant lieu au sein des biofilms. En effet, la CLSM permet l'observation *in situ* et en temps réel de biofilms, sans nécessiter une fixation préalable par des techniques chimiques. Elle permet ainsi la reconstruction tridimensionnelle de la structure des biofilms étudiés ainsi que l'étude de l'expression de gènes ciblés au sein de ces structures. La CLSM est la technologie majeure utilisée dans ces travaux.

1.6.3 Choix du système d'étude

Bien que les nouvelles technologies – telle la métagénomique – permettent une analyse globale et un criblage à grande échelle des communautés microbiennes dans divers environnements, la majorité de la connaissance scientifique sur le développement, les structures et les fonctions des biofilms viennent d'expériences réalisées dans des systèmes spécifiques tels que les cellules de flux, où les conditions de culture sont contrôlées par le chercheur et où une observation directe des biofilms par la détection de fluorophores (protéines fluorescentes, marqueurs cellulaires...) en CLSM est possible. Cette approche permet de mettre en évidence une localisation de différents types cellulaires, une différenciation cellulaire ou encore l'activité et l'expression de gènes cibles au sein des biofilms (Tolker-Nielsen et al, 2000 ; Labbate et al, 2004 ; Southey-Pillig et al, 2005 ; Morgan et al, 2006). La cellule de flux est donc le système d'étude sélectionné au cours de ces travaux.

Les protocoles de montage, de stérilisation et de développement des biofilms au sein de la cellule de flux (système microfluidique) sont détaillés au chapitre 2. La mise en place de ce système, l'optimisation des conditions d'opération ainsi que la caractérisation des biofilms développés dans ces travaux sont décrits au chapitre 3.

1.6.4 Bilan

La dispersion des biofilms d'*E. coli* souche BW25113 a donc été étudiée par CLSM dans un système microfluidique avec la molécule CDA comme modèle de dispersant. Le chapitre 5 de ce manuscrit présente ces résultats. Un article rédigé en anglais est également inclus dans ce chapitre, présentant l'approche analytique développée dans ces travaux en collaboration avec Bertrand Cinquin du LBPA pour une analyse architecturale et d'expression génique *in situ* des biofilms.

2. Matériel & Méthodes

2.1 Microbiologie

2.1.1 Milieux de culture

2.1.1.1 Composition des milieux de culture

Deux milieux de culture ont été utilisés au cours de ces travaux : (i) un milieu riche, le milieu Lysogeny Broth (LB) et (ii) un milieu minimal, le milieu M9, supplémenté en glucose (Glc) et en casamino acids (CAA). Le milieu LB est le milieu de culture utilisé pour les précultures et les constructions génétiques ; il est composé de 10 g/L de tryptone, de 5 g/L d'extrait de levure et de 5 g/L de NaCl (Sigma). Le milieu M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA est le milieu de culture utilisé pour la croissance des biofilms, les expériences en microfluidique et celles en microplaque ; sa composition est détaillée dans le Tableau 2.1. Le milieu M9, dont la composition peut être adaptée, permet un meilleur contrôle des composants du milieu et donc des vitesses de croissance des souches. De plus, son pouvoir tampon est plus fort et son autofluorescence plus limitée par rapport au milieu LB.

<u>Composé</u>	<u>Concentration</u>
Na ₂ HPO ₄	7,1 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
NaCl	0,5 g/L
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0,1 mM
Tryptophane	4 mg/L
Thymidine	5 mg/L

Tableau 2.1. Composition détaillée du milieu de culture M9.

Deux antibiotiques ont également été utilisés au cours de ces travaux pour sélectionner les souches : l'ampicilline (Amp) et la kanamycine (Kan). Leur concentration d'utilisation est détaillée dans le Tableau 2.2.

<u>Antibiotique</u>	<u>Concentration</u>
Ampicilline	100 µg/mL
Kanamycine	50 µg/mL

Tableau 2.2. Concentration des antibiotiques utilisés pour la sélection des souches.

2.1.1.2 Stérilisation des milieux de culture

Le milieu LB est stérilisé par autoclavage de 20 min à 121°C. Le milieu minimal M9 est préparé sous poste de sécurité microbiologique (PSM) à flux laminaire à partir de solutions mères préalablement stérilisées, soit par autoclavage de 20 min à 121°C, soit par filtration stérile à 0,2 µm. Les milieux se conservent à température ambiante pendant deux mois maximum.

2.1.2 Microorganismes

2.1.2.1 Souches bactériennes

Les microorganismes utilisés dans ces travaux sont des souches de l'espèce bactérienne *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12, les souches BW25113, XL10Gold et JM109 en particulier. Les souches XL10Gold et JM109 ont été utilisées pour les étapes intermédiaires de constructions génétiques. Ces souches permettent en effet une plus grande production de plasmides. La souche BW25113 sauvage (WT) et des souches modifiées de cette dernière ont été utilisées pour les expériences. Le Tableau 2.3 détaille les souches utilisées dans ces travaux.

Nom de la souche	Promoteur cloné	Gène rapporteur	Position	Résistance
BW25113 WT	-	-	-	-
BW25113 P5	<i>P5</i>	<i>gfpmut2</i>	chromosomique ori3	Kan
BW25113 P1	<i>rrnBP1</i> short	<i>gfpmut2</i>	chromosomique ori3	Kan
BW25113 bdcA	<i>bdcA</i>	<i>gfpmut2</i>	chromosomique ori3	Kan
BW25113 fliC	<i>fliC</i>	<i>gfpmut2</i>	chromosomique ori3	Kan
BW25113 pKK P1	<i>rrnBP1</i> short	<i>gfpmut2</i>	plasmidique pKK	Amp Cm
BW25113 pKK bdcA	<i>bdcA</i>	<i>gfpmut2</i>	plasmidique pKK	Amp Cm
BW25113 pKK fliC	<i>fliC</i>	<i>gfpmut2</i>	plasmidique pKK	Amp Cm
BW25113 pKK wza	<i>wza</i>	<i>gfpmut2</i>	plasmidique pKK	Amp Cm
BW25113 pUA66 fliC	<i>fliC</i>	<i>gfpmut2</i>	plasmidique pUA66	Kan

Tableau 2.3. Liste des souches utilisées dans ces travaux.

Le plasmide pKK possède deux gènes conférant une résistance antibiotique : un à l'Amp et l'autre au chloramphénicol (Cm). La position chromosomique ori3 est une position proche de l'origine de réplication du chromosome bactérien. Le promoteur *P5* est constitutif, il s'agit de celui du phage T5. L'expression des promoteurs *rrnBP1*, *bdcA*, *fliC* et *wza* permettent respectivement la synthèse d'acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr), de la protéine BdcA (protéine d'interaction avec le c-di-GPM), de la flagelline (protéine de polymérisation du flagelle) et de la protéine Wza (porine d'export de l'acide colanique). Le chapitre 4 décrit en particulier ces promoteurs.

2.1.2.2 Conservation des souches

Les souches sont conservées en cryotubes à -80°C dans 40 % de glycérol depuis une culture planctonique en phase stationnaire de croissance. Avant les expérimentations, les souches sont striées à partir des cryotubes sur boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar solide supplémenté avec l'antibiotique adéquat si nécessaire et incubées toute la nuit à 37°C. Ces boîtes se conservent ensuite à 4°C pour un maximum de deux mois. C'est à partir de ces boîtes que sont lancées les précultures lors des expérimentations.

2.1.2.3 Précultures

Les précultures s'effectuent la veille d'une expérimentation et consistent en la mise en culture des souches en piquant une colonie à partir des boîtes de Pétri dans du milieu LB liquide supplémenté avec l'antibiotique adéquat si besoin. Les précultures sont incubées toute la nuit à 37°C sous agitation à 180 rpm.

2.2 Biologie moléculaire

2.2.1 Construction des rapporteurs génétiques

Le protocole de construction des rapporteurs génétiques suivi dans ces travaux est divisé en deux grandes étapes : (i) clonage des promoteurs en vecteur plasmidique et (ii) insertion dans le chromosome d'*E. coli*. L'objectif de ces constructions est d'obtenir des souches ayant une copie du promoteur cible en fusion transcriptionnelle avec un gène rapporteur dans le chromosome bactérien.

2.2.1.1 Clonage des promoteurs en vecteur plasmidique

Le vecteur de clonage utilisé ici est un plasmide. Plus particulièrement, il s'agit d'une série de trois plasmides, dans l'ordre : pGEM[®]-T Easy, pKK et pDOCK. Le clonage dans le pGEM[®]-T Easy permet d'obtenir rapidement et facilement la séquence promotrice d'intérêt dans un vecteur. Celui dans le pKK permet de cloner le promoteur d'intérêt en fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur, ici celui de la *gfpmut2*. Le clonage dans le pDOCK permet quant à lui de préparer les insertions chromosomiques ultérieures. La Figure 2.1 présente les grandes étapes du clonage des promoteurs d'intérêt en vecteur plasmidique, détaillées dans les paragraphes suivants.

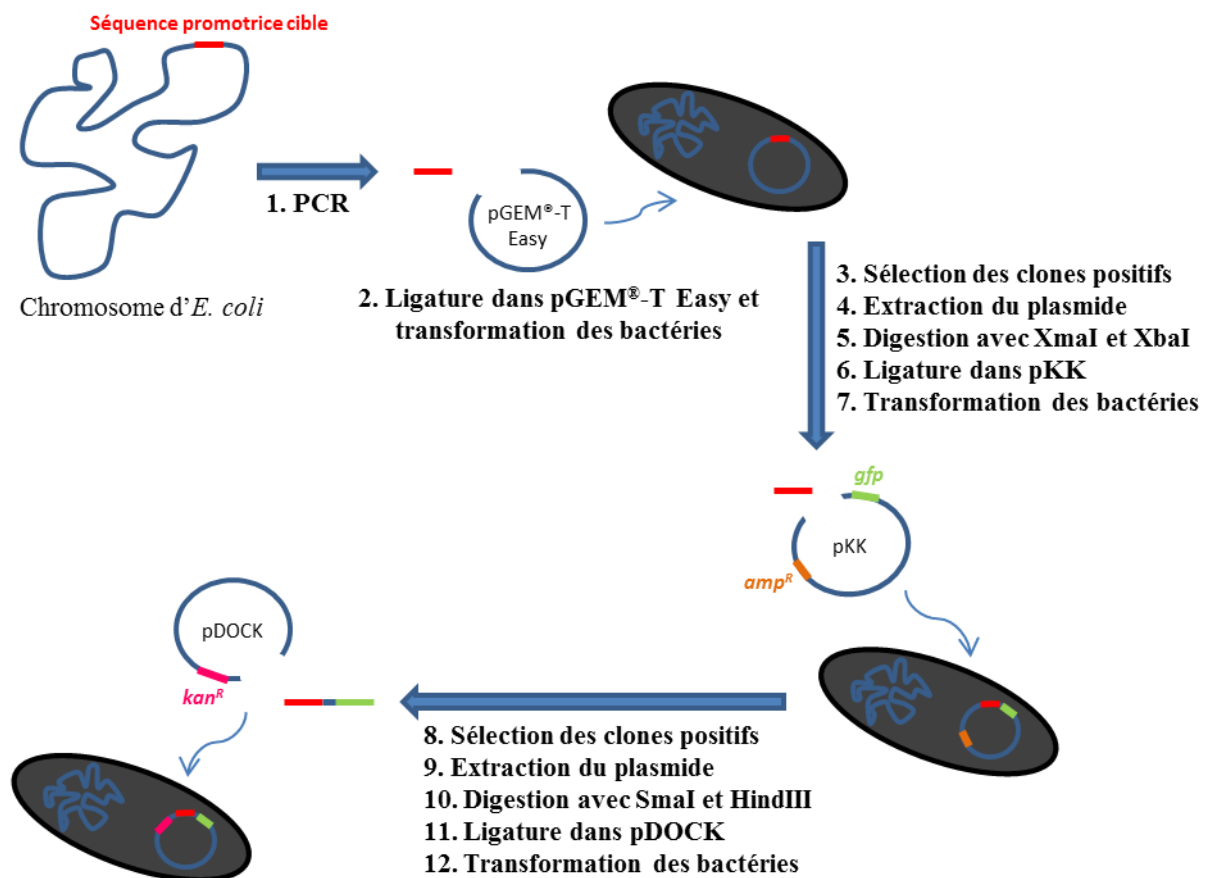


Figure 2.1. Protocole général de clonage des promoteurs d'intérêt en vecteur plasmidique.

2.2.1.1.1 Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique d'*E. coli* K-12 BW25113 a été purifié à partir d'une culture planctonique en phase stationnaire de croissance avec le kit d'extraction génomique QIAamp[®] DNA Mini Kit de Qiagen

(référence 51306). Cet ADN constitue la matrice lors de l'amplification des promoteurs d'intérêt par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

2.2.1.1.2 Conception des amorces d'hybridation pour l'amplification des promoteurs d'intérêt par PCR

L'amplification des promoteurs d'intérêt nécessite la conception d'amorces d'hybridation spécifiques à chaque promoteur. Cette conception s'effectue en trois temps : (i) détermination de la région promotrice à amplifier, (ii) sélection d'un couple d'amorces et (iii) vérification théorique de la compatibilité des amorces. Tout d'abord, il faut déterminer la région promotrice à encadrer par les amorces. Cette région doit absolument contenir les séquences d'ADN de fixation des régulateurs de transcription, les boîtes -10 et -35 d'initiation de la transcription ainsi que le nucléotide +1 de transcription. La séquence endogène du site de fixation du ribosome (RBS) n'est pas nécessaire puisqu'un RBS est apporté par le vecteur plasmidique lors des constructions. Ensuite, il faut sélectionner un couple d'amorces spécifiques qui ne s'hybrident pas ailleurs dans le génome. L'outil « Primer-BLAST » du National Center for Biotechnology Information (NCBI) permet d'établir une liste de couples d'amorces encadrant la région d'intérêt souhaitée pour amplification par PCR (Ye et al, 2012). Il faut enfin vérifier que le couple d'amorces sélectionné est convenable pour l'amplification en ce qui concerne les points suivants : taille, température de fusion (T_m), pourcentage de guanine (G) et cytosine (C), structures secondaires, homodimérisation et hétérodimérisation des amorces.

Taille. La taille des amorces doit être comprise entre 15 et 25 pb, avec une préférence aux alentours de 20 pb, et les deux amorces d'un couple doivent avoir une taille voisine.

T_m . La T_m de chaque amorce doit être comprise entre 50 et 72°C, avec une préférence aux alentours de 55°C, et les T_m des deux amorces d'un couple ne doivent pas différer de plus de 5°C.

Pourcentage de GC. Le contenu en GC des génomes du genre *Escherichia* est d'environ 50 % (Mann et Chen, 2010). La séquence des amorces conçues ici correspondant à une séquence spécifique du génome d'*E. coli*, le pourcentage de GC est en théorie aux alentours de cette valeur. Une vérification de ce pourcentage est tout de même recommandée.

Disponibilité. Les séquences des amorces doivent être disponibles, c'est-à-dire qu'il ne doit pas exister d'appariement entre les bases d'une même amorce (formation de structures secondaires de type épingle à cheveux), ni entre celles de deux amorces de même séquence (homodimérisation) ou de séquence différente (hétérodimérisation). En outre, les amorces doivent être spécifiques au site d'intérêt : elles ne doivent pas s'hybrider à une autre région du chromosome bactérien que celle souhaitée.

Une fois le couple d'amorces spécifiques déterminé, des extrémités en 5' sont finalement ajoutées aux séquences des amorces en vue de la stratégie de construction à venir : le site de restriction de l'enzyme XmaI (CCCGGG) est ajouté en extrémité 5' de l'amorce sens et celui de l'enzyme XbaI (TCTAGA) en extrémité 5' de l'amorce antisens. Lors de la conception des amorces antisens contenant la séquence de restriction de l'enzyme XbaI, il faut garder à l'esprit que cet enzyme est bloqué par les *dam* méthylations. Chez *E. coli*, les sites GATC sont *dam* méthylés de façon endogène (Marinus et Morris, 1973 ; Geier et Modrich, 1979). La séquence de restriction de XbaI étant TCTAGA, ce site de restriction ne doit donc être ni précédé des nucléotides GA, ni suivi des nucléotides TC. Les séquences des amorces ainsi que la localisation de leur site d'hybridation dans le contexte des régions promotrices d'intérêt sont disponibles respectivement en annexes 1 et 2.

2.2.1.1.3 Amplification des promoteurs d'intérêt par PCR

Les PCR d'amplification des promoteurs d'intérêt ont été réalisées avec la Taq DNA Polymerase (New England BioLabs® Inc) selon les recommandations du fournisseur en utilisant environ 20 ng d'ADN génomique matriciel pour un volume de réaction de 50 µL. Les amorces utilisées ont été conçues comme expliqué au paragraphe précédent et leur séquence est détaillée en annexe 1.

L'amplification correcte des promoteurs a été vérifiée par migration des produits de réaction de PCR sur gel d'agarose. Le gel contient 1,3 % d'agarose dans du tampon tris-HCl acétate EDTA (tampon TAE : Tris-HCL à 40 mM, acide acétique à 20 mM et EDTA à 1 mM) et du SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) dilué au 10 000^{ème}. L'électrophorèse est effectuée à 135 V pendant 25 min.

2.2.1.1.4 Clonage dans le pGEM®-T Easy

Une fois les PCR réalisées, les amplicons sont directement clonés dans le plasmide pGEM®-T Easy (Promega), selon les recommandations du fournisseur, à température ambiante pendant 1 h en utilisant un ratio molaire insert/vecteur de 1:5 pour l'étape de ligature. L'étape de transformation suivie est celle décrite par le fournisseur. La Figure 2.2 détaille la carte plasmidique du pGEM®-T Easy.

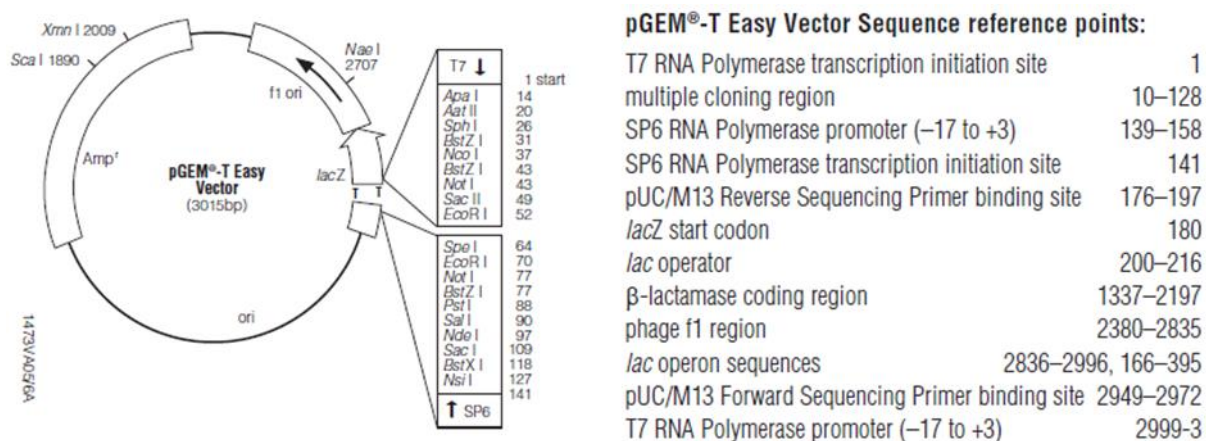


Figure 2.2. Carte plasmidique du pGEM®-T Easy (d'après le manuel « Quick protocol pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems » de Promega).

Les transformants contenant les plasmides pGEM®-T Easy comportant effectivement les promoteurs d'intérêt sont sélectionnés grâce à un criblage colomérique sur boîtes de Pétri LB/Amp/IPTG/X-Gal : les colonies blanches sont sélectionnées. Les boîtes de Pétri contiennent du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal) qui est un galactoside incolore lié à un noyau indole, substrat chromogénique et substrat de la β-galactosidase. Le plasmide pGEM®-T Easy contient la séquence du gène *lacZ* codant pour la β-galactosidase. La β-galactosidase hydrolyse le X-Gal en monosaccharides et la réaction libère la partie indolique qui forme par oxydation un composé bleu insoluble dans l'eau et précipitant au niveau du site de la réaction. Le site d'insertion de clonage dans le pGEM®-T Easy se situe dans la séquence codante du gène *lacZ* (Figure 2.2). Ainsi, si l'insertion est effective, le gène *lacZ* est interrompu et la β-galactosidase n'est pas exprimée. Ceci aboutit à des clones blancs sur boîte. Au contraire, si l'insertion est inefficace, la β-galactosidase est produite et réagit avec X-Gal : les clones sont bleus. L'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) contenu dans les boîtes de Pétri est un inducteur de l'opéron lactose, donc garant de l'activation du gène *lacZ*.

2.2.1.1.5 Clonage dans le pKK

Le clonage des promoteurs d'intérêt dans le plasmide pKK nécessite dans l'ordre les étapes suivantes : purification du vecteur receveur (plasmide pKK), purification de l'insert (promoteur d'intérêt), ligature de l'insert dans le pKK, transformation des bactéries compétentes, sélection des transformants et vérification des constructions. La Figure 2.3 détaille la carte plasmidique du pKK.

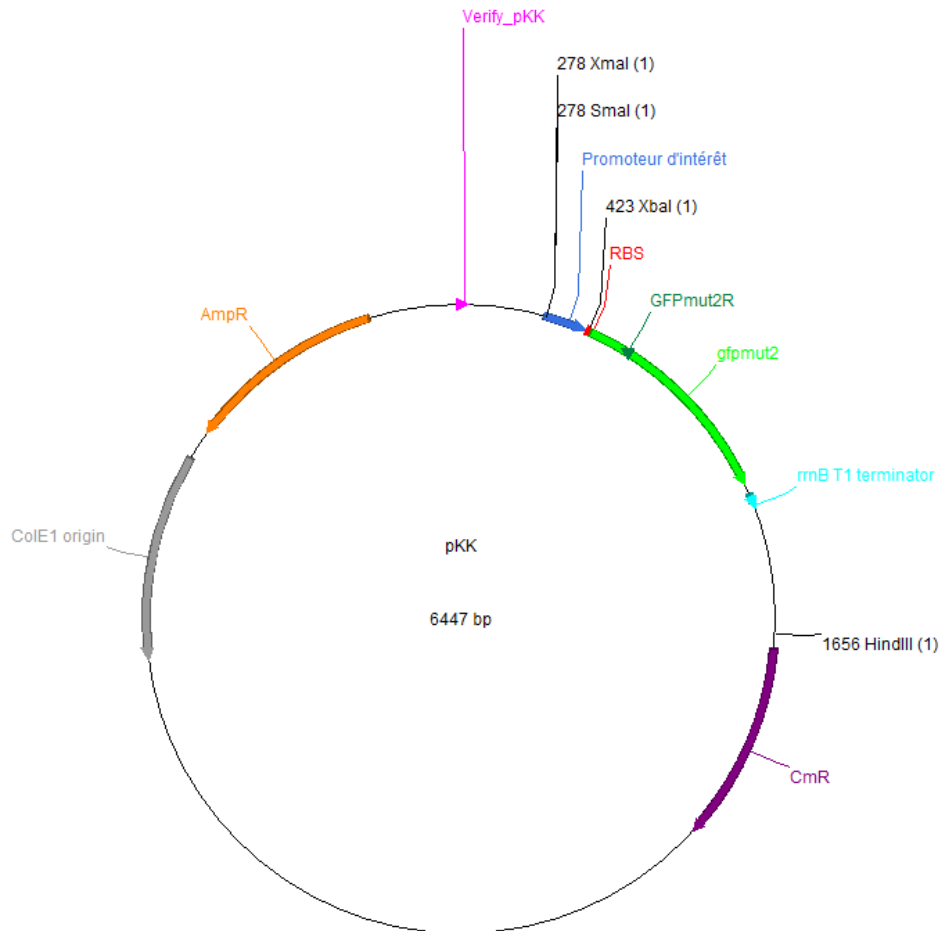


Figure 2.3. Carte plasmidique du pKK.

Ci-dessous, le vecteur receveur est le plasmide pKK et l'insert est le promoteur d'intérêt.

Purification du vecteur receveur. Le plasmide pKK est purifié à partir d'une préculture de la souche contenant ce plasmide avec le kit d'extraction plasmidique NucleoSpin® Plasmid EasyPure de Macherey-Nagel (référence 740727). Le plasmide est ensuite digéré avec le couple d'enzymes de restriction XmaI/XbaI (New England BioLabs® Inc) selon les recommandations du fournisseur en utilisant 1 µg d'ADN plasmidique pour un volume de 20 µL. Ceci permet d'ouvrir le plasmide recevant l'insert. Les produits de digestion migrent ensuite par électrophorèse (25 min à 135 V) sur gel d'agarose à 0,8 % dans du tampon TAE et du SYBR® Safe dilué au 10 000^{ème}. La bande de plasmide vers 6300 pb est découpée et purifiée avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up de Macherey-Nagel (référence 740609). La concentration d'ADN est finalement déterminée par spectrophotométrie.

Purification de l'insert. Le plasmide pGEM®-T Easy est purifié avec le kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure à partir de précultures des souches sélectionnées au paragraphe 2.2.1.1.4. Le plasmide est ensuite digéré avec le couple d'enzymes de restriction XmaI/XbaI. Ceci permet d'extraire le

promoteur d'intérêt du pGEM[®]-T Easy. Les produits de digestion migrent par électrophorèse (25 min à 135 V) sur gel d'agarose à 1,3 % dans du tampon TAE et du SYBR[®] Safe dilué au 10 000^{ème}. La bande au niveau de la taille du promoteur d'intérêt est découpée et purifiée avec le kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up. La concentration d'ADN est finalement déterminée par spectrophotométrie.

Ligature. La ligature de l'insert dans le vecteur receveur est effectuée avec l'enzyme T4 DNA Ligase (New England BioLabs[®] Inc) selon les recommandations du fournisseur à température ambiante pendant 10 min en utilisant un ratio molaire insert/vecteur de 1:3.

Transformation. La transformation des bactéries chimio-compétentes est effectuée en mélangeant le produit de la réaction de ligature aux bactéries compétentes et en incubant 10 min dans la glace. Les bactéries sont alors thermiquement choquées 30 s à 42°C, puis incubées 10 min supplémentaires dans la glace. Un volume de 1 ml de milieu de culture LB est ajouté par tube de transformation et les bactéries transformées sont cultivées 1 h à 37°C avec agitation à 180 rpm. Le protocole de préparation des bactéries chimio-compétentes est détaillé en annexe 3.

Sélection. Les bactéries transformées sont finalement étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu LB agar supplémenté en Amp et incubées toute la nuit à 37°C.

Vérification. Les clones obtenus sont vérifiés par PCR sur colonie puis par séquençage (Eurofins) des clones positifs. Les amorces utilisées pour la PCR de vérification de l'insertion dans le pKK sont le couple amorce antisens du promoteur d'intérêt et amorce Verify_pKK, celle utilisée pour le séquençage est l'amorce GFPmut2R. Leurs séquences respectives sont détaillées en annexe 1.

2.2.1.1.6 Clonage dans le pDOCK

Le clonage des promoteurs d'intérêt dans le plasmide pDOCK nécessite dans l'ordre les étapes suivantes : purification du vecteur receveur (plasmide pDOCK), purification de l'insert (promoteur d'intérêt + *gfpmut2*), ligature de l'insert dans le pDOCK, transformation des bactéries compétentes, sélection des transformants et vérification des constructions. La Figure 2.4 détaille la carte plasmidique du pDOCK.

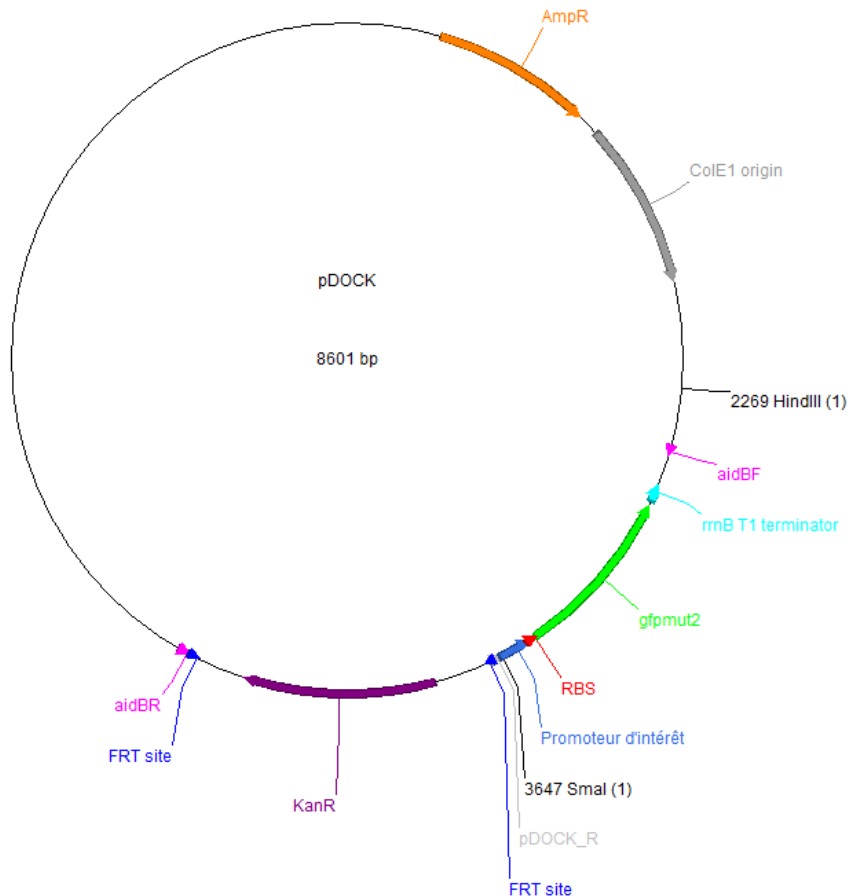


Figure 2.4. Carte plasmidique du pDOCK.

Ci-dessous, le vecteur receveur est le plasmide pDOCK et l'insert est le promoteur d'intérêt en fusion transcriptionnelle avec le gène de la *gfpmut2*.

Purification du vecteur receveur. Le plasmide pDOCK est purifié à partir d'une préculture de la souche contenant ce plasmide avec le kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure. Le plasmide est ensuite digéré avec le couple d'enzymes de restriction SmaI/HindIII (New England BioLabs® Inc) selon les recommandations du fournisseur en utilisant 1 µg d'ADN plasmidique pour un volume de 20 µL. Ceci permet d'ouvrir le plasmide recevant l'insert. Les produits de digestion migrent par électrophorèse (25 min à 135 V) sur gel d'agarose à 0,8 % dans du tampon TAE et du SYBR® Safe dilué au 10 000^{ème}. La bande de plasmide vers 7200 pb est découpée et purifiée avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. La concentration d'ADN est finalement déterminée par spectrophotométrie.

Purification de l'insert. Le plasmide pKK est purifié avec le kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure à partir de précultures des souches construites au paragraphe 2.2.1.1.5. Le plasmide est ensuite digéré avec le couple d'enzymes de restriction SmaI/HindIII. Ceci permet d'extraire l'insert du pKK. Les produits de digestion migrent par électrophorèse (25 min à 135 V) sur gel d'agarose à 1,3 % dans du tampon TAE et du SYBR® Safe dilué au 10 000^{ème}. La bande au niveau de la taille de l'insert d'intérêt est découpée et purifiée avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. La concentration d'ADN est finalement déterminée par spectrophotométrie.

Ligature. La ligature de l'insert dans le vecteur receveur est effectuée comme décrit à la section précédente (paragraphe 2.2.1.1.5).

Transformation. La transformation des bactéries chimio-compétentes est effectuée comme décrit à la section précédente (paragraphe 2.2.1.1.5).

Sélection. Les bactéries transformées sont finalement étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu LB agar supplémenté en Kan et incubées toute la nuit à 37°C.

Vérification. Les clones obtenus sont vérifiés par PCR sur colonie puis par séquençage (Eurofins) des clones positifs. Les amorces utilisées pour la PCR de vérification de l'insertion dans le pDOCK sont le couple amorce antisens du promoteur d'intérêt et amorce pDOCK_R, celle utilisée pour le séquençage est l'amorce pDOCK_R. Leurs séquences respectives sont détaillées en annexe 1.

2.2.1.2 Insertion chromosomique

Le protocole d'insertion chromosomique suivi ici est basé sur les travaux de Datsenko et Wanner (Datsenko et Wanner, 2000). L'insertion chromosomique s'effectue à partir du plasmide pDOCK. Pour cette étape, des amorces longues sont utilisées, contenant deux parties : (i) la séquence en extrémité 5' des amorces est homologue à la séquence de l'ADN du site d'insertion et (ii) celle en extrémité 3' est homologue aux séquences du plasmide flanquant l'insert. Il existe au laboratoire des amorces longues pour réaliser une insertion à six endroits différents du chromosome bactérien. Dans ces travaux, les rapporteurs ont été insérés à la position nommée ori3 du chromosome, proche de l'origine de réplcation. Les amorces longues pour une insertion en ori3 sont le couple aidBF/aidBR et leur séquence est disponible en annexe 1. La Figure 2.5 présente le protocole général d'insertion chromosomique (détaillé dans les paragraphes suivants) et la Figure 2.6 montre la région chromosomique ori3 après insertion.

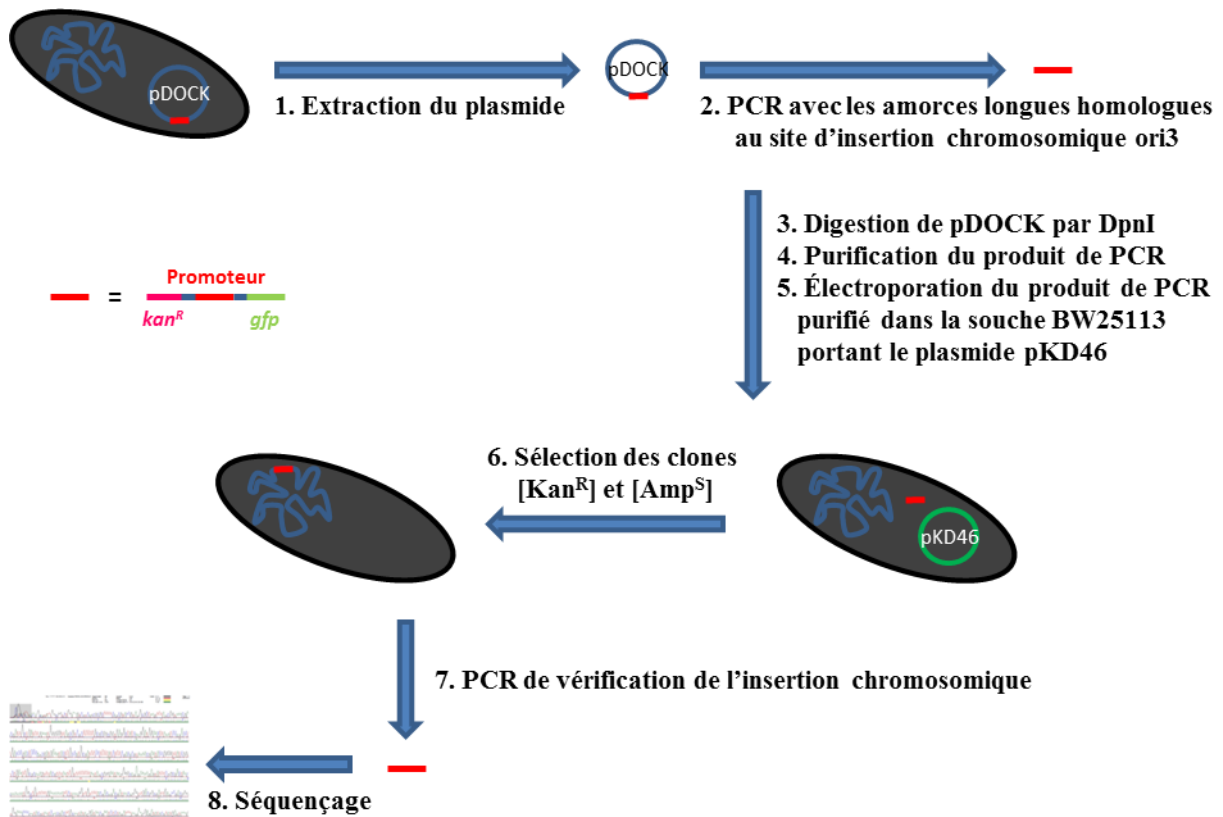


Figure 2.5. Protocole général d'insertion chromosomique.

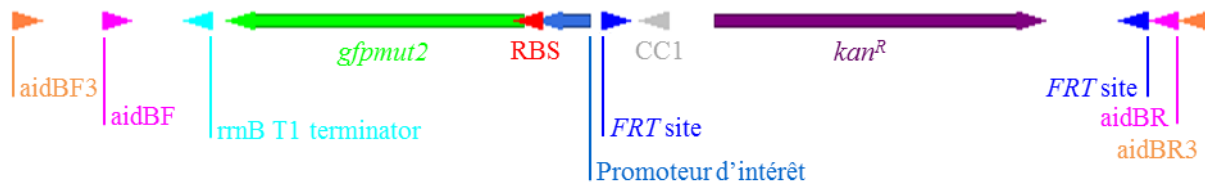


Figure 2.6. Carte de la région chromosomique ori3 après insertion.

2.2.1.2.1 Extraction plasmidique

L'extraction plasmidique du pDOCK est effectuée à partir de précultures des souches construites au paragraphe 2.2.1.1.6 avec le kit NucleoSpin® Plasmid EasyPure.

2.2.1.2.2 PCR

Les PCR d'amplification des inserts d'intérêt ont été réalisées avec la Taq DNA Polymerase selon les recommandations du fournisseur en utilisant environ 50 ng d'ADN plasmidique matriciel pour un volume de 50 µL. Les amorces longues utilisées sont le couple aidBF/aidBR et leur séquence est détaillée en annexe 1.

2.2.1.2.3 Digestion de pDOCK par DpnI

La digestion du plasmide pDOCK matriciel présent dans les tubes de réaction de PCR s'effectue en ajoutant 1 µL de DpnI (New England BioLabs® Inc) par 200 µL de volume réactionnel et en incubant 1 h à 37°C. L'enzyme DpnI coupe au niveau des adénines méthylées incluses dans les séquences d'ADN GATC. La synthèse d'ADN *in vivo* (bactéries) fait intervenir des adénines méthylées qui ne sont pas présentes en synthèse *in vitro* (PCR). Cette étape permet donc de dégrader le plasmide pDOCK.

2.2.1.2.4 Purification du produit de PCR

La purification du produit de PCR est effectuée en deux étapes : migration sur gel d'agarose et purification du gel. Le produit de PCR est déposé sur gel d'agarose à 0,8 % dans du tampon TAE contenant du SYBR® Safe dilué au 10 000^{ème} et l'électrophorèse est effectuée à 135 V pendant 25 min. La bande au niveau de la taille de l'insert d'intérêt est découpée et purifiée avec le kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. La concentration d'ADN est déterminée par spectrophotométrie.

2.2.1.2.5 Electroporation

L'électroporation est effectuée en ajoutant 100 ng de produit de PCR purifié aux bactéries électro-compétentes portant le plasmide pKD46 et en appliquant un choc à 1800 V. Un volume de 1 mL de milieu de culture SOC est ajouté par tube d'électroporation et les bactéries électroporées sont cultivées 3 h à 37°C avec agitation à 180 rpm. C'est pendant cette période d'incubation que les recombinaisons homologues entre le plasmide pDOCK et le chromosome bactérien sont opérées par la λ Red recombinase. En effet, lors de la préparation des bactéries électro-compétentes, l'opéron codant pour la λ Red recombinase situé sur le plasmide pKD46 a été induit par ajout de L-arabinose. Le protocole de préparation des bactéries électro-compétentes portant le plasmide pKD46, la carte plasmidique de pKD46 et la composition du milieu de culture SOC sont détaillés respectivement en annexes 4 et 5.

2.2.1.2.6 Sélection

Les bactéries électroporées sont étalées sur boîte de Pétri contenant du milieu LB agar supplémenté en Kan et incubées toute la nuit à 37°C. Quelques clones sont ensuite remis en culture liquide LB + Kan et incubés toute la nuit à 37°C avec agitation à 180 rpm. Ces derniers sont finalement étalés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB agar supplémenté en Kan et sur d'autres boîtes supplémentées en Amp. Les boîtes LB + Kan sont incubées toute la nuit à 37°C alors que les boîtes LB + Amp sont incubées à 30°C. Cette étape permet de tester l'absence du plasmide pKD46, c'est-à-dire de sélectionner les souches ayant perdu ce dernier par ségrégation générationnelle. En effet, le plasmide pKD46 porte une résistance à l'Amp alors que l'insert comporte une résistance à la Kan ; il faut donc sélectionner les clones résistants à la Kan (phénotype [Kan^R]) et contre-sélectionner ceux résistants à l'Amp (c'est-à-dire sélectionner ceux sensibles à l'Amp de phénotype [Amp^S]). Les clones finalement sélectionnés sont donc ceux de phénotype [Kan^R] et [Amp^S]. La carte plasmidique de pKD46 est détaillée en annexe 4.

2.2.1.2.7 Vérification des constructions

Les clones obtenus sont vérifiés par PCR sur colonie puis par séquençage (Eurofins). Les amorces utilisées pour la PCR de vérification de l'insertion en position ori3 du chromosome sont le couple aidBF3/aidBR3. Celle utilisée pour le séquençage est l'amorce CC1. Leur séquence respective est détaillée en annexe 1.

2.2.2 Délétion du gène de résistance à la kanamycine (*kan^R*)

Le protocole de délétion du gène de résistance à la kanamycine (*kan^R*) suivi dans ces travaux est issu des travaux de Datsenko et Wanner (Datsenko et Wanner, 2000) et est adapté de celui décrit par Gene Bridges dans le manuel « FLPe expression plasmids for *E. coli* ». Dans nos constructions, le gène *kan^R* est flanqué de deux séquences *FRT* qui sont les sites cibles de la recombinase FLP. Cette dernière effectue une recombinaison génétique entre les deux sites *FRT*, ce qui aboutit à l'excision du gène *kan^R* de la séquence d'ADN. Plus de détails sur le principe de recombinaison site-spécifique *via* la technologie FLP/*FRT* est donné au chapitre 4. La Figure 2.7 présente le protocole général (détaillé dans les paragraphes suivants) de délétion du gène *kan^R* par la technologie de recombinaison site-spécifique FLP/*FRT* et la Figure 2.8 montre la région chromosomique ori3 où se situe l'insert après délétion du gène *kan^R*.

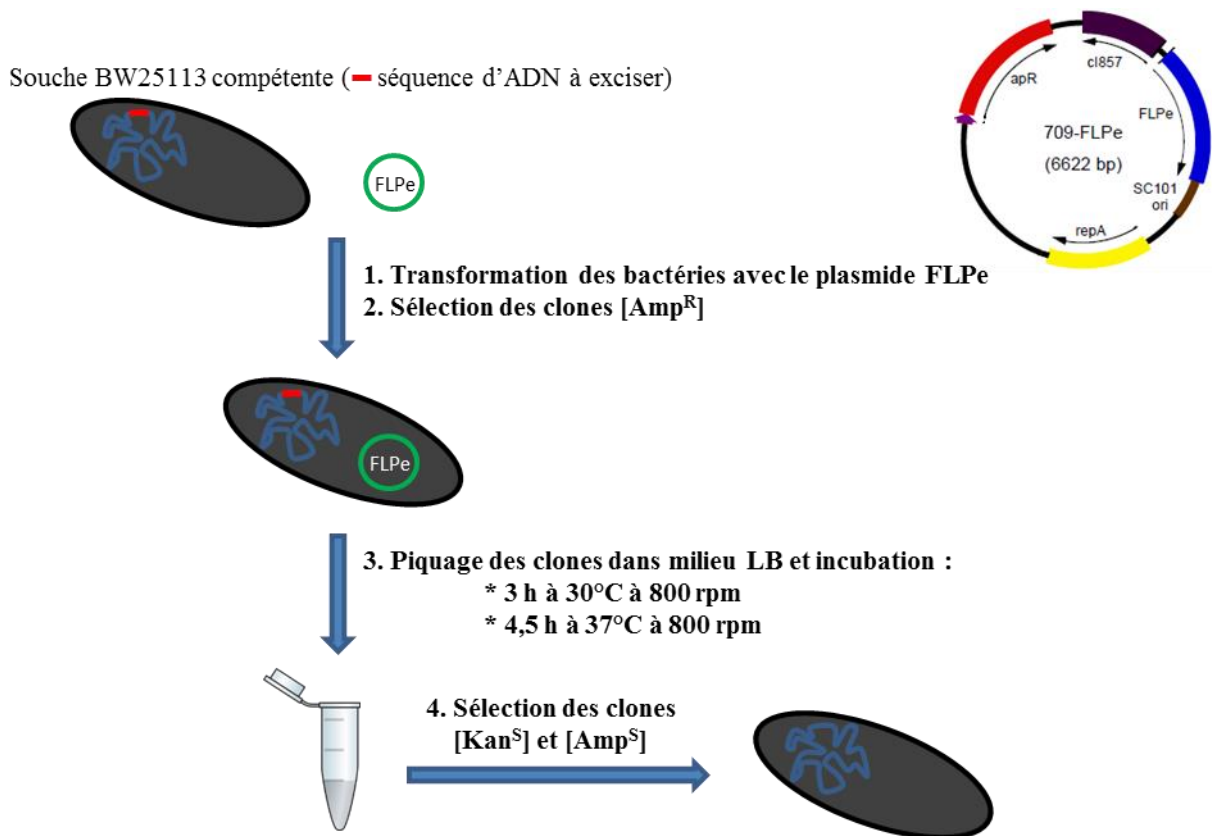


Figure 2.7. Protocole général de délétion du gène *kan^R* par la technologie de recombinaison site-spécifique FLP/*FRT*. La carte plasmidique de 709-FLPe est issue du manuel technique « FLPe expression plasmids for *E. coli* » de Gene Bridges. Les caractéristiques du plasmide sont les suivantes : SC101 ori est l'origine de répllication température-dépendante pSC101, *fpe* est le gène codant pour la recombinase FLPe, *cl857* est le gène codant pour le répresseur température-dépendant *cl857*, *repA* est un gène codant pour une protéine de répllication du plasmide et *apR* est un gène conférant une résistance à l'ampicilline.



Figure 2.8. Carte de la région chromosomique *ori3* où se situe l'insert après délétion du gène *kan^R*.

2.2.2.1 Transformation avec le plasmide 709-FLPe et sélection des clones résistants à l'Amp

Les bactéries de la souche BW25113 contenant le gène *kan^R* à exciser du chromosome sont rendues compétentes (protocole détaillé en annexe 3) et sont ensuite transformées par choc thermique avec 1 μ L de plasmide 709-FLPe concentré à 100 ng/ μ L. Après transformation, les bactéries sont incubées 2,5 h à 30°C dans du milieu LB avec agitation à 180 rpm. La culture est ensuite étalée sur boîte de Pétri LB supplémenté en Amp et incubée toute la nuit à 30°C. Cette étape permet de sélectionner les clones résistants à l'Amp (phénotype [Amp^R]), c'est-à-dire ceux ayant effectivement reçu le plasmide 709-FLPe : celui-ci porte une résistance à l'Amp et se réplique à 30°C (Figure 2.7).

2.2.2.2 Excision du gène *kan^R* par induction de la FLPe recombinase

Après transformation et sélection, quelques clones sont repiqués séparément dans du milieu LB et incubés d'abord 3 h à 30°C, puis 4,5 h à 37°C, avec agitation à 800 rpm dans les deux cas. Pendant la première période d'incubation à 30°C, le plasmide est répliqué et donc amplifié avec la croissance bactérienne, mais la recombinase FLPe n'est pas exprimée. Pendant la seconde période d'incubation à 37°C, le plasmide n'est plus répliqué mais la recombinase FLPe est exprimée et la délétion du gène *kan^R* est effectuée. En effet, le gène *flpe* codant pour la recombinase FLPe est sous le contrôle du promoteur λ R qui est lui-même réprimé par *cl857*. L'expression du répresseur *cl857* est température-dépendante : elle est induite à 30°C et réprimée à 37°C.

2.2.2.3 Sélection des clones sensibles à l'Amp et à la Kan

Les cultures sont finalement étalées sur boîte de Pétri LB sans antibiotiques toute la nuit à 37°C. Le lendemain une trentaine de clones sont repiqués sur trois boîtes de Pétri LB, dans l'ordre : {LB + Kan}, {LB + Amp} et {LB sans antibiotiques}. Les clones sensibles aux antibiotiques – de phénotype [Kan^S] et [Amp^S] – sont sélectionnés et conservés. Cette étape permet de sélectionner les clones qui ont subi la délétion du gène *kan^R* (phénotype [Kan^S]) et qui ont perdu le plasmide 709-FLPe ([Amp^S]).

2.3 Fluorimétrie

2.3.1 Préparation des microplaques

La fluorimétrie (spectrofluorimétrie) a été utilisée dans les expériences en microplaque pour le suivi de la croissance planctonique des souches et l'évaluation des intensités de fluorescence associées aux promoteurs étudiés. Les microplaques utilisées dans ces travaux sont les plaques pour culture cellulaire à 96 puits et à fond plat de marque Falcon[®] distribuées par Life Sciences (référence 353072). Deux microplaques sont utilisées à chaque expérience : l'une permettant la dilution des échantillons (appelée plaque de dilution), l'autre constituant la plaque qui est lue par le fluorimètre (appelée plaque de lecture). Sous PSM, 200 μ L de précultures bactériennes sont déposés dans les deux premières colonnes de la plaque de dilution. La dilution est ensuite effectuée de manière automatisée par le robot Beckman Coulter[™] Biomek[®] 3000 selon le protocole programmé. La Figure 2.9 présente un schéma du protocole de dilution au 10 000^{ème} opéré par le robot. Le milieu de culture utilisé pour la dilution lors des expériences de fluorimétrie est le milieu M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA.

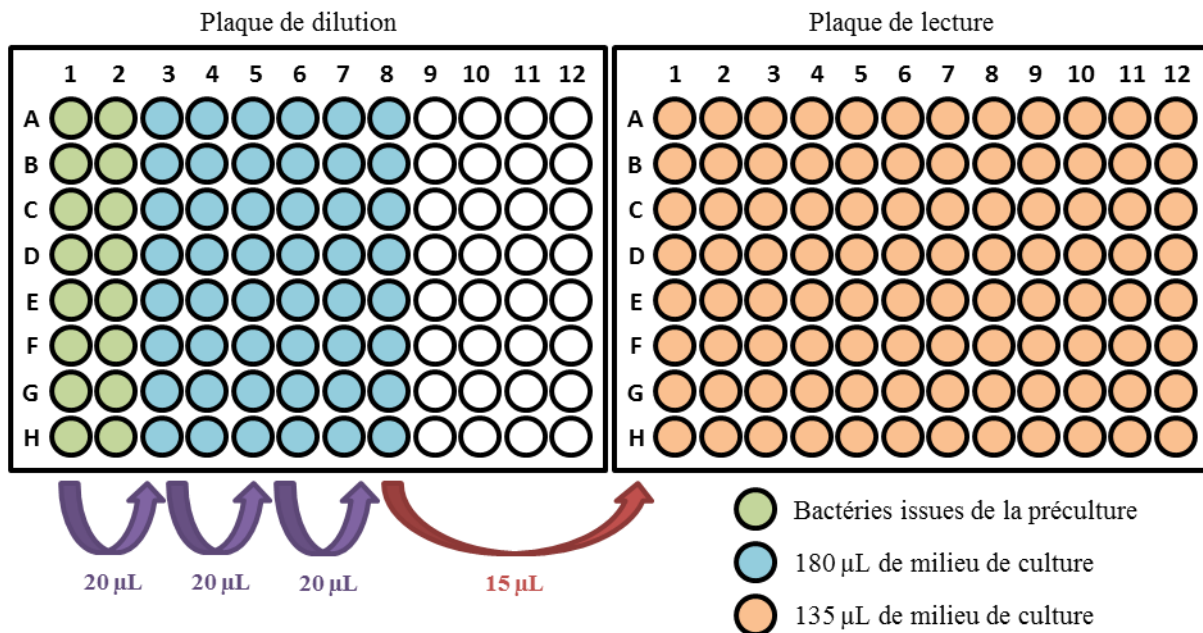


Figure 2.9. Schéma du programme de dilution au 10 000^{ème} en microplaque opéré par le robot. Le robot effectue quatre dilutions successives au dixième : trois dans la plaque de dilution et la dernière dans la plaque de lecture. La plaque de lecture contient ainsi des bactéries de la préculture diluées au 10 000^{ème}.

2.3.2 Lecture des microplaques

Le fluorimètre utilisé dans ces travaux est le lecteur de plaque Infinite F200[®] PRO de la marque TECAN[®] couplé au logiciel Magellan. Il effectue en alternance une mesure de l'absorbance à 610 nm – référée comme densité optique à 610 nm (DO_{610nm}) – et une mesure de l'intensité de fluorescence du fluorophore étudié – ici une protéine fluorescente verte – pour chaque puits de la microplaque. Un tel cycle de mesures est effectué toutes les 6 min et 50 s pendant la totalité de la durée de l'expérience (16 heures). En effet, cet intervalle de temps correspond à la période de lecture de la plaque (1 min 50 s), suivie d'une période d'incubation/agitation de 5 min. La longueur d'onde d'excitation est de 485 nm et un gain manuel de 70 ou de 100 est appliqué. La lecture est opérée à 37°C pendant toute la durée de l'expérience.

2.3.3 Analyse des données de fluorimétrie

Les données obtenues en fluorimétrie ont été analysées avec le script développé dans le logiciel MATLAB[®] par Elisa Brambilla lors de sa thèse. Plus de détails sur cette analyse sont donnés dans le chapitre 4 (paragraphe 4.3.1).

2.4 Microfluidique

2.4.1 Développement de biofilms en microfluidique

2.4.1.1 Montage du système

Le système microfluidique est assemblé stérilement sous PSM à flux laminaire. Le montage (Figure 2.10) permet la connexion des éléments entre eux par des tuyaux en silicone et des connecteurs (droits ou dits en « Y »). Les éléments sont connectés dans l'ordre suivant : bouteille d'entrée, tuyaux à crans d'arrêt de la pompe péristaltique, pièges à bulles, cellule de flux et bouteille de sortie. La pompe

péristaltique utilisée dans ces travaux est la pompe « IP High Precision Multichannel Pump » (ISMATEC[®], modèle à 4 canaux et à 8 galets). Deux modèles de cellule de flux ont été utilisés : (i) une cellule de flux à 3 canaux de dimensions 1 x 4 x 40 mm chacun, fabriquée par l'Université de Copenhague et l'Université Technique du Danemark (Tolker-Nielsen et Sternberg, 2011) et (ii) une cellule de flux à 6 canaux de dimensions 0,4 x 3,8 x 17 mm chacun, fabriquée par ibidi[®] (ibidi[®] uncoated μ -Slide VI^{0.4}, référence 80601, www.ibidi.com). La Figure 2.10 présente un diagramme schématique de montage du système microfluidique.

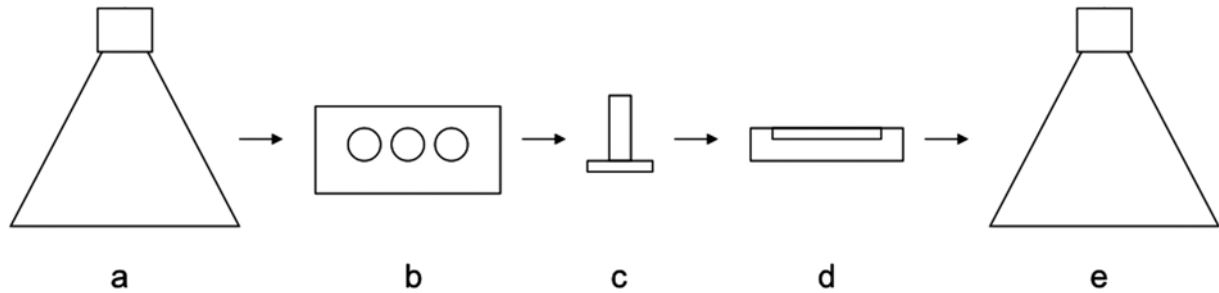


Figure 2.10. Schéma de l'assemblage des pièces du système microfluidique (Crusz et al, 2012). Le système comporte dans l'ordre une bouteille de milieu (a), une pompe péristaltique (b), un piège à bulles (c), une cellule de flux (d) et une bouteille de déchets (e). Les différents éléments sont connectés entre eux par des tuyaux en silicone flexibles représentés par les flèches.

2.4.1.2 Stérilisation du système

La stérilisation du système s'effectue par deux procédés successifs : autoclavage et javellisation. Le premier procédé est la stérilisation des pièces du système par autoclave. Un cycle de 20 min à 121°C est opéré. Les pièces indépendantes stérilisées sont ensuite assemblées sous PSM à flux laminaire. Le second procédé est la javellisation des pièces assemblées par un cycle de circulation d'hypochlorite de sodium (NaClO) à 0,5 % (v/v) à travers le système. Le cycle de javellisation est inspiré des travaux de la littérature, notamment ceux de Tolker-Nielsen et Sternberg (Tolker-Nielsen et Sternberg, 2011). La solution de NaClO est tout d'abord introduite dans le système par la pompe jusqu'aux pièges à bulles à débit maximal pendant 20 min. Elle est ensuite pompée jusqu'à la bouteille de sortie à débit maximal pendant 20 min. La pompe est alors coupée et la solution de NaClO est incubée dans le système à température ambiante pendant un minimum de 2 h. Le système est ensuite rincé à l'eau stérile.

2.4.1.3 Rinçage du système

Après le cycle de javellisation, le système est vidé de la solution de NaClO, puis rincé avec de l'eau stérile à débit maximal jusqu'à le remplir complètement. L'eau stérile est ensuite pompée toute la nuit à travers le système à un débit de 50 μ L/min. Au total, un volume d'eau stérile au moins deux fois équivalent à celui de NaClO utilisé pendant l'étape de javellisation doit passer à travers le système lors du rinçage.

2.4.1.4 Inoculation du système

Après rinçage du système, celui-ci est complètement vidé et l'eau de lavage est remplacée par le milieu de culture stérile. L'inoculation des chambres fluidiques est faite par la suite. Elle est effectuée en amont de la cellule de flux de manière traditionnelle directement à travers les tuyaux et au plus près de l'entrée des chambres, à l'aide d'une aiguille. Le choix de la stratégie d'inoculation est détaillé au chapitre 3. Un volume minimal de 200 μ L est inoculé. La densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) de

l'inoculum est de 0,01. L'inoculum correspond à la dilution au centième d'une préculture de la nuit reprise 45-50 min à 37°C avec agitation à 180 rpm, puis diluée en milieu LB à une DO_{600nm} de 0,01.

2.4.1.5 Croissance des biofilms au sein du système

Une fois les chambres inoculées, l'étape d'adhésion des biofilms est permise en laissant le système à température ambiante pendant 1 h. Le flux est ensuite repris par remise de la pompe en route. Les biofilms sont dès lors incubés pendant trois jours à 22°C dans du milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA et introduit à un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

2.4.2 Marquage des biofilms développés en microfluidique

Le marquage des biofilms développés en microfluidique consiste en la mise en évidence de la biomasse bactérienne (fluorophores SYTO9 et SYTO61), de la biomasse associée à la matrice extracellulaire (fluorophores ConA/Alexa Fluor[®] 488 et WGA/Alexa Fluor[®] 633) et/ou de la biomasse bactérienne non viable (fluorophore IP) au sein des biofilms. Le processus de marquage est effectué en trois étapes : (i) injection des fluorophores dans les chambres fluidiques (volume de 400 μL) après arrêt de la pompe, (ii) incubation de 30 min à 22°C et (iii) lavage de 15 min à 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Le Tableau 2.4 présente les propriétés spectrales ainsi que les concentrations des marqueurs utilisés dans ces travaux.

Fluorophores	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$)	RQ	Concentration
SYTO9	485	498	> 50 000	0,58	7,5 μM
SYTO61	628	645	ND	0,18	5 μM
ConA/Alexa Fluor [®] 488	495	519	73 000	0,92	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
WGA/Alexa Fluor [®] 633	632	647	159 000	ND	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
IP	535	617	ND	ND	30 μM

Tableau 2.4. Propriétés spectrales et concentrations des marqueurs utilisés dans ces travaux. λ_{abs} est la longueur d'onde maximale d'absorption et λ_{em} est la longueur d'onde maximale d'émission. ϵ est le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde maximale d'absorption. RQ est le rendement quantique. ND indique que la caractéristique est non déterminée.

2.4.3 Expériences de dispersion en microfluidique

2.4.3.1 Préparation de l'acide *cis*-2-décénoïque (CDA)

L'acide *cis*-2-décénoïque (CDA) utilisé dans ces travaux lors des expériences de dispersion est produit par Chemodex (référence D0249). Une fois la molécule réceptionnée, elle est solubilisée à 11 mM dans une solution aqueuse à 70 % (v/v) d'éthanol pur, aliquotée dans des fioles en verre et stockée à 4°C. Lors des expériences de dispersion, la solution est diluée au centième dans le milieu de culture des biofilms. La concentration finale de CDA est donc de 110 μM .

2.4.3.2 Epreuves de dispersion

Les expériences de dispersion en microfluidique, appelées épreuves de dispersion (Figure 2.11), sont effectuées au troisième jour de développement des biofilms, après 72 h de croissance. Une série d'acquisitions d'images en z par microscopie confocale à balayage laser (CLSM) est tout d'abord réalisée avant l'épreuve de dispersion, dans quatre régions distinctes du biofilm de chaque canal. Ces images sont référencées comme « avant épreuve ». L'épreuve de dispersion consiste ensuite en trois étapes successives : (i) injection, (ii) incubation et (iii) lavage. La pompe péristaltique est coupée avant l'étape d'injection ; celle-ci consiste en l'ajout de 400 μL de la solution testée (CDA ou contrôle) au sein de la chambre fluidique à travers un micro-septum (chapitre 3, section 3.1.2). Dans le cas de

l'injection d'étude, la solution contient 110 μM de CDA solubilisé dans le milieu de culture des biofilms contenant 0,7 % (v/v) d'éthanol. Dans le cas de l'injection contrôle, il s'agit uniquement de milieu de culture contenant 0,7 % (v/v) d'éthanol. L'étape d'incubation qui suit l'injection dure 1 h et s'effectue à 22°C. L'étape de lavage consiste enfin en la reprise de l'alimentation en milieu de culture par la pompe à un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ pendant 15 min. Une série d'acquisitions d'images en z est finalement réalisée après l'épreuve de dispersion : quatre régions distinctes du biofilm de chaque canal. Ces images sont référencées comme « après épreuve ». Les acquisitions d'images en z sont effectuées par CLSM, comme décrit ci-après au paragraphe 2.5.2. Les quatre régions « avant épreuve » et les quatre régions « après épreuve » du biofilm d'un canal sont les mêmes si l'épreuve de dispersion est réalisée avec repositionnement des échantillons par la stratégie de recouvrement des régions d'intérêt (ROI), elles sont différentes si l'épreuve est réalisée sans repositionnement. Dans ce dernier cas les régions sont aléatoirement déterminées. La stratégie de repositionnement par recouvrement des ROI est décrite au chapitre 5 (paragraphe 5.2.1.4).

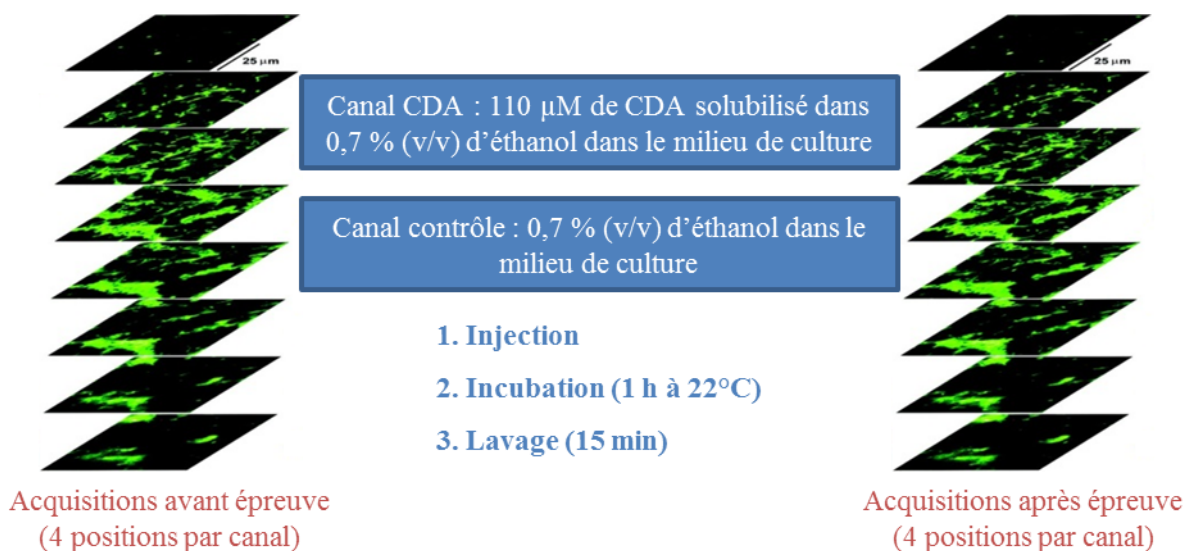


Figure 2.11. Protocole général des épreuves de dispersion.

2.5 Imagerie

Les techniques d'imagerie ont été utilisées dans les expériences en microfluidique pour la caractérisation des biofilms d'*E. coli* et lors des épreuves de dispersion.

2.5.1 Microscopie à épifluorescence

Les images de microscopie à épifluorescence ont été acquises avec un microscope Ti-Eclipse Nikon, muni d'un objectif à air 60X/ NA 0,7 et d'une caméra EMCCD ANDOR[®] Luca-S. La source d'excitation est une source polychromatique (type LEDs) SPECTRA X7 Lumencor[®]. Deux diodes distinctes ont été utilisées selon le fluorophore ciblé : soit la diode émettant à 476 ± 14 nm (excitation FITC), soit celle émettant à 630 ± 10 nm (excitation Cy5). Un même miroir dichroïque et un filtre d'émission multibandes adaptés ont été utilisés pour réaliser les deux excitations. Les bandes passantes en émission suivant les excitations FITC et Cy5 sont respectivement de 509 ± 7 , 587 ± 15 , 708 ± 47 nm et de 708 ± 47 nm.

2.5.2 Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

Les images de CLSM ont été acquises avec les microscopes confocaux à balayage laser inversés Leica SP2 ou SP8 (LEICA Microsystems, Germany).

SP2. Pour le confocal SP2, les images sont uni-directionnellement scannées à 400 Hz avec l'objectif à immersion à huile 63X/ NA 1,32 Leica HCX PL APO CS. Les images scannées résultent en une pile d'images dont le pas en z est de 0,3 μm . La taille des pixels des images est de 232 nm pour des images contenant 1024 x 1024 pixels, ce qui représente une surface totale scannée de 238 x 238 μm . Le confocal SP2 est équipé de tubes photomultiplicateurs (PMT).

SP8. Pour le confocal SP8, les images sont bi-directionnellement scannées à 400 Hz avec l'objectif à immersion à huile 100X/ NA 1,4 Leica HCX APO. Les images scannées résultent en une pile d'images dont le pas en z est de 0,5 μm . La taille des pixels des images est soit de 180,2 nm pour des images contenant 1024 x 1024 pixels, soit de 90,1 nm pour des images contenant 2048 x 2048 pixels, ce qui représente une surface totale scannée de 184,52 x 184,52 μm . Le confocal SP8 est équipé de détecteurs hybrides (HyD).

Les images sont dans les deux cas acquises en 8 bits. Le Tableau 2.5 recense les longueurs d'onde d'excitation des fluorophores utilisés dans ces travaux en fonction des longueurs d'onde de leur spectre d'émission, ainsi que le laser et le pourcentage de l'intensité du laser utilisés, pour les confocaux SP2 et SP8.

Fluorophores	SP2		SP8	
	λ_{ex} (nm)	Laser (%)	λ_{ex} (nm)	Laser (%)
Emettant dans le vert	488	Argon (19 %)	488	Argon (20 %)
Emettant dans le rouge	633	Argon (19 %)	633	Argon (20 %)

Tableau 2.5. Longueurs d'onde d'excitation des fluorophores avec les lasers des confocaux SP2 et SP8. λ_{ex} est la longueur d'onde d'excitation utilisée (en nm).

2.5.3 Analyse d'images

Les images obtenues par microscopie ont été traitées avec les logiciels *open source* Icy, ImageJ, COMSTAT (Heydorn et al, 2000 ; Vorregaard, 2008 ; <http://www.comstat.dk>) et/ou avec la nouvelle macro BIAM développée dans ImageJ par Bertrand Cinquin du LBPA dans le cadre de ces travaux. Les caractéristiques des biofilms calculées par COMSTAT sont multiples et sont décrites dans le manuel « COMSTAT 2.1 MANUAL » (version de juillet 2015). En particulier, celles considérées dans ces travaux sont la biomasse ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), les épaisseurs moyenne et maximale (μm) ainsi que l'aire de recouvrement par couche (μm^2) des biofilms. L'outil BIAM (Biofilm Intensity and Architecture Measurement) développé dans ce travail est présenté en détail dans le chapitre 5 (article). Il permet de calculer les intensités de fluorescence totales et moyennes du fluorophore étudié dans le biofilm en même temps que les paramètres structuraux du biofilm tels que le biovolume (μm^3), l'épaisseur maximale (μm), les aires de recouvrement par couche (μm^2) ou les interfaces extérieure et intérieure du biofilm (μm^2), correspondant respectivement à la surface du biofilm en contact avec le milieu extérieur et à celle en contact avec les zones « vides » à l'intérieur du biofilm.

2.6 Statistique

La significativité des résultats a été évaluée avec le test paramétrique d'analyse de variance à un facteur ANOVA (analysis of variance) du logiciel Excel.

3. Développement et caractérisation de biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique

La première partie de mes travaux de thèse a consisté en la mise au point et l'optimisation d'un système microfluidique pour la croissance et la caractérisation des biofilms d'*E. coli*. En effet, à mon arrivée au laboratoire, la thématique des biofilms était nouvelle et la technologie de développement de biofilms en microfluidique n'existait pas. L'objectif de ce chapitre est donc de présenter la stratégie mise en œuvre pour cultiver, observer, marquer et caractériser les biofilms d'*E. coli* étudiés. En particulier, le chapitre explique d'abord la mise au point d'un système d'étude pour le développement des biofilms. Il décrit ensuite le choix des conditions dans lesquelles les biofilms sont cultivés au sein du système. Il termine enfin sur l'optimisation des conditions de marquage des biofilms développés et leur caractérisation.

3.1 Conception du système d'étude

3.1.1 Système microfluidique initial

Le système d'étude mis en place est un système microfluidique tel que celui initialement décrit par Christensen et collaborateurs en 1998 (Christensen et al, 1998). Il consiste en une connexion en série par des tuyaux en silicone des éléments suivants, dans l'ordre : (i) une bouteille d'entrée contenant le milieu de culture, (ii) une pompe péristaltique, (iii) un piège à bulles, (iv) une cellule de flux et (v) une bouteille de sortie pour la récolte du milieu (Figure 3.1).

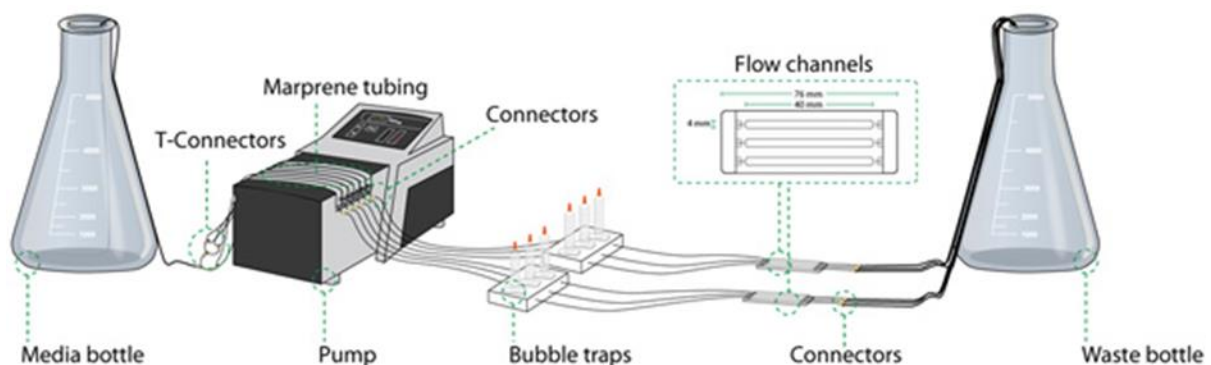


Figure 3.1. Montage du système microfluidique (Nielsen et al, 2011).

Tout d'abord, la bouteille d'entrée contient le milieu de culture qui alimente les biofilms. La pompe péristaltique conditionne la circulation du milieu à travers le système. Le piège à bulles intercepte les éventuelles bulles d'air formées dans le système en amont de la cellule de flux. Par poussée d'Archimède, les bulles d'air entrant dans le piège à bulles remontent dans la partie supérieure de celui-ci où l'air peut être accumulé. Il est fondamental d'éviter la pénétration de bulles dans la cellule de flux car elles peuvent affecter l'architecture des biofilms (Crusz et al, 2012). La formation de bulles peut être la conséquence de variations de température du milieu liquide, de variations de pression dues aux changements de diamètre des tuyaux ou de l'action même de la pompe péristaltique. La cellule de flux constitue le bioréacteur. Elle est composée de plusieurs chambres ou canaux fluidiques dans lesquels sont développés les biofilms. Enfin, la bouteille de sortie récupère les déchets du système, ce qui inclut milieu souillé, déchets métaboliques, bactéries en suspension et biofilm détaché.

3.1.2 Système microfluidique modifié

En vue des expériences ultérieures, trois ajouts ont été apportés au système microfluidique décrit au paragraphe 3.1.1 : (i) un système de purge, (ii) un système d'injection et (iii) un système de prélèvement (Figure 3.2) :

- i. Le système de purge a été ajouté en amont des pièges à bulles. Il permet un changement rapide de milieu sans impacter la partie aval du système et donc sans perturber les structures des biofilms développés au sein de la cellule de flux. Il consiste en un dispositif de déviation des tuyaux en aval de la pompe péristaltique, permettant une sortie du fluide.
- ii. Le système d'injection a été positionné en amont de la cellule de flux. Il permet d'inoculer le système et/ou d'injecter les liquides d'étude dans les chambres fluidiques. Il consiste en un micro-septum placé à l'entrée de chaque chambre (Figure 3.2B).
- iii. Le système de prélèvement a été introduit en aval de la cellule de flux. Il permet la collecte d'échantillons issus des chambres fluidiques, ce qui peut se révéler intéressant dans le cadre de certaines études. Il consiste en une déviation du flux en sortie des chambres vers des seringues stériles.

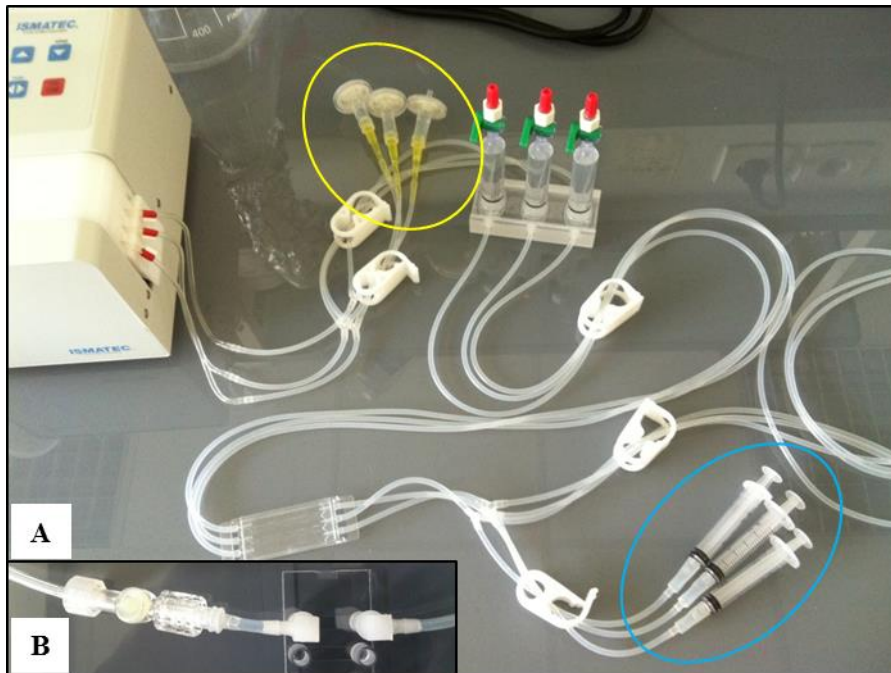


Figure 3.2. Modifications apportées au montage microfluidique. (A) Système de purge en amont des pièges à bulles (encerclement jaune) et système de prélèvement en aval de la cellule de flux (encerclement bleu). (B) Système d'injection en amont de la cellule de flux.

La collecte d'échantillons sortant des chambres fluidiques est recommandable dans le cadre de l'étude de la biomasse dispersée de biofilms. En effet, les cellules dispersées présentent une physiologie et un profil d'expression génique distincts de ceux des cellules au sein du biofilm et de ceux des cellules planctoniques en phases exponentielle et stationnaire de croissance (Chua et al, 2014 ; Guilhen et al, 2016).

3.1.3 Sélection de la cellule de flux

Les cellules de flux sont un outil utilisé fréquemment pour l'étude de biofilms. Elles permettent d'une part la croissance des biofilms dans des conditions hydrodynamiques et environnementales contrôlées, d'autre part une observation *in situ* et en temps réel des biofilms par microscopie. Constituant le bioréacteur du système, il est important de la sélectionner avec soin.

Dans ces travaux, deux modèles de cellule de flux ont été testés : (i) un modèle qu'on appellera « danois », en référence aux travaux de Tolker-Nielsen et Sternberg à l'Université de Copenhague et à l'Université technique du Danemark (Tolker-Nielsen et Sternberg, 2011) et (ii) un modèle commercial de marque ibidi® (uncoated μ -Slide VI^{0.4} de référence 80601, www.ibidi.com, dont les caractéristiques hydrodynamiques sont présentées en annexe 6).

La version « danoise » est une cellule de flux moulée en polycarbonate, la version commerciale est en plastique hydrophobe (donnée du constructeur). La Figure 3.3 présente les deux types de cellules. Le Tableau 3.1 recense les spécifications et observations effectuées sur les deux modèles dans le cadre de ce travail.

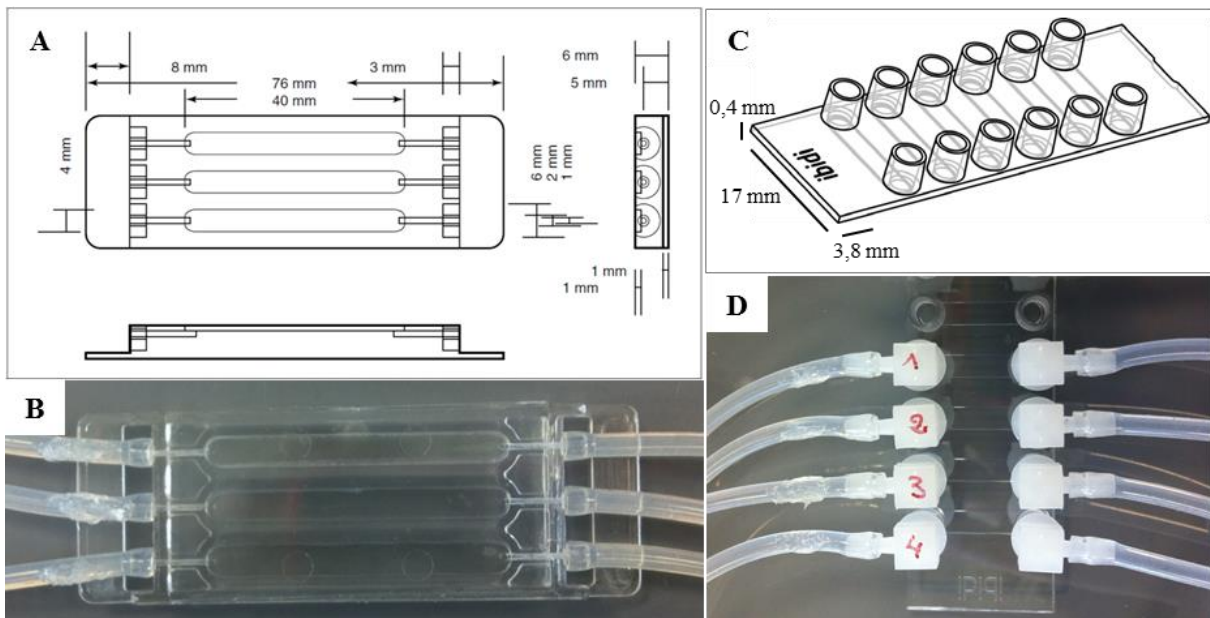


Figure 3.3. Dimensions et photographies des cellules de flux « danoise » et ibidi®. (A) Spécifications dimensionnelles (d'après Tolker-Nielsen et Sternberg, 2011) et (B) photographie de la cellule « danoise ». (C) Spécifications dimensionnelles (adapté du manuel du constructeur ibidi®) et (D) photographie de la cellule ibidi®.

Caractéristique	Cellule « danoise »	Cellule ibidi®
Matériau	Polycarbonate	Plastique hydrophobe
Autoclavable	Oui	Non
Utilisation	A assembler avant utilisation	Utilisable en l'état
Nombre de canaux	3	6
Longueur du canal	40 mm	17 mm
Largeur du canal	4 mm	3,8 mm
Hauteur du canal	1 mm	0,4 mm
Volume du canal	160 μ L	30 μ L
Présence de réservoirs en entrée et en sortie de canal	Absence	Présence (Figure 3.3C)
Volume des réservoirs	-	60 μ L
Autofluorescence du canal observée, dans le cadre de ce travail, à 488 nm	Oui	Non

Autofluorescence du canal observée, dans le cadre de ce travail, à 633 nm	Pas testé	Non
Matériau du substrat	Verre borosilicate	Plastique de microscopie
Indice de réfraction du substrat	1,473 (à 587 nm)	1,52 (à 589 nm)
Epaisseur du substrat (donnée par le constructeur)	130 μm	180 μm
Epaisseur du substrat (donnée observée pour une cellule de flux)	Entre 90 et 150 μm	Entre 116 et 118 μm
Différence inter-canal de z	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\leq 3 \mu\text{m}$

Tableau 3.1. Tableau comparatif des cellules de flux « danoise » et ibidi®.

Le volume des chambres « danoises » étant plus grand que celui des chambres ibidi®, elles peuvent donc potentiellement accueillir une quantité de biomasse plus importante. En revanche, le modèle « danois » ne possède que trois chambres par cellule alors que le modèle ibidi® en contient six. Le matériau de support des biofilms, appelé substrat, est du verre borosilicate pour la cellule « danoise » et du plastique hydrophobe pour la cellule ibidi®. Selon le constructeur, une cellule ibidi® possède une autofluorescence et une biréfringence faibles, et la qualité optique du plastique hydrophobe microscopique du substrat est comparable à celle du verre. De telles informations ne sont pas données pour une cellule « danoise ». La version « danoise » nécessite un assemblage avant utilisation par collage du substrat en verre – qui n’est autre qu’une lamelle de microscopie classique – sur le polycarbonate de la cellule ; la version ibidi® est déjà assemblée. La différence inter-canal de plan en z observée correspond à la différence de hauteur entre le substrat d’un canal et celui du canal voisin. Celle-ci est supérieure à 10 μm pour la cellule « danoise » et inférieure à 3 μm pour la cellule ibidi®. La cellule « danoise » est autoclavable, donc réutilisable, alors que la cellule ibidi® est à usage unique.

Les deux modèles présentent des avantages et inconvénients et se valent *a priori*. Ainsi, afin de comparer les deux types de cellule en situation et de choisir *in fine* la technologie d’étude, il a été nécessaire de développer des biofilms au sein des deux modèles. La Figure 3.4 présente les observations microscopiques de biofilms développés au sein de chaque cellule.

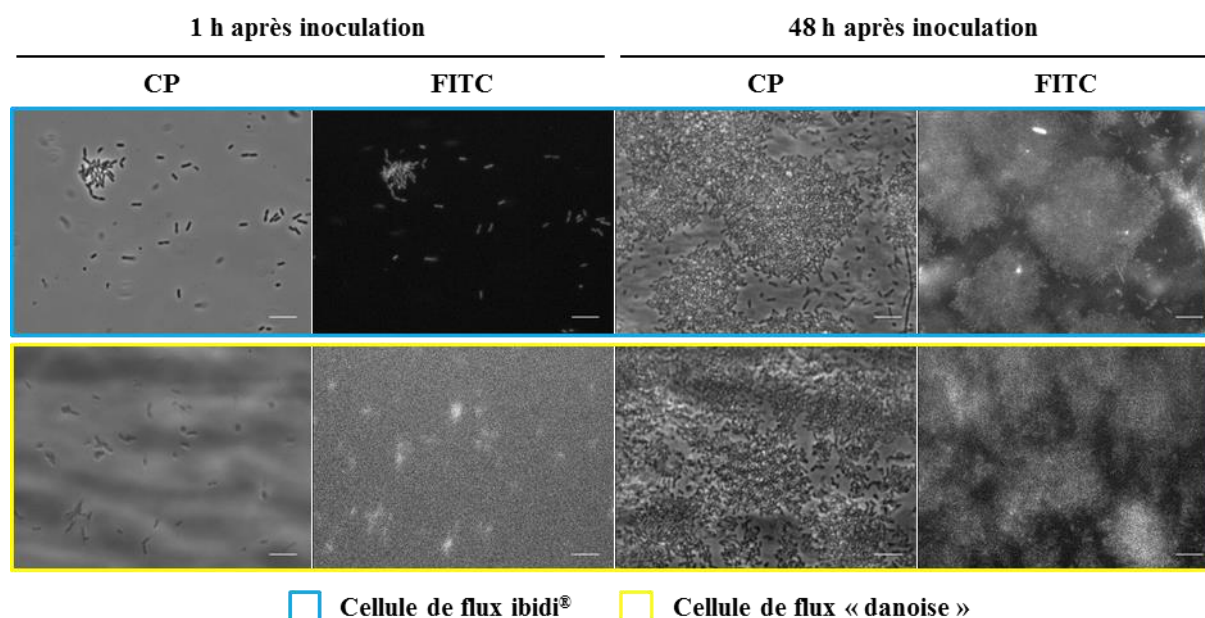


Figure 3.4. Photomicrographies des biofilms à 1 h et à 48 h après inoculation des cellules de flux « danoise » et ibidi®. Le panneau du haut correspond à la cellule de flux ibidi® (encadrement bleu). Le panneau du bas correspond à la cellule de flux « danoise » (encadrement jaune). Les colonnes CP sont les acquisitions en plein champ avec anneau de contraste de phase et les colonnes FITC sont les acquisitions en épifluorescence avec filtre FITC. La souche fluorescente utilisée est BW25113 P5. P5 est un promoteur constitutif et constitue ici un marqueur bactérien (voir chapitre 2 section 2.1.2.1). Les barres d’échelle représentent 10 μm .

La qualité optique est meilleure avec la cellule de flux ibidi®. En acquisition de plein champ avec anneau de contraste de phase, on observe des variations de phase du fond de la cellule « danoise », variations qui n'existent pas dans la cellule ibidi® où le fond est uniforme et homogène. La détection de fluorescence est également nettement meilleure avec la cellule ibidi®, avec une définition à la bactérie près à 1 h et à 48 h après inoculation. L'autofluorescence et le bruit de fond observés au sein de la cellule « danoise » rendent la visualisation des bactéries difficile à 1 h après inoculation, et la définition du biofilm à 48 h après inoculation n'est pas bonne. Ces défauts de la cellule « danoise » sont critiques dans le cadre de ces travaux, où l'intensité de fluorescence doit être correctement détectée et le bruit de fond limité, afin d'être au plus près de l'intensité de fluorescence réelle émise par les différents rapporteurs.

Par ailleurs, les bactéries semblent adhérer plus facilement au plastique hydrophobe de la cellule ibidi® qu'au verre de la cellule « danoise ». En effet, une différence dans l'adhésion semble exister entre ces deux matériaux. D'une part, une différence s'observe dans l'état de regroupement des bactéries sur le substrat à 1 h après inoculation : les bactéries sont regroupées en petits amas pour la cellule ibidi® alors qu'elles semblent plus éparpillées pour la cellule « danoise ». D'autre part, une différence dans le nombre de bactéries adhérentes au substrat après une heure d'incubation semble exister, avec une détection de 82 bactéries adhérentes pour la cellule ibidi® contre 63 pour la cellule « danoise ». Cependant, d'autres essais seraient nécessaires pour confirmer ces premiers résultats.

La cellule « danoise » est autoclavable, ce qui présente un avantage majeur et une économie non négligeable. L'état interne des chambres après autoclavage d'une cellule « danoise » ayant déjà servi pour la croissance de biofilms a été observé par microscopie optique. Un cycle de lavage avec solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 % (v/v) est toujours effectué après une expérience. Les résultats présentés en Figure 3.5 sont donc l'état interne de la cellule après cycle de lavage de fin d'expérience et autoclavage.

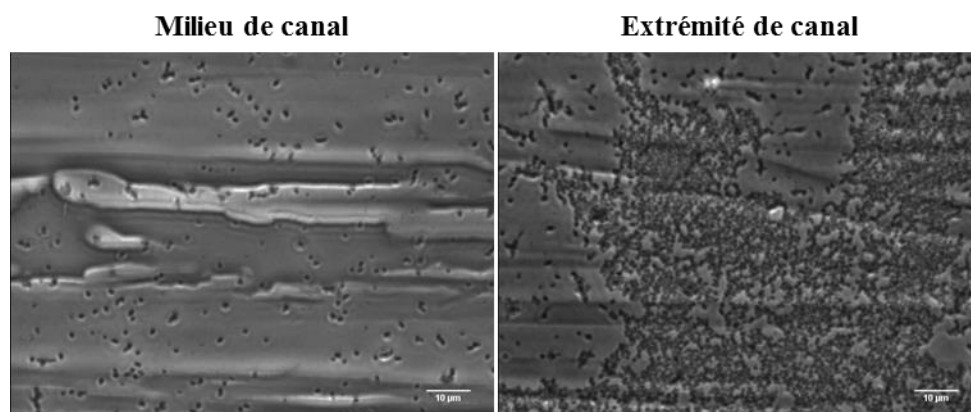


Figure 3.5. Photomicrographies du fond de la cellule de flux « danoise » après autoclavage en position centrale et en extrémité de canal. Les acquisitions sont effectuées en microscopie optique de plein champ avec anneau de contraste de phase.

Les observations démontrent clairement la difficulté d'éliminer les biofilms dans leur totalité. La réutilisation des cellules « danoises » reste donc compliquée.

En résumé, prenant en compte la faible qualité optique et la difficulté de réutilisation des cellules de flux « danoises », la cellule ibidi® a été retenue pour la suite des travaux. Les résultats présentés par la suite sont, dans la majorité des cas, ceux obtenus avec cette dernière (autrement précisé).

3.1.4 Inoculation des chambres fluidiques

L'inoculation des chambres fluidiques est une étape clé dans le développement des biofilms. C'est donc une étape qu'il faut tout particulièrement soigner. L'effet du type, de la stratégie et du volume d'inoculation sur l'homogénéité de recouvrement des chambres fluidiques a ainsi été étudié.

3.1.4.1 Type d'inoculation

Nous allons comparer deux types d'inoculation en examinant les biofilms formés dans les deux cas. L'inoculation des bactéries planctoniques dans les chambres fluidiques est réalisée de deux façons : (i) inoculation traditionnelle, directement dans les tuyaux et (ii) inoculation assistée, à travers les micro-septums (Figure 3.6). L'inoculation traditionnelle est effectuée en introduisant l'aiguille de la seringue dans le tuyau en silicone, au plus près de l'entrée de la cellule de flux. L'inoculation assistée se fait en introduisant l'aiguille à travers le micro-septum placé en amont des chambres. La Figure 3.6 montre les différences macroscopiquement observées entre les deux types d'inoculation, 72 h après celle-ci.

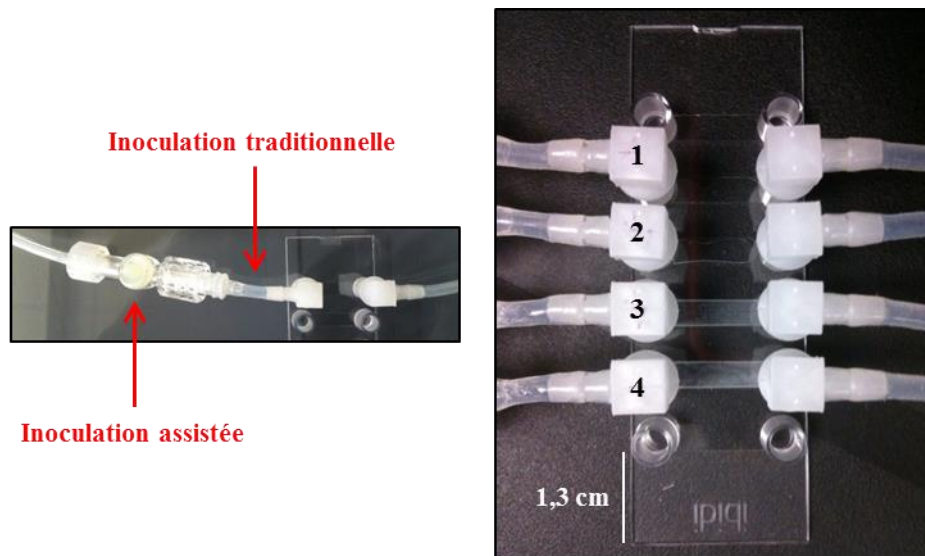


Figure 3.6. Différences macroscopiques entre inoculations traditionnelle et assistée, 72 h après inoculation. Les canaux 1 et 2 ont été inoculés de manière assistée, à travers les micro-septums. Les canaux 3 et 4 ont été inoculés de manière traditionnelle, dans les tuyaux.

La formation des biofilms est clairement affectée par le type d'inoculation pratiqué. Des biofilms bien développés sont détectés à la suite d'une inoculation traditionnelle (canaux 3 et 4 de la Figure 3.6) tandis que l'inoculation assistée résulte en la formation de grosses bulles remplissant la quasi-totalité du volume des chambres et affectant la formation de ceux-ci (canaux 1 et 2). Ces bulles pourraient s'expliquer par la présence de micro-ouvertures générées lors de la percée de la membrane des micro-septums par l'aiguille d'injection.

Par ailleurs, l'inoculation assistée engendre la présence de bactéries planctoniques et le développement de biofilms dans le réservoir même du micro-septum, ce qui n'est pas souhaité. L'inoculation traditionnelle est donc retenue pour l'étape d'inoculation.

3.1.4.2 Stratégie d'inoculation

Après le choix du type d'inoculation (mode traditionnel), la stratégie d'inoculation est ensuite à déterminer. L'objectif est que toute la cellule de flux reçoive l'inoculum de façon homogène.

Pour ce faire, le paramètre suivant est étudié : le lieu d'inoculation. Il est possible de procéder à l'inoculation à deux endroits : (i) en amont de la cellule de flux ou (ii) en amont et en aval de la cellule de flux. L'inoculation amont consiste à introduire la totalité du volume d'injection en entrée de chambre fluïdique. L'inoculation amont et aval consiste à introduire la moitié du volume inoculé en entrée et l'autre moitié en sortie de chambre fluïdique.

Pour simuler l'inoculation, un volume de 200 μL d'une solution de bleu de dextran est injecté dans chaque canal de la cellule « danoïse » (160 μL) selon les deux lieux d'inoculation. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.7.

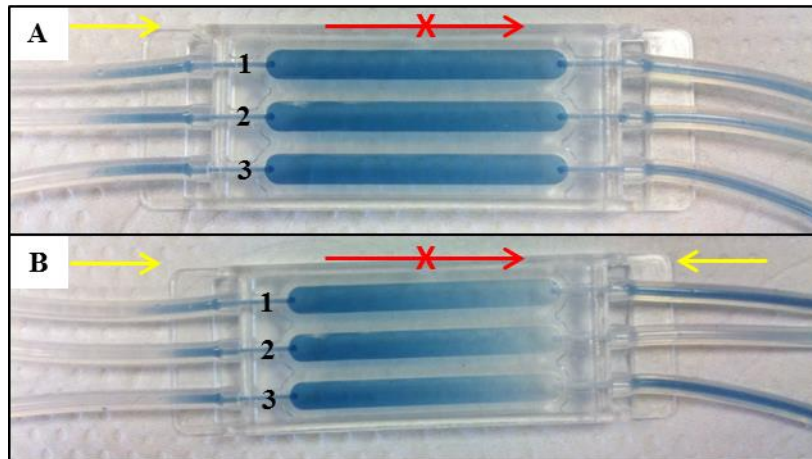


Figure 3.7. Stratégies d'inoculation par injection de 200 μL d'une solution de bleu de dextran dans chaque canal de la cellule « danoïse ». (A) Injection en amont de la cellule de flux pour chaque canal. (B) Injection en amont puis en aval de la cellule de flux pour les canaux 1 et 3, et injection en aval puis en amont pour le canal 2. Les flèches jaunes indiquent le lieu d'injection. Les flèches avec les croix rouges symbolisent que le flux de la pompe est fermé (pompe arrêtée). Echelle : la largeur d'une chambre fluïdique est de 4 mm.

L'injection en amont de la cellule de flux montre un profil similaire du bleu de dextran entre les trois canaux (Figure 3.7A). En effet, macroscopiquement, le volume de bleu de dextran injecté recouvre uniformément et de la même façon les chambres et les tuyaux d'entrée et de sortie. L'injection est donc reproductible avec cette stratégie.

L'injection en amont et en aval de la cellule de flux montre un profil similaire du bleu de dextran entre les trois canaux (Figure 3.7B). Cependant, on constate que le volume de bleu de dextran injecté ne recouvre pas de manière uniforme et homogène la totalité des chambres. On observe effectivement un gradient de coloration. De plus, les profils sont différents dans les tuyaux de sortie. Le volume inoculé en aval de la cellule de flux semble être chassé par le volume inoculé en amont. L'injection n'est donc pas efficace avec cette stratégie.

L'inoculation en amont de cellule de flux est donc la meilleure option. Elle est sélectionnée pour la suite de ces travaux.

3.1.4.3 Volume d'inoculation

Après le choix de la stratégie d'inoculation (en amont de cellule de flux), le volume d'inoculation est enfin à déterminer. L'objectif est que l'inoculum remplisse toute la chambre fluïdique.

Le volume d'inoculation dépend de la cellule de flux utilisée. Différents volumes de solution de bleu de dextran ont été injectés en amont de cellule et les résultats sont présentés dans la Figure 3.8, montrant le remplissage des chambres fluïdiques en fonction des différents volumes d'injection.

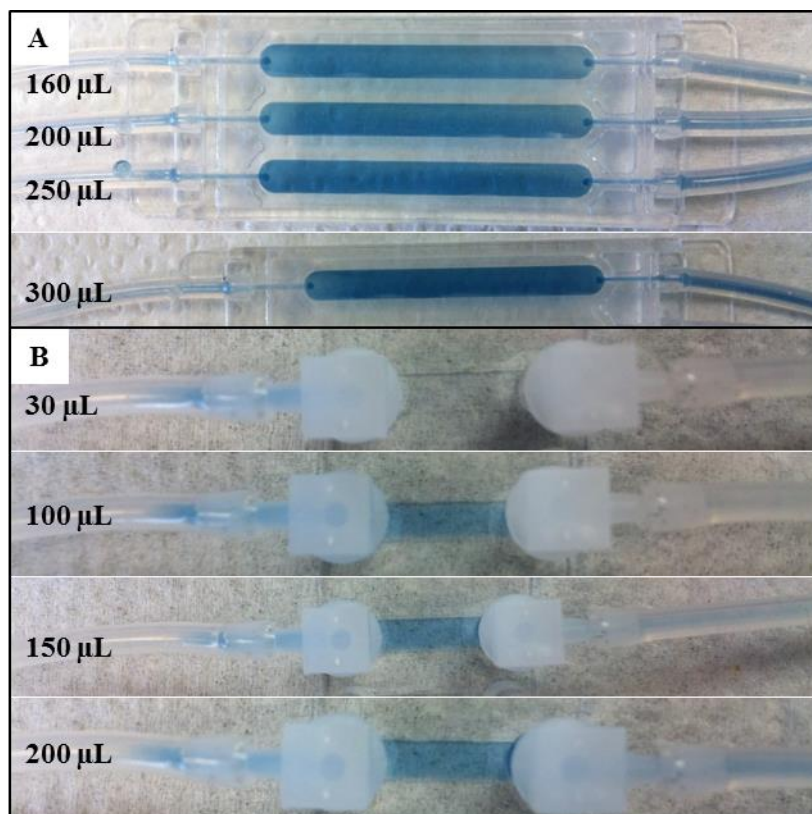


Figure 3.8. Influence du volume d'inoculation par injection d'une solution de bleu de dextran. Le volume injecté est indiqué sur les tuyaux en amont des cellules de flux pour (A) la cellule « danoise » et (B) la cellule ibidi®. Echelle : la largeur d'une chambre fluïdique est de 4 mm pour une chambre « danoise » et de 3,8 mm pour une chambre ibidi®.

Pour le modèle « danois », les volumes suivants ont été testés : un volume minimal de 160 µL (volume de la chambre), un volume intermédiaire de 200 µL, un volume recommandé pour ce type de chambre de 250 µL (Nielsen et al, 2011) et un volume supérieur de 300 µL. Les profils macroscopiques de bleu de dextran sont similaires entre les canaux (Figure 3.8A). Un volume d'inoculation de 250 µL est donc retenu pour ce type de cellule.

Concernant le modèle ibidi®, les réservoirs d'entrée et de sortie de chambre ont chacun un volume de 60 µL. Les volumes d'inoculation suivants ont ainsi été testés : un volume minimal de 30 µL (volume de la chambre), un volume intermédiaire de 100 µL (réservoir d'entrée + volume de la chambre), un volume efficace de 150 µL (réservoirs d'entrée et de sortie + volume de la chambre) et un volume supérieur de 200 µL. Les profils de bleu de dextran sont différents selon les canaux (Figure 3.8B). Comme attendu, le volume de 30 µL est insuffisant et pour un volume inoculé de 100 µL, le bleu de dextran n'est pas observé en sortie. Pour des volumes inoculés de 150 et 200 µL, le bleu de dextran remplit la chambre et se retrouve également en sortie, ce qui garantit une inoculation efficace. Un volume d'inoculation de 200 µL est finalement retenu en cas d'utilisation des cellules ibidi®.

3.1.4.4 Vérification de la non-contamination inter-canal après inoculation

Une fois le type, la stratégie et le volume d'inoculation optimisés, il est important de vérifier que le procédé d'inoculation est spécifique. En effet, l'inoculation traditionnelle à travers les tuyaux est un processus délicat qui nécessite de vérifier que l'inoculation d'un canal n'engendre pas une contamination des autres canaux. Pour ce faire, l'état de deux canaux adjacents a été observé microscopiquement, l'un ayant été inoculé avec des bactéries, l'autre ayant reçu une injection de milieu de culture stérile. Les résultats sont portés sur la Figure 3.9.

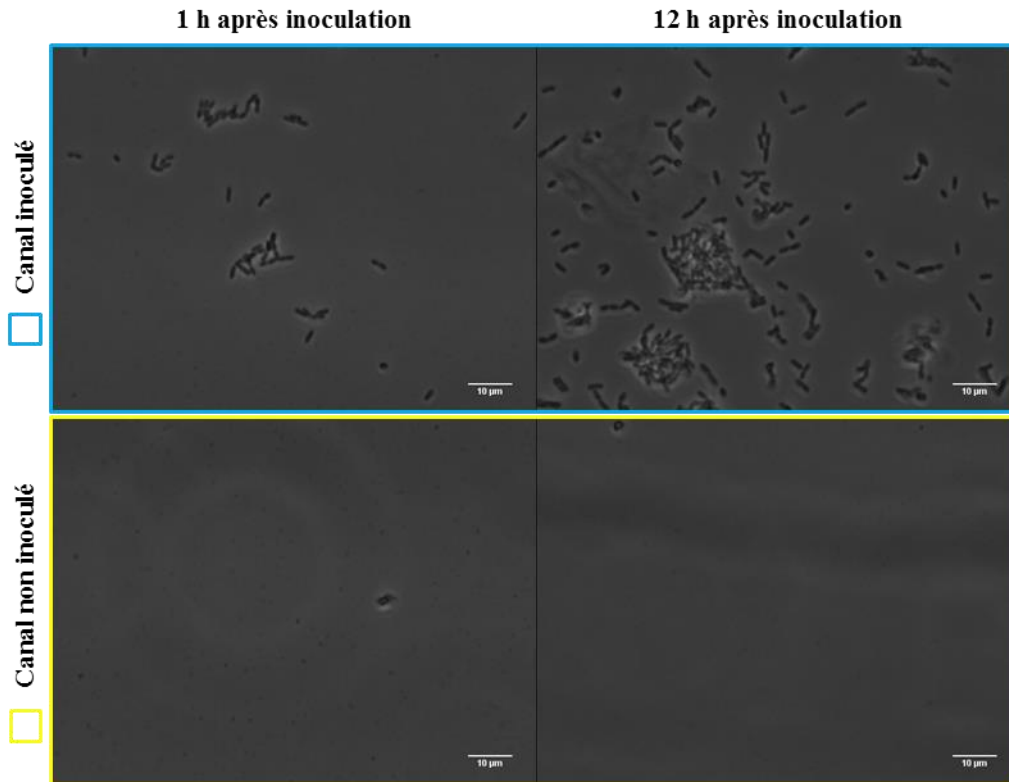


Figure 3.9. Photomicrographies de la surface interne des canaux après le processus d'inoculation. Les photomicrographies sont acquises en microscopie optique de plein champ avec anneau de contraste de phase au substrat des canaux, à 1 h et à 12 h après inoculation. Le panneau du haut représente un canal inoculé (encadrement bleu), celui du bas un canal non inoculé (encadrement jaune). Le canal non inoculé correspond à une injection contrôle de milieu de culture stérile.

Dans le canal inoculé, on observe la présence de bactéries à 1 h et à 12 h après inoculation. Dans le canal non inoculé, qui a reçu une injection contrôle de milieu de croissance, les bactéries sont absentes aux mêmes temps. Il n'y a donc pas eu de contaminations inter-canal en cours d'inoculation ou postérieures à celle-ci. Les quelques objets particuliers observés dans le canal non inoculé correspondent certainement à des saletés ou à des agrégats de sels du milieu de culture ; la nature non biologique de ces objets est confortée par le fait qu'ils sont plus nombreux à 1 h qu'à 12 h. En effet, 1 h après inoculation, le flux était encore fermé et les particules ont eu le temps de sédimenter. A 12 h par contre, le flux était repris et les particules ont été balayées. Le processus d'inoculation mis en place est donc spécifique à chaque canal.

Une fois la cellule de flux sélectionnée, le système mis au point et l'étape d'inoculation optimisée, il convient de déterminer les conditions de culture adéquates pour la croissance des biofilms d'*E. coli* en bioréacteur microfluidique.

3.2 Conditions d'opération de croissance des biofilms

Dans cette section, le choix des conditions d'opération du système (concentration de l'inoculum, taux de dilution, température et milieu de culture) est présenté.

3.2.1 Concentration de l'inoculum bactérien

La concentration de l'inoculum bactérien, mesurée par sa densité optique à 600 nm (DO_{600nm}), est un paramètre important pour le développement des biofilms. L'effet de la concentration de l'inoculum sur

le recouvrement des biofilms dans les chambres fluidiques a été étudié. La Figure 3.10 montre les différences macro et microscopiques de biofilms développés à partir d'inocula bactériens différemment concentrés.

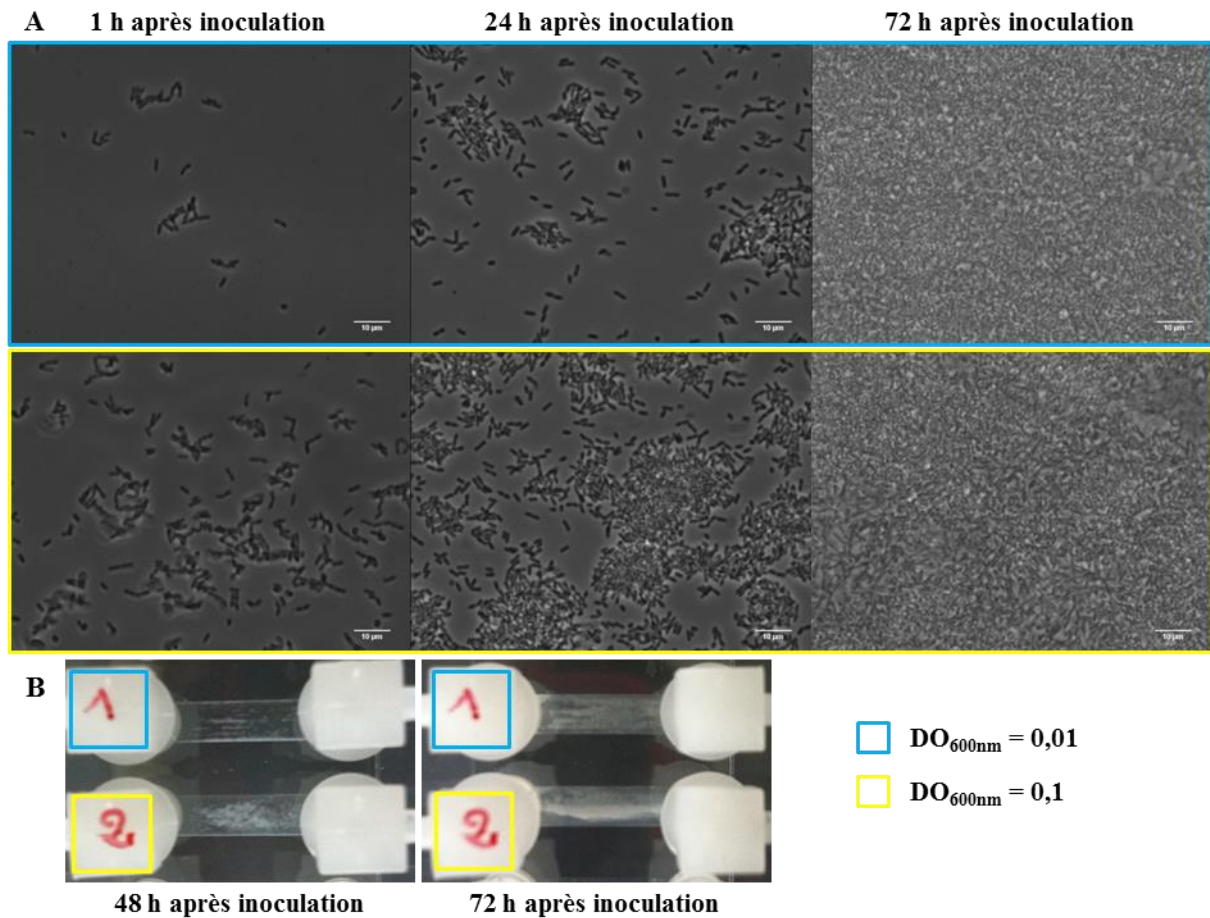


Figure 3.10. Comparaison de biofilms développés en microfluidique en fonction de la concentration bactérienne de l'inoculum. Les encadrements en bleu correspondent à une inoculation à DO_{600nm} de 0,01, ceux en jaune une inoculation à 0,1. (A) Photomicrographies des biofilms acquises à 1, 24 et 72 h après inoculation. (B) Photomacrophies des biofilms acquises à 48 et 72 h après inoculation. Les photomicrographies sont acquises en microscopie optique de plein champ avec anneau de contraste de phase. Echelle : les barres d'échelle des photomicrographies représentent 10 µm, la largeur d'un canal des photomacrophies est de 3,8 mm.

Comme attendu, les bactéries et les microcolonies sont plus nombreuses à 1 et 24 h (Figure 3.10A) et les biofilms macroscopiquement plus denses à 48 et 72 h (Figure 3.10B) après inoculation, pour un inoculum plus concentré. A 72 h, le canal ayant reçu l'inoculum le plus concentré montre une répartition macroscopique de la biomasse inégale, avec un biofilm très dense et épais au centre. L'imagerie microscopique de plein champ est difficile, voire impossible, dans ces conditions de densité, et il est compliqué de comparer les images microscopiques à 72 h.

En résumé, un biofilm moins dense, plus homogène et mieux réparti le long des chambres fluidiques a été obtenu pour l'inoculum le plus dilué (DO_{600nm} = 0,01). Ainsi, pour la suite de ces travaux, un inoculum bactérien d'une DO à 600 nm de 0,01 est retenu pour l'étape d'inoculation.

3.2.2 Milieu de culture et vitesse spécifique de croissance

Le choix du milieu de culture, et particulièrement de la concentration du substrat carboné, est un paramètre clé pour le développement des biofilms. La croissance de la souche sauvage (WT)

BW25113 d'*E. coli* à différentes concentrations de glucose a ainsi été évaluée et le taux de dilution à appliquer à notre système microfluidique a été déterminé.

Dans la littérature, les milieux de croissance utilisés pour développer des biofilms d'*E. coli* en cellule de flux sont couramment des milieux minima dont la source de carbone est souvent du glucose (Glc). Cependant, la concentration en Glc varie selon les études, les concentrations de 2 g/L et 5 g/L revenant de manière récurrente. L'effet de la concentration en Glc dans le milieu minimal M9 utilisé pour la croissance des bactéries d'*E. coli* souche BW25113 WT a ainsi été étudié entre 0 et 10 g/L, en présence de 5 g/L de casamino acids (CAA) et à 37°C. La Figure 3.11 montre les cinétiques de croissance obtenues dans les différents cas ainsi que l'évolution de la vitesse spécifique de croissance en fonction du temps. La composition du milieu minimal M9 est détaillée au chapitre 2 paragraphe 2.1.1.1.

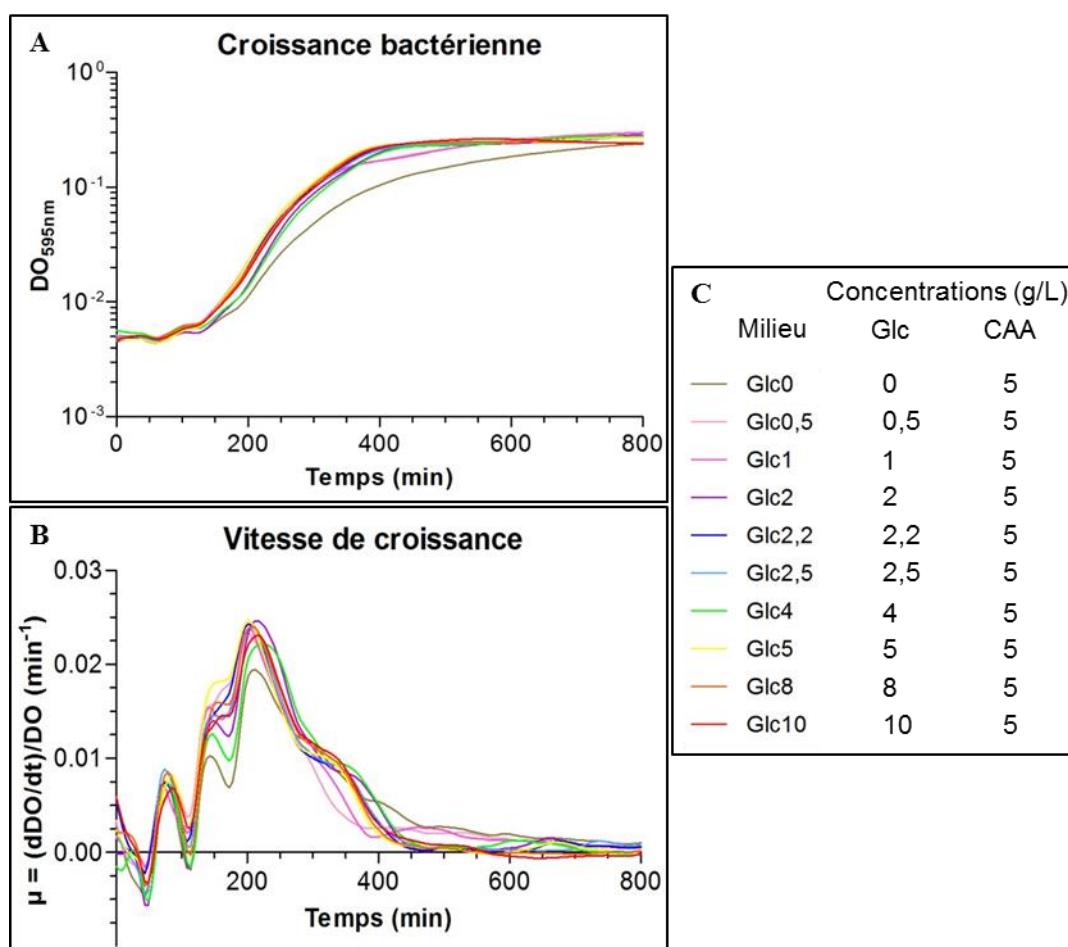


Figure 3.11. Croissance planctonique de la souche BW25113 WT d'*E. coli* à 37°C en fonction de la concentration en Glc du milieu minimal M9. (A) Suivi de l'absorbance à 595 nm des cultures bactériennes. (B) Vitesse spécifique de croissance (μ) en fonction du temps. (C) Tableau détaillant la légende ainsi que les concentrations en Glc et en CAA ajoutés au milieu minimal M9. Les mesures de DO sont effectuées au lecteur de plaques à 595 nm.

Le suivi de la DO_{595nm} des cultures bactériennes montre une croissance planctonique standard : phase de latence (avant 50 min), phase d'accélération (50 à 150 min), phase exponentielle (150 à 300 min), phase de décélération (300 à 400 min) et phase stationnaire (après 400 min) (Figure 3.11A).

La vitesse spécifique de croissance est un paramètre important pour l'étude de cultures bactériennes. Elle est désignée par la lettre μ et correspond à la dérivée première de la densité optique à 595 nm par rapport au temps, normalisée par la densité optique à 595 nm à ce même temps (Figure 3.11B).

$$\mu = \frac{d(DO)/dt}{DO}$$

La vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle, notée μ_{exp} , a été déterminée pour chaque condition et est représentée ci-après en fonction de la concentration en Glc (Figure 3.12).

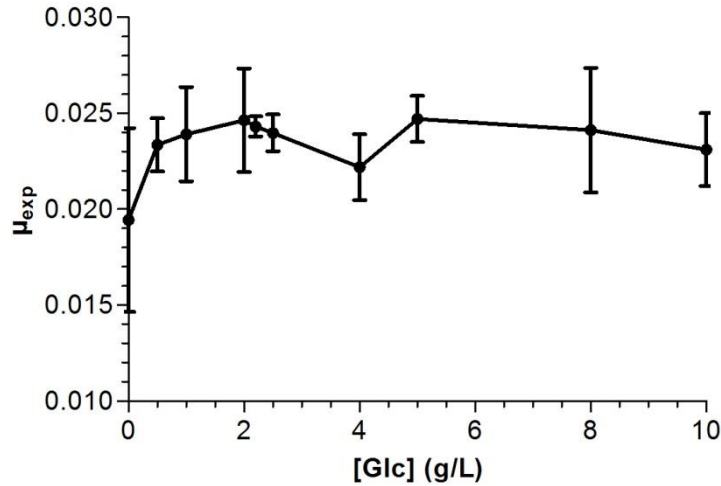


Figure 3.12. Vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle pour la souche BW25113 WT d'*E. coli* à 37°C en fonction de la concentration en Glc. La moyenne et les barres d'erreur associées sont issues de la mesure de six puits dans la plaque de lecture.

Compte-tenu des écarts à la moyenne, la vitesse spécifique de croissance en phase exponentielle est équivalente pour toutes les concentrations de Glc testées dans le milieu minimal M9 (Figure 3.12) ($\mu_{\text{exp}} = 0,023 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$, représentant une division bactérienne toutes les 40 minutes).

Etant donné que les dynamiques de croissance sont identiques pour les concentrations en Glc comprises entre 2 et 10 g/L, le choix économique d'une concentration de 2 g/L a ainsi été effectué pour la suite de ces travaux (à cette concentration, $\mu_{\text{exp}} = 0,025 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$). La détermination de la vitesse spécifique de croissance μ_{exp} est une condition fondamentale pour le choix du débit volumique à appliquer au système.

3.2.3 Débit volumique

Les chambres fluidiques dans lesquelles sont développés les biofilms peuvent être vues comme des bioréacteurs miniatures fonctionnant en continu.

Pour l'étude de biofilms dans de tels systèmes, il est indispensable de limiter la croissance bactérienne planctonique ; le contrôle de cette dernière est rendu possible grâce au débit de liquide appliqué, comme expliqué ci-dessous.

Le taux de dilution D est défini par l'équation suivante :

$$D = \frac{Q}{V}$$

avec Q le débit du milieu de culture approvisionné ($\mu\text{L}/\text{min}$) et V le volume de la chambre (μL).

Pour un bioréacteur fonctionnant en régime stationnaire, la quantité de biomasse produite par unité de temps ($\mu_{\text{exp}} \times V$) est égale à la quantité de biomasse évacuée du réacteur par unité de temps ($Q \times D$)

X V) ; X est la concentration des microorganismes (cellules/ μL) dans le réacteur et μ_{exp} leur vitesse spécifique de croissance (min^{-1}). On obtient donc en régime stationnaire la relation suivante : $\mu_{\text{exp}} = D$.

Le taux de dilution permet donc de contrôler la quantité de biomasse planctonique au sein des chambres.

La comparaison du taux de dilution D avec la vitesse spécifique de croissance μ_{exp} est un indicateur de ce qu'il se passe dans les chambres. Trois cas de figures existent :

- i. $D < \mu_{\text{exp}}$: les bactéries planctoniques poussent plus vite qu'elles ne sont évacuées de la chambre, la croissance planctonique au sein du bioréacteur est donc favorisée.
- ii. $D = \mu_{\text{exp}}$: les bactéries planctoniques poussent aussi vite qu'elles sont évacuées de la chambre, la croissance planctonique au sein du bioréacteur est stationnaire.
- iii. $D > \mu_{\text{exp}}$: la croissance planctonique au sein du bioréacteur est défavorisée et tend vers zéro, c'est le phénomène de lessivage.

Pour favoriser la croissance des biofilms au sein des chambres, la croissance planctonique doit être éliminée. Il faut donc être dans le cas où $D > \mu_{\text{exp}}$ (Tijhuis et al, 1992).

De nombreux travaux de la littérature utilisent des débits de 3 à 3,3 mL/h pour le développement de biofilms en cellule de flux. Plus particulièrement, Tolker-Nielsen et Sternberg stipulent qu'un débit de 1 à 3 mL/h est généralement approprié pour la croissance de biofilms d'*E. coli* en microfluidique (Tolker-Nielsen et Sternberg, 2011).

Tenant compte de ces informations, nous souhaitons déterminer si un débit de 3 mL/h (50 $\mu\text{L}/\text{min}$), permet d'obtenir une croissance planctonique limitée au sein de notre système. Le volume d'une chambre de la cellule de flux ibidi[®] étant de 30 μL , le taux de dilution D vaut :

$$D = \frac{50 \mu\text{L}/\text{min}}{30 \mu\text{L}} \approx 1,67 \text{ min}^{-1}.$$

Le débit choisi semble donc adapté à notre étude ($1,67 \text{ min}^{-1} > 0,025 \text{ min}^{-1}$).

Il en est de même pour la chambre « danoise » ($V = 160 \mu\text{L}$; $D = 0,312 \text{ min}^{-1}$).

Donc quel que soit le type de chambre utilisé, avec un débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, la biomasse en suspension reste très limitée et la croissance microbienne à l'intérieur du canal est exclusivement celle des biofilms.

3.2.4 Température

La température est un paramètre fondamental pour le développement des biofilms.

Nous avons dans un premier temps testé la température de 37°C – température optimale de croissance d'*E. coli* – mais nous avons observé dans beaucoup de cas la formation de bulles à l'intérieur des chambres fluidiques qui empêchaient la bonne conduite des expériences. Ce phénomène a été signalé par Crusz et collaborateurs qui ont estimé qu'une expérience sur trois en cellule de flux était ainsi perturbée à cette température (Crusz et al, 2012).

La température ambiante a en revanche donné lieu à la formation de beaucoup moins de bulles. Le fait de travailler à cette température donnera donc des conditions propices à la croissance et l'observation des biofilms. C'est donc à cette température que les biofilms d'*E. coli* ont été développés dans ces travaux.

La température pendant la phase de croissance des biofilms a été mesurée au cours de six expériences indépendantes à l'aide d'une sonde thermique. Les mesures ont été acquises à différents moments de l'année, entre décembre et juillet. La Figure 3.13 présente l'évolution de la température sur les trois jours de développement des biofilms.

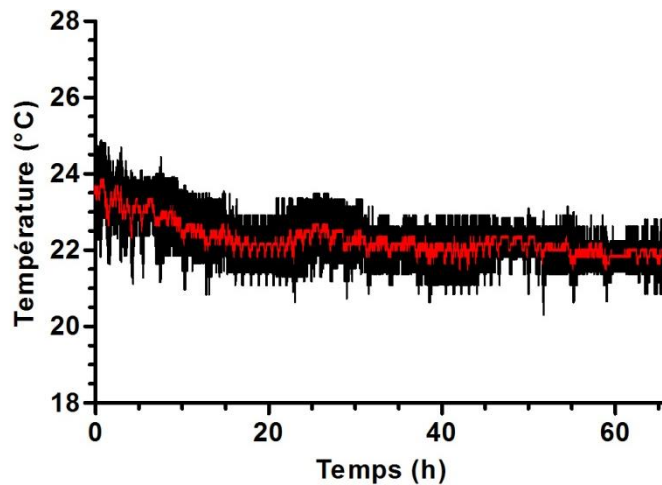


Figure 3.13. Température de croissance des biofilms développés en bioréacteur microfluidique. La courbe rouge représente la moyenne de la température de croissance des biofilms, pour six expériences indépendantes entre décembre et juillet. Les barres d'erreur sont représentées en noir. La résolution est à la minute.

La température moyenne de croissance des biofilms au sein du bioréacteur microfluidique est de $22,6 \pm 0,8^\circ\text{C}$ (Figure 3.13). Elle est relativement stable au cours des 72 h de croissance.

Bien que le choix du taux de dilution ($D = 1,67 \text{ min}^{-1}$, section 3.2.3) ait été fait prenant en compte la vitesse spécifique de croissance à 37°C , ce dernier reste valable à 22°C vu que la croissance bactérienne est plus lente à 22°C qu'à 37°C .

Après avoir déterminé les conditions de croissance des biofilms, notamment en termes de concentration de l'inoculum, de concentration du substrat, de débit volumique et de température, il est important de vérifier la croissance des biofilms dans ces conditions d'opération.

3.2.5 Vérification de la croissance des biofilms

Tout d'abord, le développement des biofilms d'*E. coli* au sein de la cellule de flux a été observé macroscopiquement. La Figure 3.14 montre l'évolution de la croissance des biofilms dans les différentes chambres fluidiques. On constate l'absence de bulles et une croissance homogène dans tous les canaux au cours des 72 h d'incubation.

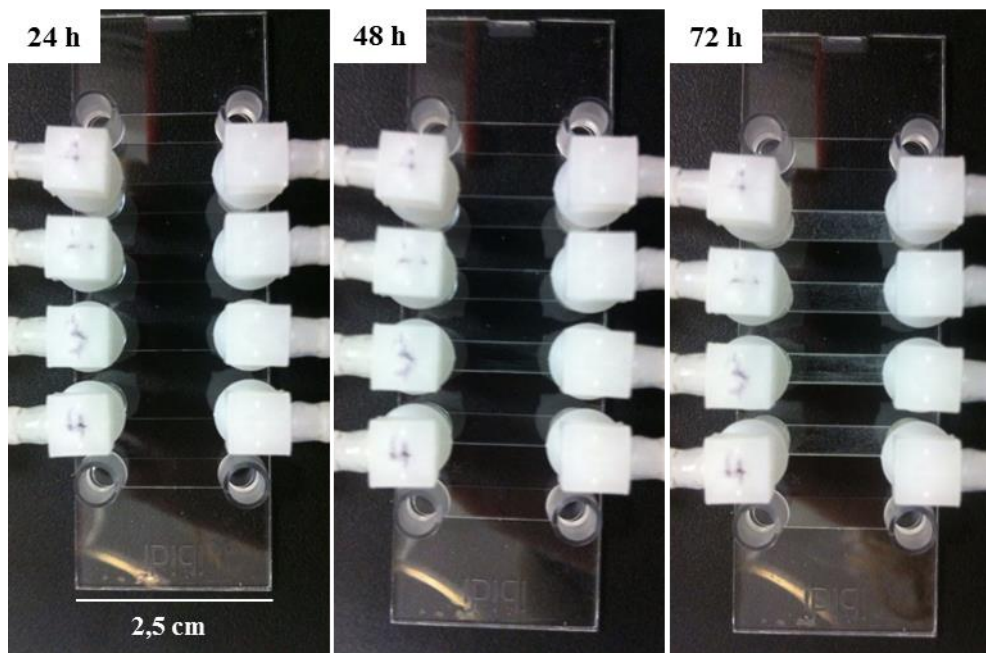


Figure 3.14. Observation macroscopique des biofilms d'*E. coli* dans les chambres fluidiques à 24, 48 et 72 h de croissance. Conditions d'incubation : température ambiante (22°C), milieu minimal M9 (2 g/L de Glc, 5 g/L de CAA), débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, inoculum bactérien de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,01.

L'observation microscopique de cette croissance a également été effectuée. La Figure 3.15 montre l'évolution des biofilms d'*E. coli* développés dans les chambres fluidiques.

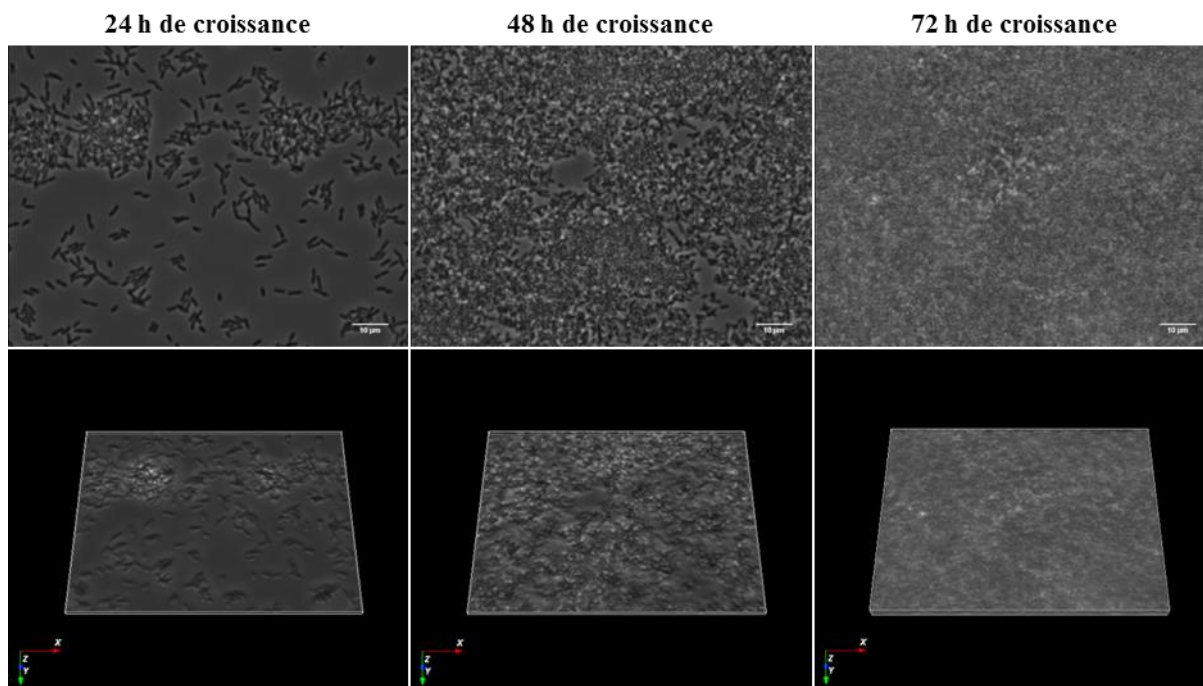


Figure 3.15. Observation microscopique des biofilms d'*E. coli* dans les chambres fluidiques à 24, 48 et 72 h de croissance. Conditions d'incubation : température ambiante (22°C), milieu minimal M9 (2 g/L de Glc, 5 g/L de CAA), débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, inoculum bactérien de $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,01. Les panneaux du haut sont les photomicrographies acquises en microscopie optique de plein champ avec anneau de contraste de phase. Les panneaux du bas sont une représentation tridimensionnelle des biofilms, générée par le logiciel Icy.

Le développement des biofilms d'*E. coli* au sein de notre système dans les conditions d'opération choisies est donc vérifié. Il convient maintenant de caractériser plus précisément ces derniers. L'observation et l'acquisition d'images de biofilms en microscopie optique de plein champ permettent

une étude qualitative des biofilms, mais l'utilisation de cette technique à des fins quantitatives reste limitée. Aussi est-il nécessaire d'utiliser d'autres techniques. La prochaine section est dédiée à la stratégie de marquage des biofilms dans le but d'utiliser la microscopie confocale à balayage laser (CLSM), qui est l'outil « gold-standard » pour une observation *in situ* et une caractérisation quantitative des biofilms.

3.3 Marquage des biofilms

Les biofilms étant constitués de deux éléments principaux que sont les cellules et la matrice extracellulaire (chapitre 1), il convient de les mettre en évidence tous les deux. Dans ce contexte, le marquage des biofilms, notamment à l'aide de molécules fluorescentes, et leur observation par microscopie à épifluorescence et CLSM ont été réalisés.

3.3.1 Principe de marquage des biofilms

Le principe de marquage des biofilms est d'ajouter *in situ* des molécules fluorescentes ou couplées à un fluorophore qui vont spécifiquement se lier aux structures du biofilm à mettre en évidence. L'excitation spectrale et la détection de la fluorescence émise par ces fluorophores donnent accès à la localisation des structures du biofilm en les rendant visibles.

Des marqueurs de cellules largement utilisés dans la communauté scientifique spécialisée sont les marqueurs SYTO[®] (Life Technologies[™], Molecular Probes[®]). Ce sont des fluorophores se liant aux acides nucléiques par intercalation entre les bases azotées. Ces molécules ont une fluorescence intrinsèque extrêmement faible qui est grandement augmentée en cas de liaison à un acide nucléique. En effet, leur rendement quantique de fluorescence est inférieur à 0,01 quand elles sont non liées, alors qu'il est supérieur à 0,1 quand elles sont liées (données fabricant). Ces fluorophores peuvent traverser toutes les membranes cellulaires, notamment celles des cellules de mammifères et des bactéries. Il existe toute une gamme de fluorophores SYTO[®], qui diffèrent les uns des autres par plusieurs caractéristiques, incluant perméabilité, sélectivité ADN/ARN, affinité de liaison et propriétés spectrales. Le fluorophore SYTO9 a démontré une capacité importante à pénétrer la membrane des bactéries aussi bien Gram-positives que Gram-négatives. Il est également un marqueur fréquemment utilisé dans les travaux sur les biofilms ; de par son autofluorescence nulle, il permet d'obtenir un signal spécifique et sensible avec un bon rapport signal sur bruit. C'est donc celui qui a été retenu pour la caractérisation des biofilms dans cette étude. Le pic d'émission du SYTO9 est à 498 nm, la lumière émise par ce fluorophore est donc verte. Ses propriétés spectrales sont données en annexe 7.

Les biofilms d'*E. coli* possèdent, comme tous les autres, une matrice extracellulaire constituée de molécules protéiques, d'exopolysaccharides, d'ADN extracellulaire (ADNe), d'eau et d'autres molécules présentes dans l'environnement dans lequel évolue le biofilm (chapitre 1). A ce jour, trois principaux exopolysaccharides constituant la matrice extracellulaire d'*E. coli* sont décrits : le poly- β -1,6-N-acétylglucosamine (PGA), l'acide colanique et la cellulose (Beloin et al, 2008). La synthèse de ces exopolysaccharides est par ailleurs requise pour le développement de biofilms d'*E. coli* K-12 sur des matériaux plastiques (Matthysse et al, 2008). La Figure 3.16 représente schématiquement la composition de la matrice extracellulaire d'*E. coli*.

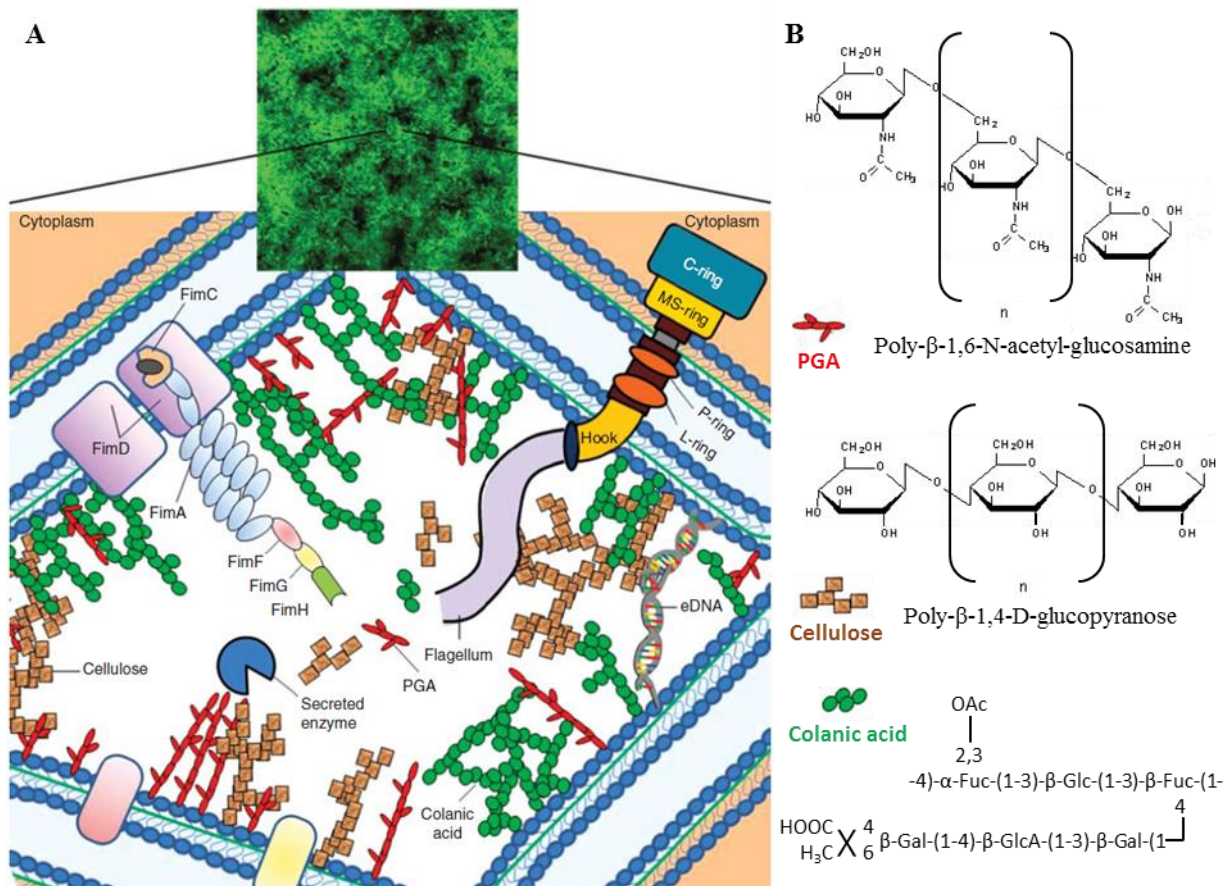


Figure 3.16. Composition de la matrice extracellulaire d'*E. coli*. (A) Représentation schématique proposée par Kostakioti et al, 2013. (B) Structures des trois exopolysaccharides de la matrice extracellulaire d'*E. coli*.

Il n'existe aujourd'hui encore aucun marqueur universel de matrice extracellulaire. Les structures protéiques et exopolysaccharidiques peuvent néanmoins être mises en évidence indépendamment. En effet, il est possible de marquer les composés protéiques avec des molécules comme le fluorophore FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (Invitrogen™, Molecular Probes®). Ce marqueur met en évidence de nombreux types protéiques, incluant entre autres les glycoprotéines, les phosphoprotéines, les lipoprotéines, les protéines liant le calcium et les protéines fibrillaires. Quant aux exopolysaccharides, il est possible de les marquer par l'intermédiaire de lectines, protéines se liant spécifiquement et de manière non covalente aux polysaccharides. Il existe bon nombre de lectines commercialement disponibles, différant les unes des autres par la cible avec laquelle elles interagissent et par les propriétés spectrales des fluorophores auxquels elles sont couplées. En effet, les lectines ne possèdent pas de fluorescence intrinsèque détectable en microscopie, elles doivent donc nécessairement être couplées à des fluorophores. Parmi les lectines existantes, la wheat germ agglutinin (WGA) se lie spécifiquement aux résidus N-acétylglucosamine et acide N-acétylneuraminique. Cette lectine est ainsi intéressante pour nos objectifs de marquage. En effet, la N-acétylglucosamine est l'unité de base du PGA, l'un des trois exopolysaccharides de la matrice extracellulaire d'*E. coli* (Figure 3.16). Nous avons donc dans un premier temps sélectionné la WGA couplée à l'Alexa Fluor® 633 pour mettre en évidence la matrice. Le pic d'émission de l'Alexa Fluor® 633 est à 647 nm, la lumière émise par ce fluorophore est donc rouge. Ses propriétés spectrales sont données en annexe 7.

Le SYTO9 et la WGA couplée à l'Alexa Fluor® 633 émettant à des longueurs d'onde de couleur différente, leur utilisation simultanée est possible afin de mettre en évidence les cellules et la matrice extracellulaire des biofilms. La Figure 3.17 présente schématiquement le principe de marquage.

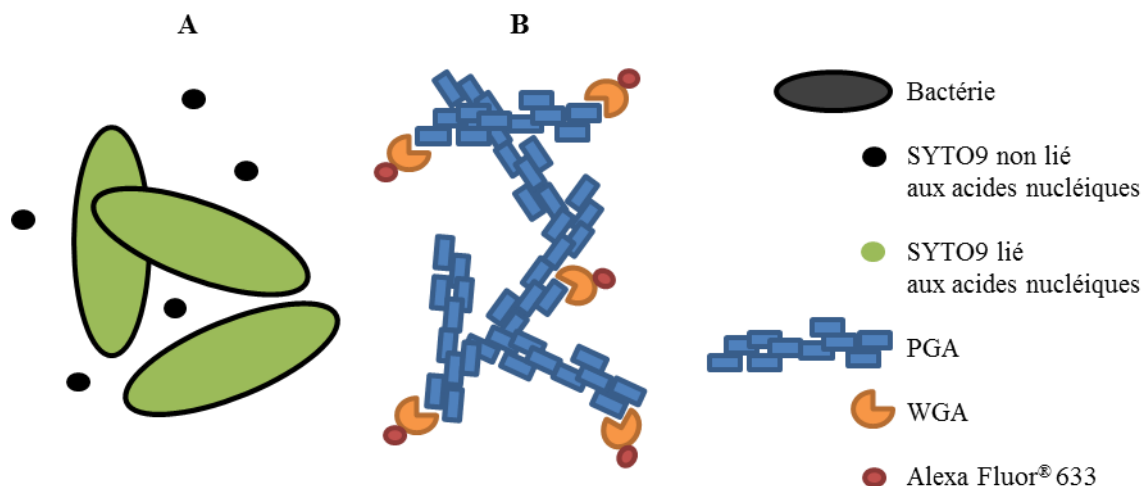


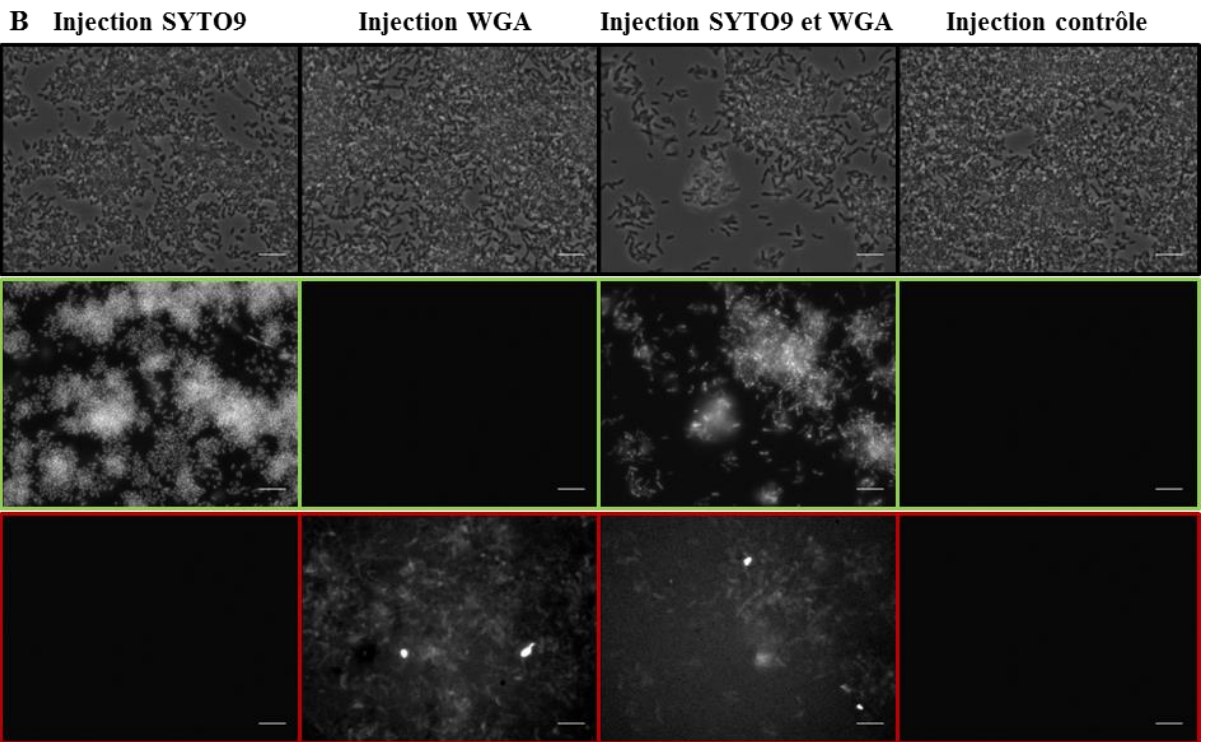
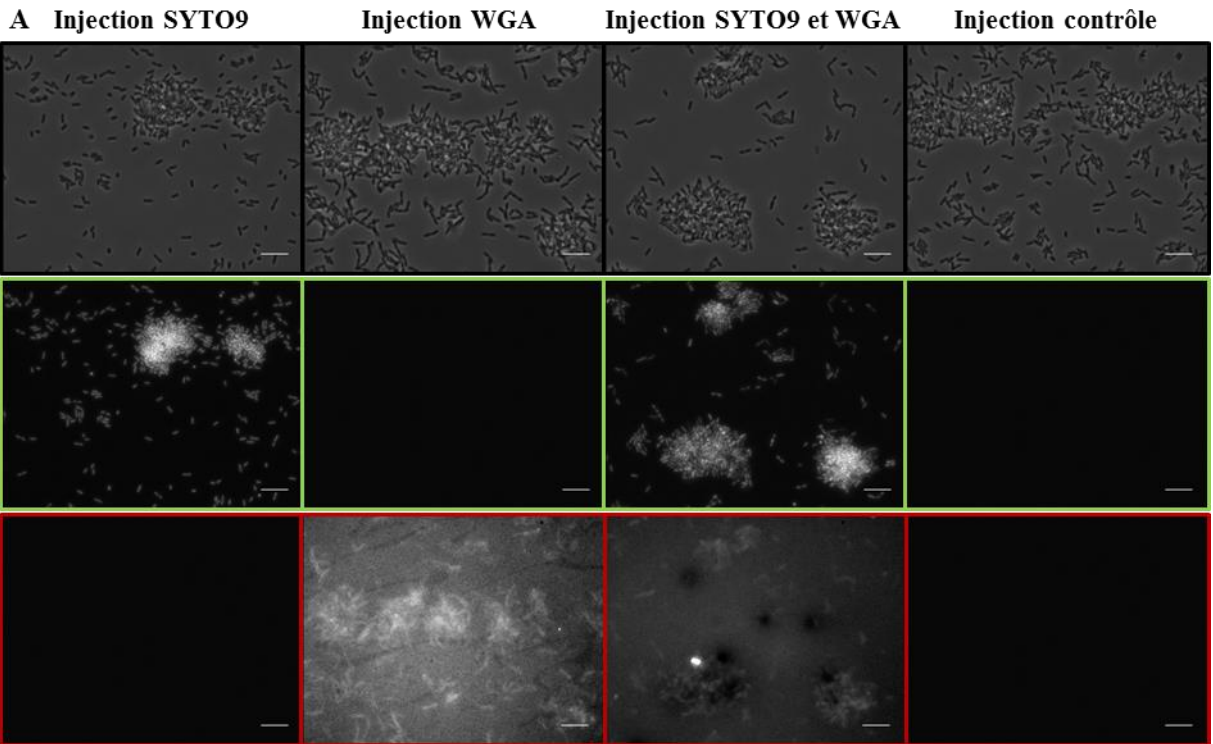
Figure 3.17. Principe de marquage des biofilms avec le SYTO9 et la WGA/Alexa Fluor[®] 633. Marquage (A) des bactéries et (B) de la matrice extracellulaire des biofilms. Le SYTO9 traverse la membrane des bactéries, se lie aux acides nucléiques à l'intérieur de la cellule et fluoresce. La WGA couplée au fluorophore Alexa Fluor[®] 633 se lie spécifiquement aux résidus N-acétylglucosamine du PGA.

En résumé, le SYTO9 pénètre les bactéries au sein desquelles il se lie aux acides nucléiques. Ainsi, tout signal de SYTO9 détecté rend compte de la présence des bactéries au sein du biofilm, mais il peut également indiquer la présence d'ADNe au sein de la matrice extracellulaire. La WGA se lie spécifiquement aux résidus N-acétylglucosamine, sous-unités de base du PGA. Couplée au fluorophore Alexa Fluor[®] 633, elle permet d'obtenir un signalement spécifique de PGA au sein de la matrice extracellulaire.

3.3.2 Marquage des biofilms *in situ*

Il convient tout d'abord de vérifier que les marqueurs sélectionnés sont efficaces sur nos biofilms, c'est-à-dire qu'ils mettent bien en évidence les bactéries et la matrice extracellulaire, et qu'il n'existe pas d'interférence entre eux.

Pour ce faire, nous avons réalisé une expérience de marquage, à 24, 48 et 72 h de croissance des biofilms (chapitre 2 section 2.4.2). Le premier canal reçoit une injection du marqueur SYTO9, le second une injection du marqueur WGA/Alexa Fluor[®] 633 et le troisième une injection des deux marqueurs en mélange. Le dernier canal est le canal de contrôle ne recevant que le milieu de culture. Des observations par microscopie à épifluorescence sont réalisées, avec un filtre FITC et un filtre Cy5 pour la détection respective de SYTO9 et de WGA/Alexa Fluor[®] 633. Les résultats sont présentés en Figure 3.18.



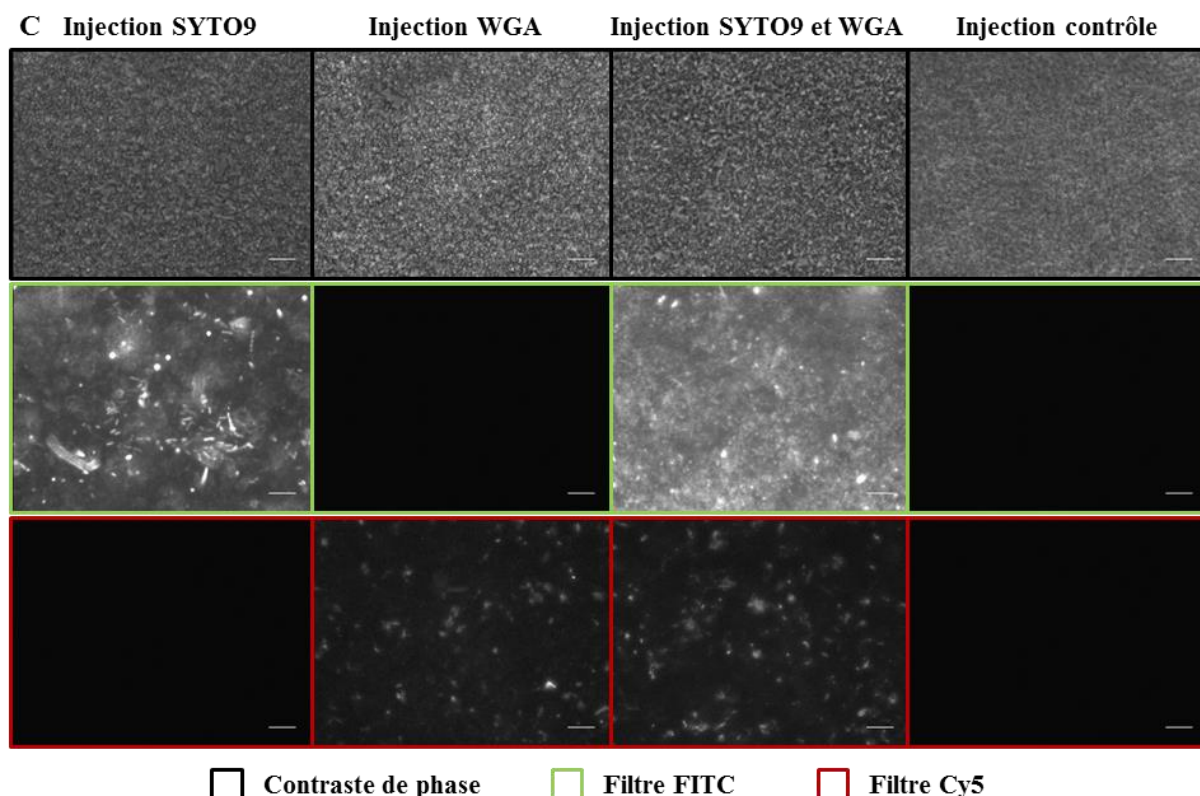


Figure 3.18. Marquage des biofilms avec le SYTO9 et la WGA/Alexa Fluor® 633. Les photomicrographies sont acquises à 24 (A), 48 (B) et 72 h (C) de croissance des biofilms. Les encadrements noirs sont les acquisitions en microscopie optique de plein champ avec anneau de contraste de phase. Les encadrements verts sont les acquisitions en microscopie à épifluorescence avec filtre FITC. Les encadrements rouges sont les acquisitions en microscopie à épifluorescence avec filtre Cy5. L'expérience de marquage consiste en l'injection des marqueurs, suivie d'une incubation de 30 min et d'un lavage de 15 min. Les concentrations de SYTO9 et de WGA injectés sont respectivement de 7,5 µM et de 100 µg/mL. Les barres d'échelle représentent 10 µm.

L'observation globale des biofilms en microscopie de plein champ à contraste de phase montre que les biofilms à 24, 48 et 72 h de croissance ont une morphologie similaire entre les différents canaux ; les marqueurs ne perturbent donc pas la structure des biofilms. A 24 et 48 h de croissance, les images du canal SYTO9 révèlent un marquage spécifique et nettement détectable avec le filtre adéquat, avec une définition à la bactérie près et un bon rapport signal sur bruit. Ce rapport est contrôlé lors de l'acquisition et s'observe dans les images par un fort contraste entre le signal émis et le fond. A 72 h de croissance, la définition des bactéries est en revanche moins nette, le rapport signal sur bruit est plus faible. Ceci s'explique par le fait que les biofilms sont plus denses à ce temps : on collecte la fluorescence émise par les objets lumineux qui sont beaucoup plus nombreux à 72 h qu'à 24 et 48 h, la superposition du signal provenant de tous les plans du biofilm au plan d'observation diminue par conséquent le rapport signal sur bruit et altère la netteté de l'image. Des observations similaires s'effectuent pour le marquage avec la WGA, avec cependant un rapport signal sur bruit plus faible pour ce marqueur. Par ailleurs, le signal émis par SYTO9 n'est pas détecté par le filtre Cy5 et celui émis par WGA/Alexa Fluor® 633 n'est pas détecté par le filtre FITC, comme le montrent les images sans signal des canaux 1 et 2 à 24, 48 et 72 h de croissance. La détection du signal dans chaque canal pour chaque filtre est donc spécifique du marqueur mis en évidence par ce filtre. Finalement, on n'observe pas d'interférence entre les deux marqueurs à 24, 48 et 72 h de croissance. En effet, les images obtenues avec le filtre FITC sont semblables pour les canaux 1 et 3 et celles avec le filtre Cy5 sont semblables pour les canaux 2 et 3 à ces temps. Ces résultats démontrent donc que le marquage des cellules et de la matrice extracellulaire à 24, 48 et 72 h de croissance des biofilms est spécifique.

Ayant vérifié en microscopie optique à épifluorescence le succès et la spécificité de marquage par SYTO9 et WGA à 24, 48 et 72 h de croissance, il est nécessaire d'optimiser la concentration de ces marqueurs. Nous ferons cette optimisation à 72 h de croissance car c'est à ce moment que les expériences de dispersion seront réalisées. Il convient donc de choisir une concentration de ces marqueurs révélant la totalité des structures des biofilms à 72 h de croissance.

3.3.3 Détermination des concentrations d'utilisation des marqueurs

3.3.3.1 Concentration en SYTO9

Dans un premier temps, un essai de détermination de concentration du marqueur cellulaire SYTO9 a été effectué. La gamme de concentration d'utilisation du SYTO9 suggérée par le fournisseur pour marquer les cellules bactériennes est de 50 nM à 20 μM . Dans la littérature, la concentration en SYTO9 utilisée pour marquer les bactéries au sein des biofilms est de l'ordre de 1 μM . Tenant compte de ces informations, nous avons testé différentes concentrations de SYTO9 : 7,5 ; 15 ; 37,5 et 75 μM . Les résultats sont présentés en Figure 3.19. L'expérience de marquage a été réalisée comme décrit au chapitre 2 section 2.4.2.

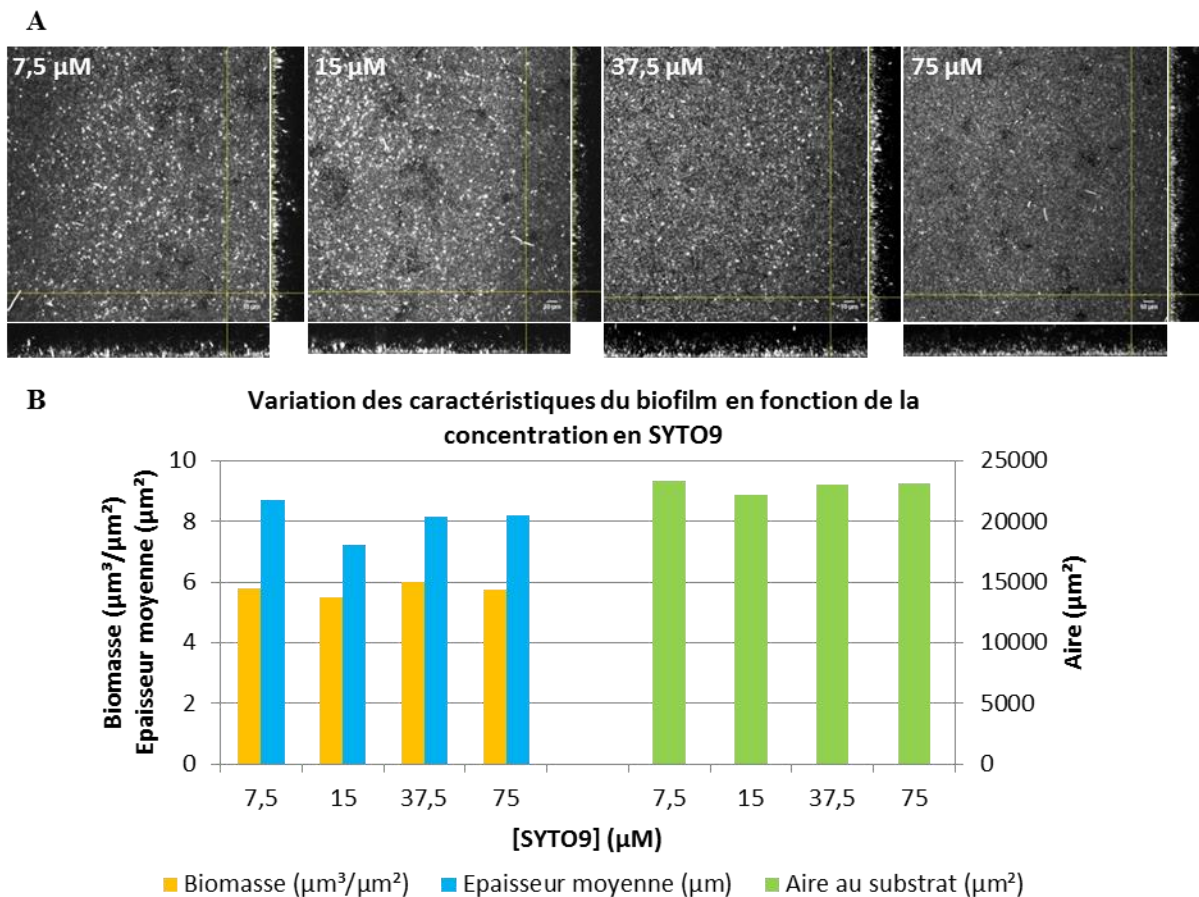


Figure 3.19. Comparaison du marquage des biofilms en fonction de la concentration en SYTO9. (A) Vues du dessus des biofilms au niveau du substrat avec coupes orthogonales X et Y (représentées par les traits jaunes dans les images) pour les concentrations en SYTO9 de 7,5, 15, 37,5 et 75 μM . (B) Biomasse, épaisseur moyenne et aire de recouvrement du substrat (première couche de biofilms à 0 μm d'épaisseur) des biofilms en fonction de la concentration en SYTO9, calculées avec le logiciel COMSTAT. Les barres d'échelle sont de 10 μm . Les images sont acquises en CLSM, avec le microscope confocal SP2. L'expérience de marquage est décrite au chapitre 2 section 2.4.2.

Tout d'abord, les images des biofilms au niveau du substrat sont semblables quelle que soit la concentration de SYTO9 ; le marqueur atteint donc les couches profondes du biofilm à toutes les concentrations, en révélant une définition à la bactérie près sur la couche initiale du biofilm (Figure 3.19A). Ce constat indique une diffusion facile de petites molécules à travers le biofilm. Ensuite, les biomasses (en tant que volumes de biomasse par unité de surface), les épaisseurs moyennes et les aires de recouvrement du substrat des biofilms sont du même ordre de grandeur à toutes les concentrations, comme le montre la Figure 3.19B. La concentration de 7,5 μM est donc retenue pour le marquage des bactéries au sein du biofilm avec le SYTO9.

3.3.3.2 Concentration en WGA

Dans un deuxième temps, un essai de détermination de concentration du marqueur de matrice extracellulaire WGA a été effectué. La gamme de concentration d'utilisation de la WGA recommandée par le fournisseur est de 1 à 10 $\mu\text{g/mL}$, dans le cas spécifique de marquage de structures eucaryotes. En revanche dans la littérature, la concentration de WGA utilisée pour marquer le PGA au sein de la matrice extracellulaire des biofilms est de l'ordre de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Leriche et al, 2000 ; Hall-Stoodley et al, 2008). Tenant compte de ces informations, nous avons testé différentes concentrations de WGA : 100, 200, 500 et 1000 $\mu\text{g/mL}$. Les résultats sont présentés en Figure 3.20. Pour plus d'informations sur l'expérience de marquage, consulter la section 2.4.2 du chapitre 2.

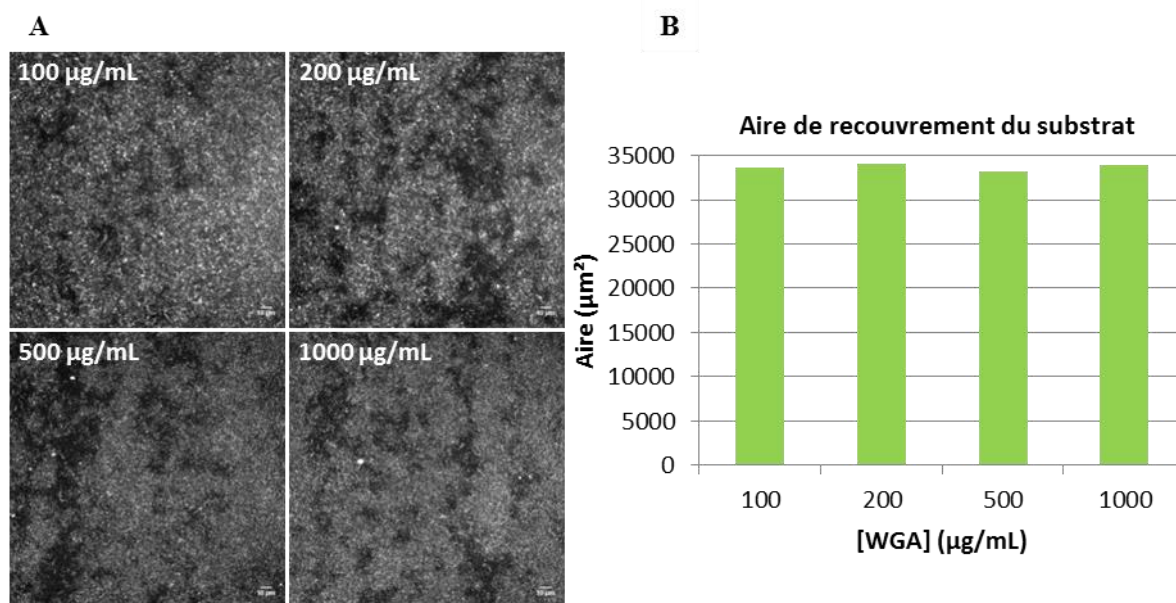


Figure 3.20. Comparaison du marquage de la matrice extracellulaire des biofilms en fonction de la concentration en WGA. (A) Vues du dessus des biofilms au niveau du substrat pour les concentrations en WGA de 100, 200, 500 et 1000 $\mu\text{g/mL}$. (B) Aire de recouvrement du substrat (première couche de biofilms à 0 μm d'épaisseur) en fonction de la concentration en WGA, calculée avec le logiciel COMSTAT. Les barres d'échelle sont de 10 μm . Les images sont acquises en CLSM, avec le microscope confocal SP2. L'expérience de marquage est décrite au chapitre 2 section 2.4.2.

Les images des biofilms au niveau du substrat sont similaires quelle que soit la concentration de WGA ; celui-ci marque donc bien les structures matricielles profondes du biofilm à toutes les concentrations (Figure 3.20A). De plus, l'aire recouverte au niveau du substrat par le PGA de la matrice du biofilm est du même ordre de grandeur pour les différentes concentrations testées (Figure 3.20B). On constate donc que l'on ne gagne pas d'informations supplémentaires avec une concentration en WGA supérieure à 100 $\mu\text{g/mL}$. Par souci d'économie et de bruit de fond du marquage, la concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$ est finalement retenue pour le marquage de la matrice extracellulaire des biofilms avec la WGA.

3.4 Caractérisation des biofilms marqués

Une fois les concentrations d'utilisation des marqueurs SYTO9 et WGA déterminées, nous souhaitons caractériser les biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique (22°C, 72 h de croissance, milieu M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA, débit de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$). La fraction de la biomasse associée aux bactéries et celle liée à la matrice extracellulaire ont été quantifiées. De plus, la fraction de la biomasse non viable a également été évaluée.

3.4.1 Caractérisation de la biomasse bactérienne

La caractérisation de la biomasse bactérienne des biofilms est présentée en Figure 3.21.

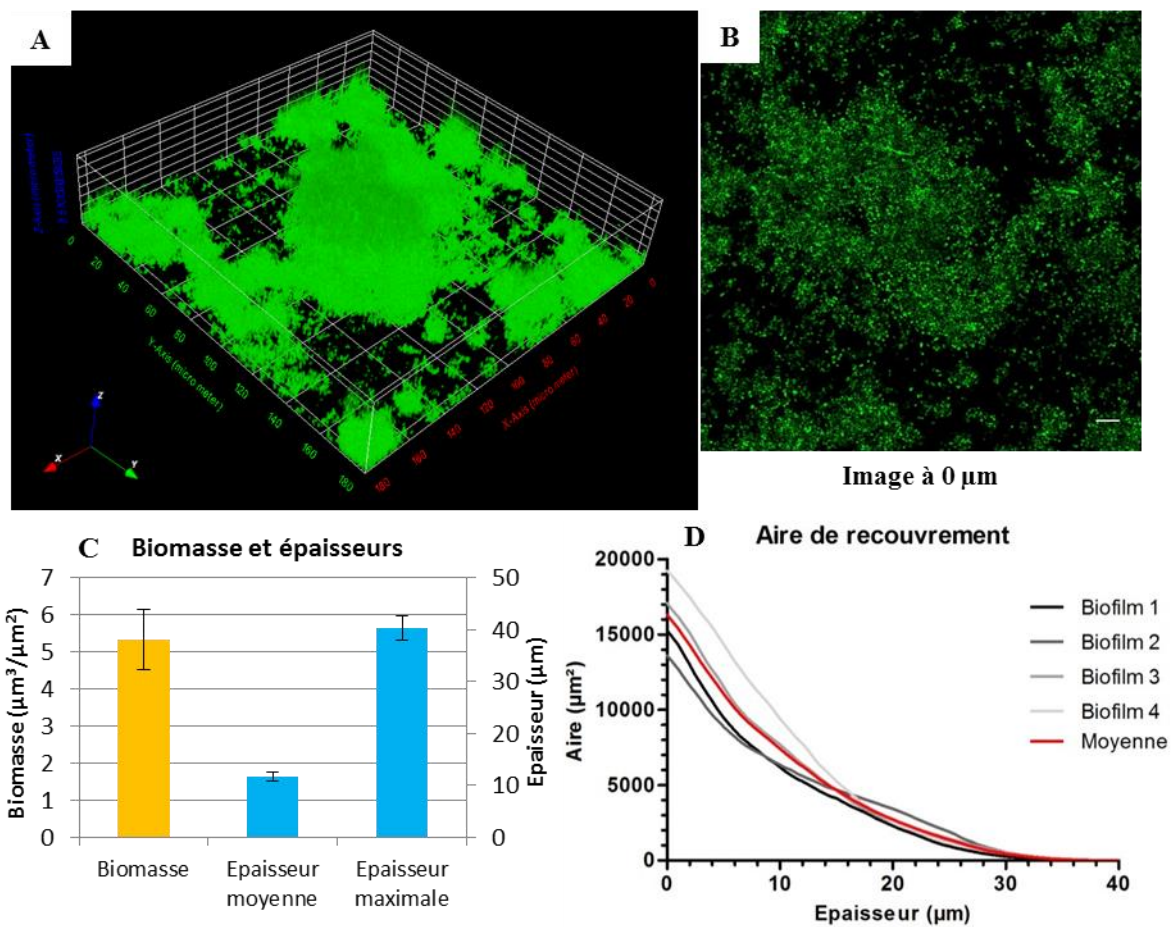


Figure 3.21. Caractérisation des biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique par marquage avec le SYTO9 à 7,5 μM . (A) Représentation tridimensionnelle d'un biofilm marqué, générée par le logiciel Icy. (B) Image à 0 μm (niveau du substrat) du biofilm. La barre d'échelle représente 10 μm . (C) Biomasse et épaisseurs moyenne et maximale du biofilm. Les moyennes sont calculées sur quatre régions distinctes du biofilm. (D) Aire de recouvrement du biofilm en fonction de l'épaisseur du biofilm (0 μm correspond au substrat). La moyenne est indiquée en rouge et est calculée pour quatre régions distinctes du biofilm (référées comme Biofilm 1, 2, 3 et 4). Les mesures en (C) et (D) sont déterminées avec COMSTAT. Les images sont acquises en CLSM, avec le microscope confocal SP8.

La Figure 3.21A montre la structure tridimensionnelle d'un biofilm d'*E. coli* marquée par le SYTO9.

La biomasse d'un biofilm de 72 h développé dans nos conditions est de $5,3 \pm 0,8 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (Figure 3.21C). Il présente une épaisseur moyenne de $11,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$ et une épaisseur maximale de $40 \pm 2 \mu\text{m}$ (Figure 3.21C). L'aire recouverte par la biomasse bactérienne d'un tel biofilm est de $16\,000 \pm 2\,000 \mu\text{m}^2$ au niveau du substrat (à 0 μm d'épaisseur) et diminue en s'éloignant de celui-ci (Figure 3.21D).

On constate néanmoins que le profil d'aire de recouvrement diffère légèrement selon la région observée du biofilm. Ceci révèle une hétérogénéité de morphologie des structures du biofilm.

3.4.2 Caractérisation de la matrice extracellulaire

3.4.2.1 Caractérisation par marquage à la WGA

La caractérisation de la matrice extracellulaire des biofilms (représentée par l'exopolymère PGA) est présentée en Figure 3.22.

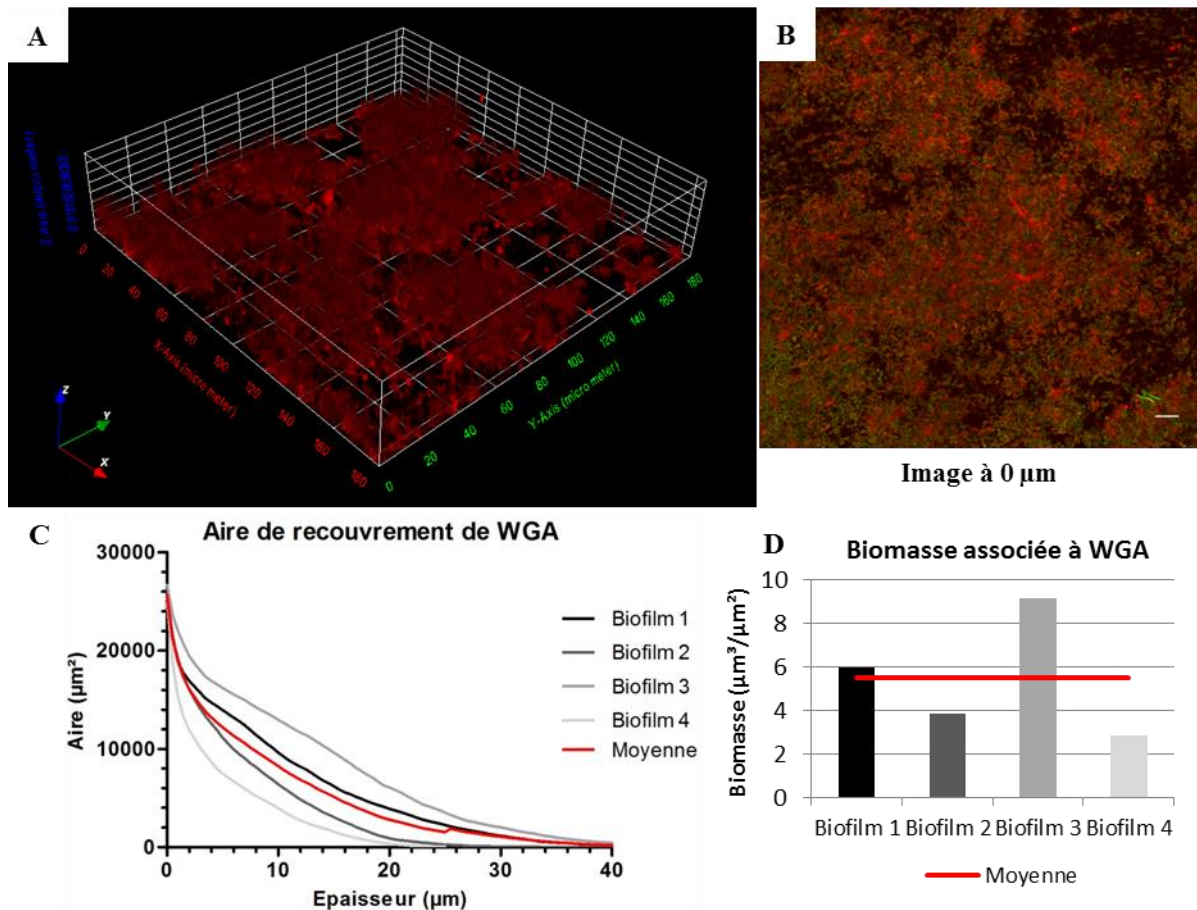


Figure 3.22. Caractérisation de la matrice extracellulaire des biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique par marquage avec la WGA/Alexa Fluor® 633 à 100 µg/mL. (A) Représentation tridimensionnelle du marquage de la matrice extracellulaire d'un biofilm, générée par le logiciel Icy. (B) Image à 0 µm (niveau du substrat) du biofilm. La souche utilisée ici est la souche BW25113 P1 (chapitre 2 section 2.1.2). La barre d'échelle représente 10 µm. (C) Aire de recouvrement des structures du biofilm marquées en fonction de l'épaisseur du biofilm (hauteur par rapport au substrat). (D) Biomasse associée à la matrice extracellulaire. Les moyennes sont indiquées en rouge et sont calculées pour quatre régions distinctes du biofilm (référées comme Biofilm 1, 2, 3 et 4). Les mesures en (C) et (D) sont déterminées avec COMSTAT. Les images sont acquises en CLSM, avec le microscope confocal SP8.

La Figure 3.22A montre la structure du biofilm marquée par la WGA. L'aire recouverte par la matrice associée est de $25\,600 \pm 800 \mu\text{m}^2$ au niveau du substrat (à 0 µm d'épaisseur) et diminue en s'éloignant de celui-ci (Figure 3.22C). Les structures étant bien définies, il est possible de calculer *via* COMSTAT une biomasse associée au signal WGA, c'est-à-dire associée au PGA de la matrice extracellulaire. La biomasse associée à la WGA pour un biofilm de 72 h est donc de $5 \pm 3 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ (Figure 3.22D).

Dans la Figure 3.22B, on observe à la fois la matrice marquée par la WGA (en rouge) et les bactéries fluorescentes de la souche BW25113 P1 (en vert). Les structures marquées par la WGA se retrouvent

sur le contour des bactéries et dans les interstices entre les bactéries. Comme expliqué au paragraphe 3.3.1, la WGA met en évidence les résidus N-acétylglucosamiques. Ainsi, l'observation nette et définie du pourtour des bactéries marqué par la WGA peut s'expliquer de la manière suivante : les résidus N-acétylglucosamine sont les composants élémentaires du PGA de la matrice extracellulaire d'*E. coli* ; cet exopolymère étant sécrété par la cellule, il paraît naturel qu'il se retrouve plus particulièrement sur le contour des bactéries.

En conclusion, le marquage des biofilms avec la WGA révèle l'exopolymère PGA de la matrice extracellulaire, liant les bactéries entre elles et au substrat, et donne une bonne définition de l'échafaudage dans lequel les bactéries se positionnent au sein du biofilm.

3.4.2.2 Caractérisation par marquage à la concanavaleine A

Une autre lectine, couplée au fluorophore Alexa Fluor[®] 488, a également été testée pour le marquage de la matrice extracellulaire d'*E. coli* : la concanavaleine A (ConA). La ConA se lie spécifiquement aux résidus D-mannopyranose et D-glucopyranose, le dernier constituant l'unité de base de la cellulose et se retrouvant également dans la structure de l'acide colanique (Figure 3.16 du paragraphe 3.3.1). La ConA est donc un candidat intéressant pour la mise en évidence de ces deux exopolymères au sein de la matrice extracellulaire d'*E. coli*. Le pic d'émission de l'Alexa Fluor[®] 488 est à 519 nm, la lumière émise par ce fluorophore est donc verte. Ses propriétés spectrales sont données en annexe 7.

La gamme de concentration d'utilisation de la ConA recommandée par le fournisseur est de 50 à 200 µg/mL, elle est spécifique d'applications immunohistochimiques. Par ailleurs dans la littérature, la concentration de ConA utilisée pour marquer la matrice extracellulaire des biofilms est de l'ordre de 100 µg/mL (Leriche et al, 2000). Tenant compte de ces informations et de l'étude déjà réalisée pour l'utilisation de WGA, la concentration de 100 µg/mL de ConA est choisie pour marquer les structures.

Par ailleurs, la WGA et la ConA sont les lectines liant spécifiquement les deux polysaccharides les plus fréquemment retrouvés dans les exopolymères bactériens (Leriche et al, 2000). L'utilisation simultanée de ces deux marqueurs semble donc être un outil intéressant pour la caractérisation de la matrice extracellulaire des biofilms développés dans ces travaux. Comme déjà vu, les marqueurs WGA et ConA sont couplés à deux fluorophores différents, respectivement l'Alexa Fluor[®] 633 et l'Alexa Fluor[®] 488. Ces deux fluorophores possèdent des spectres d'absorption et d'émission différents, leur utilisation peut donc être simultanée. Une expérience de marquage de la matrice extracellulaire des biofilms d'*E. coli* a été réalisée avec ces deux marqueurs, les résultats sont présentés en Figure 3.23.

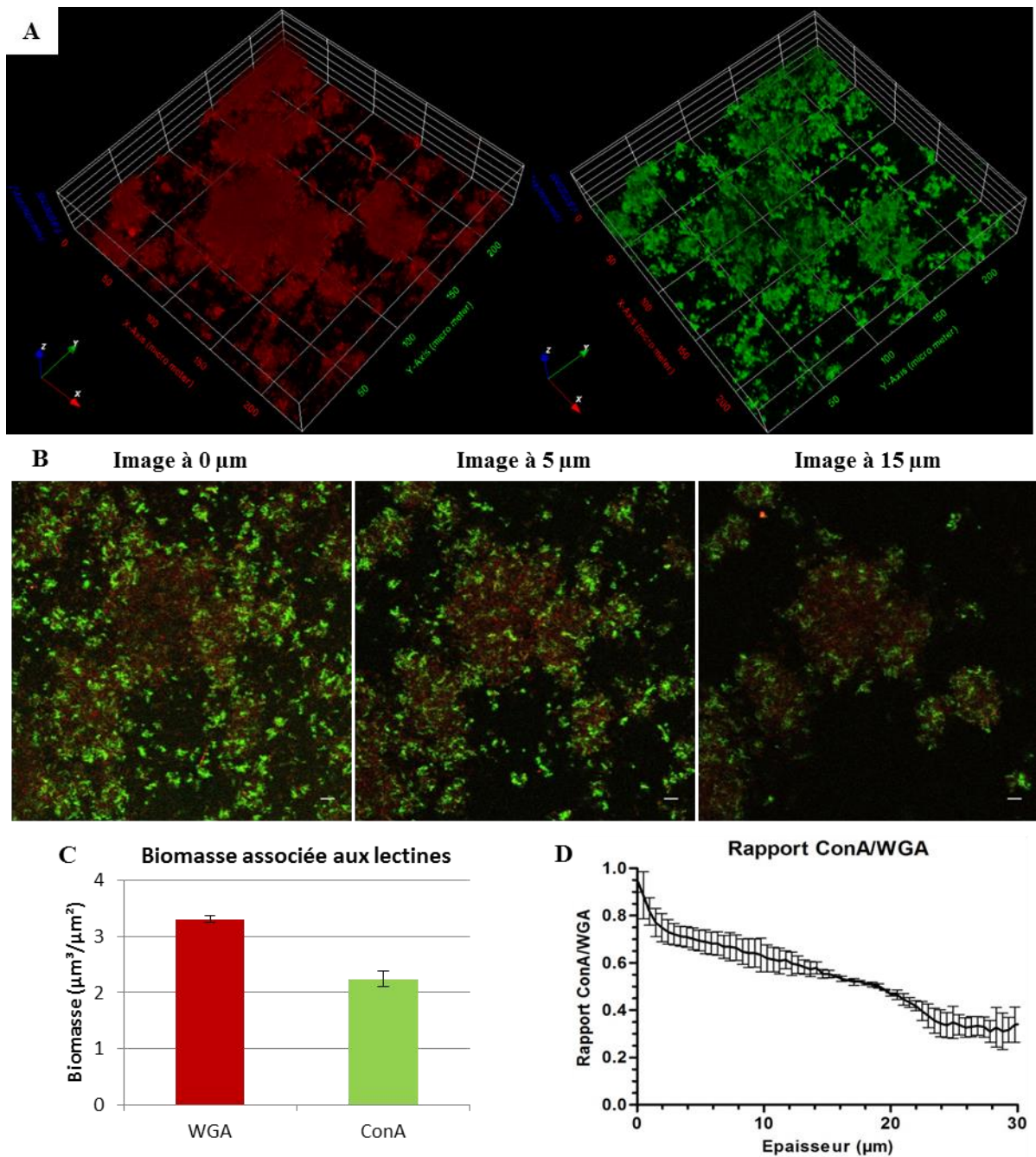


Figure 3.23. Caractérisation de la matrice extracellulaire des biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique par marquage simultané avec les lectines WGA et ConA. (A) Représentations tridimensionnelles du marquage de la matrice extracellulaire d'un biofilm avec la WGA (rouge) et la ConA (vert), générées par le logiciel Icy. (B) Images à hauteur fixée : 0 (niveau du substrat), 5 et 15 μm d'épaisseur du biofilm. Les structures marquées par la WGA apparaissent en rouge, celles marquées par la ConA en vert. Les barres d'échelle représentent 10 μm . (C) Biomasse associée à la matrice extracellulaire marquée par les lectines WGA et ConA. (D) Rapport d'aires de recouvrement entre les marquages ConA et WGA en fonction de l'épaisseur du biofilm. La concentration d'utilisation des marqueurs est de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les images sont acquises en CLSM, avec le microscope confocal SP2. La moyenne est issue de deux acquisitions.

Les deux lectines se positionnent à des endroits distincts et sont présentes de manière différente au sein de la matrice extracellulaire. En effet, d'une part, les structures mises en évidence par la WGA semblent plus centrales au sein des biofilms, alors que celles révélées par la ConA semblent plus périphériques (Figure 3.23A et B). D'autre part, le marquage avec la WGA semble plus diffus et homogène, alors que le marquage avec la ConA est regroupé et compact à certains endroits de la

matrice (Figure 3.23A et B). La biomasse extracellulaire marquée par la WGA est plus importante que celle marquée par la ConA : $3,30 \pm 0,06 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour le premier marqueur contre $2,2 \pm 0,1 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ pour le deuxième (Figure 3.23C). Les aires recouvertes par chacune des molécules pour chaque couche de biofilm sont également différentes ; le rapport de ces aires (ConA/WGA) est porté sur la Figure 3.23D et donne la proportion relative de matrice marquée par la ConA par rapport à celle marquée par la WGA. Ainsi, on observe globalement qu'il y a plus de structures marquées par la WGA que par la ConA dans toutes les couches du biofilm, et que cette tendance s'accroît en s'éloignant du substrat. En effet, le rapport ConA/WGA, de l'ordre de 1 au niveau du substrat, passe à $62 \pm 6 \%$ à $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur et à $46,7 \pm 0,7 \%$ à $20 \mu\text{m}$ d'épaisseur.

En conclusion, la biomasse associée à la WGA est plus importante que celle associée à la ConA. Par extension, le PGA est plus abondant dans la matrice extracellulaire d'*E. coli* que la cellulose et l'acide colanique pris ensemble. Par ailleurs, le PGA est uniformément réparti dans tout le volume du biofilm alors que la cellulose et l'acide colanique semblent regroupés en piliers, comme pour établir une structure de soutien (Figure 3.23B). Cependant, on ne peut distinguer la cellulose de l'acide colanique, ces deux exopolymères étant reconnus par la ConA.

3.4.3 Caractérisation de la biomasse bactérienne non-viable au sein du biofilm

3.4.3.1 Principe de marquage à l'iodure de propidium

L'une des caractéristiques intéressantes pour la description d'un biofilm est la proportion de bactéries non-viables qu'il comporte. Afin d'estimer ce paramètre, un essai en présence de deux fluorophores, le SYTO9 et l'iodure de propidium (IP), est réalisé. Ces deux marqueurs sont des molécules qui se lient aux acides nucléiques en s'intercalant entre les bases azotées, mais ils diffèrent par leurs propriétés spectrales et par leur aptitude à pénétrer les cellules. Le SYTO9 est capable de pénétrer les deux types de bactéries, cellules viables et non-viables. L'IP est uniquement capable de pénétrer les bactéries dont la membrane est endommagée et plus perméable ; il met en évidence les cellules non-viables. Ainsi, les bactéries non-viables se retrouvent doublement marquées. Le principe de marquage des biofilms avec le couple SYTO9/IP est présenté en Figure 3.24. Le pic d'émission de l'IP est à 617 nm , la lumière émise par ce fluorophore est donc rouge. Ses propriétés spectrales sont données en annexe 7.

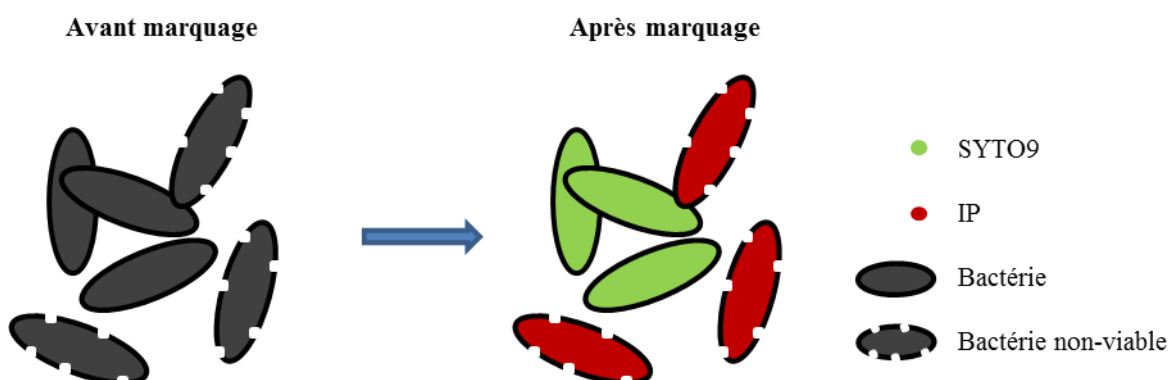


Figure 3.24. Principe de marquage des biofilms avec le couple SYTO9/IP. Le SYTO9 traverse la membrane de toutes les bactéries. L'IP pénètre quant à lui uniquement les bactéries non-viables.

L'IP émet dans le rouge alors que le SYTO9 émet dans le vert. Ainsi, après marquage des biofilms avec le couple SYTO9/IP, toutes les bactéries sont vertes ; en revanche, seules les bactéries non-viables sont rouges. Finalement, par recouvrement d'images des deux canaux d'émission, il est possible de déterminer la proportion de cellules non-viables au sein du biofilm.

3.4.3.2 Détermination de la proportion de bactéries non-viables

Afin de déterminer la proportion de cellules non-viables au sein des biofilms d'*E. coli* développés en microfluidique, un marquage avec le couple SYTO9/IP a été effectué après 72 h de croissance. Les résultats sont présentés en Figure 3.25.

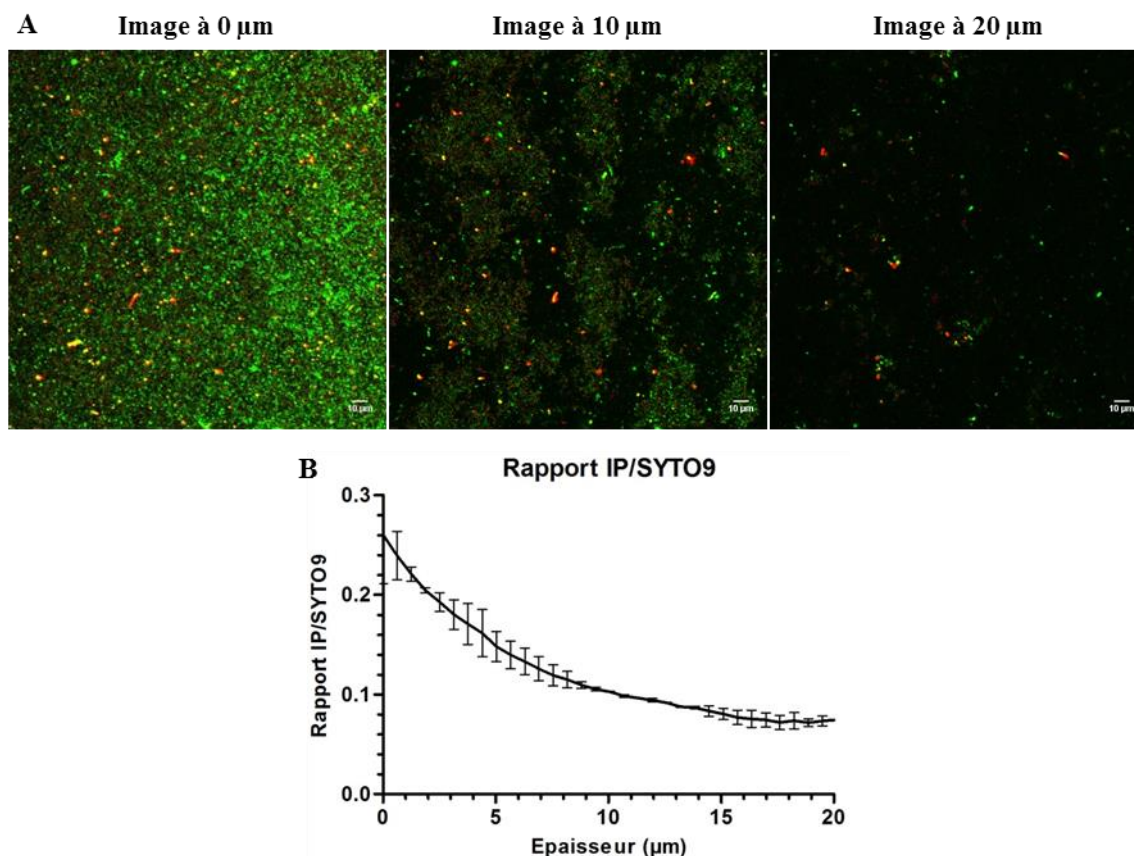


Figure 3.25. Caractérisation de la proportion de bactéries non-viables au sein des biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique par marquage simultané avec le SYTO9 et l'IP. (A) Images à hauteur fixée : 0 (niveau du substrat), 10 et 20 µm d'épaisseur du biofilm. Les bactéries marquées par le SYTO9 apparaissent en vert, celles marquées par l'IP apparaissent en rouge. (B) Rapport d'aires de recouvrement entre les marquages IP et SYTO9 en fonction de l'épaisseur du biofilm. Les concentrations d'utilisation des marqueurs SYTO9 et IP sont respectivement de 7,5 et 30 µM. Les images sont acquises en CLSM, avec le microscope confocal SP2. La moyenne est issue de deux acquisitions.

Visuellement, la quantité de bactéries marquées par l'IP (rouge) est inférieure à celle des bactéries marquées par le SYTO9 (vert), ce qui est tout à fait normal puisque le SYTO9 marque la totalité des bactéries, alors que l'IP ne marque que les bactéries non-viables dont la membrane est endommagée (Figure 3.25A). L'aire recouverte par chacun des marqueurs pour chaque couche du biofilm peut être calculée, et le rapport de l'aire correspondant à l'IP sur l'aire correspondant au SYTO9 donne la proportion de bactéries non-viables au sein du biofilm. Cette proportion diminue avec l'épaisseur du biofilm, en s'éloignant du substrat (à 0 µm d'épaisseur), passant de 26 ± 5 % au niveau du substrat, à $10,30 \pm 0,02$ % à 10 µm d'épaisseur, pour terminer à $7,5 \pm 0,2$ % à 20 µm d'épaisseur (Figure 3.25B). Les bactéries enfouies dans les couches profondes du biofilm sont donc plus susceptibles d'être non-viables que celles situées dans les couches élevées.

3.5 Discussion et perspectives du chapitre 3

Lors du choix de la cellule de flux, une légère différence a été observée entre les deux modèles à la fin de l'étape d'adhésion des bactéries. Ces premiers résultats semblent montrer plus de bactéries adhérentes au substrat après l'heure d'incubation pour la cellule ibidi[®] que pour la cellule « danoise » (section 3.1.3). Pour rappel, le matériau de support de la cellule ibidi[®] est du plastique hydrophobe (donnée constructeur) et celui de la cellule « danoise » est du verre (hydrophile). L'impact des propriétés des matériaux sur l'adhésion bactérienne est déjà bien connu (Song et al, 2015). Le caractère hydrophobe du substrat constitue l'une des caractéristiques qui peut avoir un impact sur le taux d'adhésion bactérienne. En effet, les interactions hydrophobes entre les bactéries et la surface du matériau jouent un rôle dans la colonisation de ce dernier lors de l'attachement microbien initial, notamment en favorisant les interactions de courte distance ayant lieu à cette étape du cycle de vie des biofilms (Katsikogianni et Missirlis, 2004). Le degré d'hydrophobicité des matériaux des cellules de flux pourrait donc être à l'origine des différences d'adhésion observées ici. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de regarder plus en détail l'étape d'attachement microbien au sein des cellules de flux, en réalisant des *time-lapses* en microscopie optique pendant l'heure d'incubation suivant l'inoculation des chambres, pour chacune des cellules. Par ailleurs, il serait informatif de connaître le niveau d'hydrophobicité relatif de chacun des matériaux, en effectuant par exemple des essais en goutte et en mesurant l'angle de contact entre le liquide et le solide (Lopes et al, 2005).

Le marquage *in situ* des biofilms avec les colorants SYTO9 et WGA à 24, 48 et 72 h de croissance a montré que les molécules n'affectaient pas la structure des biofilms par rapport au contrôle (injection de milieu de culture sans marqueurs). Cependant, les essais ne permettent pas de dire si le processus de marquage en lui-même affecte l'architecture des biofilms. Il faudrait pour cela avoir un contrôle supplémentaire de biofilms n'ayant pas reçu d'injection. Ainsi, afin de déterminer l'impact du procédé d'injection sur les biofilms, il serait utile de comparer des images de biofilms développés dans les mêmes conditions ayant ou non reçu une injection de milieu de culture. Une souche fluorescente telle que la souche BW25113 P5 permettrait de faire des acquisitions en CLSM pour cet essai et de quantifier la biomasse des biofilms ayant reçu une injection contre celle de ceux n'ayant pas reçu d'injection.

Ceci dit, une modification du procédé d'injection afin que celui-ci perturbe au minimum les biofilms serait une piste d'amélioration du système. Par exemple, il serait possible de connecter une vanne à deux entrées et une sortie en amont de chambre fluidique, dont une entrée est reliée au milieu de culture et l'autre à un récipient contenant la molécule à introduire dans la chambre. Le changement de position d'entrée de la vanne permettrait à l'utilisateur de choisir le fluide à introduire dans le canal. Cependant, ce procédé nécessiterait une quantité importante de molécules d'intérêt à introduire, puisqu'il faudrait assez de liquide pour remplir les tuyaux connectant le récipient à la vanne, passant nécessairement par la pompe péristaltique. Un autre système, analogue au procédé HPLC, serait d'introduire une boucle d'injection en dérivation juste en amont de la chambre, à l'aide d'une vanne à une entrée et deux sorties (Figure 3.26). Ceci permettrait de limiter la quantité de molécule utilisée en cours d'expérience en injectant juste le volume nécessaire dans la boucle d'injection.

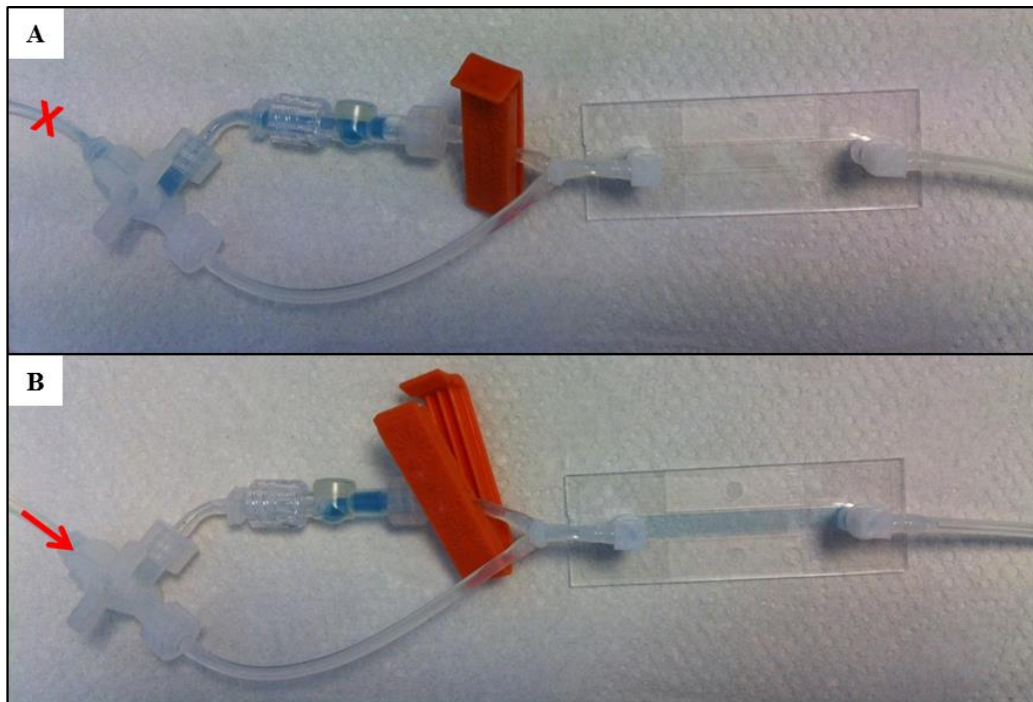


Figure 3.26. Procédé d'injection alternatif *via* boucle d'injection en dérivation. (A) La première étape du processus consiste en l'arrêt de la pompe péristaltique (croix rouge), en le clampage du tuyau d'entrée de chambre (clamp orange), en l'ouverture de la vanne sur la sortie de dérivation et en l'injection de la molécule d'intérêt dans la boucle d'injection à travers le micro-septum. (B) La seconde étape consiste en le déclampage du tuyau d'entrée de chambre et en la remise en marche de la pompe (flèche rouge).

La température d'incubation des biofilms a été un sujet important au cours de ces travaux. Alors que la température de 37°C a conduit de nombreuses fois à la formation de bulles au sein du système, celle de 22°C a démontré une meilleure reproductibilité dans le développement des biofilms au sein des chambres. Pour des raisons de simplicité (gestion de bulles) et reproductibilité, nous avons choisi cette dernière dans ces travaux. Toutefois, il ne paraît pas absurde d'étudier les biofilms d'*E. coli* à une telle température. En effet, celle-ci correspond à de multiples cas concrets où la formation de biofilms est problématique. De nombreux processus industriels s'effectuent à température ambiante au cours desquels des biofilms colonisent les canalisations et encrassent les équipements. C'est aussi à cette température que la distribution d'eau est opérée dans nos infrastructures. Autant d'environnements à température ambiante propices au développement de biofilms.

Les essais de marquage des biofilms avec le SYTO9 et la WGA en CLSM ont permis la caractérisation de la biomasse bactérienne et de celle associée à (une partie) de la matrice extracellulaire, respectivement. Ces deux fluorophores émettant à des longueurs d'onde différentes – émission dans le vert pour le SYTO9 et dans le rouge pour la WGA couplée à l'Alexa Fluor® 633 – il est possible de les utiliser simultanément. Ainsi, il serait intéressant de conduire des expériences de marquage avec ces deux marqueurs en CLSM sur des biofilms issus d'une même expérience. Ceci permettrait de quantifier la proportion de biomasse bactérienne et de celle associée à la matrice extracellulaire au sein des biofilms. Toutefois, les expériences de marquage indépendantes présentées ici semblent démontrer qu'il y a autant de biomasse bactérienne que de biomasse associée à la matrice au sein des biofilms (valeurs respectives de $5,3 \pm 0,8$ et $5 \pm 3 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), mais que l'aire de recouvrement au substrat (à 0 μm d'épaisseur) de la biomasse bactérienne est inférieure à celle associée à la matrice extracellulaire (valeurs respectives de $16\,000 \pm 2\,000$ et $25\,600 \pm 800 \mu\text{m}^2$). Il faudrait donc pouvoir vérifier ces résultats préliminaires en réalisant des essais de marquage des biofilms avec les deux marqueurs en simultané, sur une même expérience. Si ces résultats sont confirmés, cela pourrait dire

que les bactéries produisent une quantité importante d'exopolymères dans les couches profondes du biofilm, et notamment dans la première couche en contact avec le substrat, ceci permettant d'avoir un maillage d'attachement solide à la base du biofilm.

L'expérience de marquage de la matrice extracellulaire avec la WGA et la ConA en CLSM a permis une caractérisation différentielle de la matrice d'*E. coli*, avec la mise en évidence du PGA (WGA) pour l'une et de la cellulose et l'acide colanique (ConA) pour l'autre. Les résultats ont montré une organisation et une répartition différentes de ces exopolysaccharides au sein de la matrice. Des résultats similaires ont déjà été observés dans la littérature, que ce soit pour l'hétérogénéité de la matrice extracellulaire mise en évidence par le marquage avec différentes lectines (Lembre et al, 2012 ; Mlouka et al, 2016) ou l'attachement de lectines à des endroits distincts des microcolonies de biofilms (Lawrence et al, 2007). De plus, nos résultats ont montré plus de biomasse associée à la WGA que de biomasse associée à la ConA au sein des biofilms, autrement dit qu'il existe plus de PGA que de cellulose et d'acide colanique dans la matrice extracellulaire d'*E. coli*. Cependant, la ConA reconnaissant à la fois la cellulose et l'acide colanique, il n'est pas possible de distinguer ces deux exopolymères. Une façon de les discriminer serait de marquer la matrice extracellulaire avec une lectine plus sélective. Par exemple, la lectine PNA – isolée à partir d'arachide – se lie spécifiquement aux résidus β -galactose terminaux. L'acide colanique possède de tels résidus dans sa structure, résidus qui n'existent pas dans celle de la cellulose. Molecular Probes® distribue la lectine PNA couplée à différents fluorophores, dont l'Alexa Fluor® 594. Ce dernier émettant dans le rouge-orangé, il est donc possible de l'utiliser simultanément avec la ConA couplée à l'Alexa Fluor® 488 émettant dans le vert, et d'avoir ainsi accès à la proportion relative entre les exopolysaccharides cellulose et acide colanique au sein de la matrice extracellulaire pour une caractérisation plus fine de celle-ci.

L'expérience de marquage avec le couple SYTO9/IP en CLSM a permis la caractérisation de la biomasse bactérienne non-viable au sein des biofilms. Cette biomasse est de l'ordre de 25 % dans les couches profondes du biofilm (au substrat) et de moins de 10 % dans les couches plus élevées. Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car la proportion de bactéries non-viables dépend, notamment, de l'espèce microbienne, de l'âge et des conditions dans lesquelles évolue le biofilm. Cependant, la faible proportion de bactéries non-viables au sein des biofilms de la souche sauvage d'*E. coli* déterminée ici semble être en accord avec ce qui a pu être observé pour les biofilms de la souche CFT073 d'*E. coli* développés dans le dispositif de Calgary, où quelques bactéries non-viables seulement ont été détectées (Harrison et al, 2006).

Par ailleurs, le fait que cette biomasse non-viable soit plus importante en couche profonde qu'en couche élevée du biofilm pourrait être la conséquence de la présence plus importante d'ADN extracellulaire (ADNe) en couches profondes, mis en évidence par l'IP. En effet, d'une part, l'ADNe est un composant important des biofilms et son rôle dans la formation, le développement et la stabilité des structures a été démontré (Harmsen et al, 2010 ; Montanaro et al, 2011 ; Okshevsky et Meyer, 2015). D'autre part, l'IP ayant, d'après le fabricant, une affinité pour les acides nucléiques plus forte que celle du SYTO9, plus d'ADNe serait marqué par l'IP que par le SYTO9. Ainsi, la détection plus grande d'IP dans les couches profondes pourrait résulter d'une quantité plus grande d'ADNe à ces couches. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'ADNe est principalement trouvé dans les couches basses des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (Allesen-Holm et al, 2006) et par le fait que la lyse cellulaire, qui libère l'ADNe (Bayles, 2007), est plutôt observée dans les endroits enfouis des microcolonies de cette même espèce (Webb et al, 2003). Une façon de vérifier cette hypothèse serait de réaliser des expériences de marquage de la biomasse non-viable avec des marqueurs rendant compte de cette biomasse par des mécanismes différents de celui de l'IP. Par exemple, le marqueur FDA (fluorescein diacetate) est une molécule non fluorescente capable de traverser les membranes de

toutes les cellules, mais il est uniquement clivé dans celles viables ayant une activité métabolique (activité estérase) ; ce clivage conduit à l'apparition de produits fluorogènes. Ainsi, le FDA ne peut en aucun cas marquer l'ADNe. L'intérêt de l'utilisation de tels marqueurs a été démontré dans la caractérisation de la biomasse non-viable (Netuschil et al, 2014).

Finalement, la reproductibilité du marquage des biofilms dans nos conditions – quels que soient le marqueur utilisé, sa concentration ainsi que l'épaisseur, la structure ou l'âge des biofilms – démontre la facilité de pénétration et de diffusion de petites molécules au sein des biofilms, dans des temps relativement courts. Ceci a d'ailleurs été précédemment décrit : l'échelle de temps pour la diffusion de solutés non réactifs varie d'une fraction de seconde à des dizaines de minutes dans la plupart des biofilms (Stewart, 2003). Nos résultats suggèrent ainsi qu'une molécule de taille assez petite – comme l'acide *cis*-2-décénoïque (CDA) – peut diffuser jusque dans les couches profondes et les endroits enfouis du biofilm. La diffusion ne semble donc pas être un facteur limitant à l'action de molécules de petite taille dans les biofilms d'*E. coli* âgés de 72 h développés dans ces travaux. En outre, la diffusion rapide de molécules dispersantes telles que le CDA au sein des biofilms est une condition *sine qua non* pour une dispersion efficace et rapide.

3.6 Conclusion du chapitre 3

Les résultats de mise en place et d'optimisation d'un système microfluidique pour le développement de biofilms d'*E. coli* ont été décrits dans ce chapitre. Un soin tout particulier a été apporté au choix de la cellule de flux, constituant le bioréacteur. Les conditions d'opération du système ont ensuite été étudiées et optimisées, en termes de type, stratégie et volume d'inoculation, de concentration bactérienne de l'inoculum, de milieu de culture, de débit volumique d'alimentation et de température d'incubation.

Afin de caractériser les biofilms d'*E. coli*, en termes de cellules et de matrice extracellulaire, le choix et l'optimisation de la concentration des marqueurs ciblant ces derniers a été réalisée. Le SYTO9 a permis la quantification des bactéries au sein du biofilm. La WGA et la ConA ont permis de caractériser chacune une partie de la matrice extracellulaire des biofilms, en mettant en évidence respectivement les résidus N-acétylglucosamine du PGA et les résidus D-glucopyranose de la cellulose et de l'acide colanique. Le marquage avec l'IP a quant à lui permis de quantifier la fraction de bactéries non-viables au sein du biofilm. Ainsi, les biofilms d'*E. coli* développés dans nos conditions d'étude ont une biomasse bactérienne de $5,3 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$, une surface de recouvrement du substrat de $16\,000 \mu\text{m}^2$, une épaisseur moyenne de $11,7 \mu\text{m}$ et une épaisseur maximale de $40 \mu\text{m}$. La proportion de bactéries non-viables dans de tels biofilms au niveau le plus enfoui est de 26 % (au substrat) et diminue avec l'épaisseur des biofilms. Finalement, le marquage des biofilms avec la WGA a révélé que la biomasse de la matrice extracellulaire associée à cette lectine est de $5 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ et qu'elle recouvre le substrat sur une surface de $25\,600 \mu\text{m}^2$. Un marquage simultané avec la WGA et la ConA a montré en outre que la biomasse associée à ces lectines est distribuée de manière différente au sein des biofilms, avec un positionnement plutôt central pour WGA et plutôt périphérique pour ConA, et une répartition plutôt diffuse pour WGA et plutôt compacte pour ConA. Cette biomasse associée à la matrice extracellulaire est également plus importante pour la WGA que pour la ConA, avec des valeurs respectives de $3,3$ et $2,2 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$.

Ce chapitre a également permis de présenter pour la première fois les données de CLSM. En effet, les images acquises en CLSM peuvent être exploitées par des outils d'analyse d'images, et notamment par un outil dédié à la quantification des structures des biofilms, COMSTAT (présenté au chapitre 2). Les résultats calculés par COMSTAT présentés dans ces travaux sont dans ce chapitre et seront par la suite

exclusivement la biomasse ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$), les épaisseurs moyenne et maximale (μm) et les aires de recouvrement par couche de biofilm (μm^2). Les images qualitatives présentées sont traitées dans Icy et/ou ImageJ.

C'est finalement dans un tel système microfluidique mis au point avec le plus grand soin que les biofilms d'*E. coli* sont développés et que la dispersion est observée et caractérisée dans la suite de ces travaux.

4. Construction et caractérisation de rapporteurs génétiques pour l'étude de la dispersion

La seconde partie de mes travaux de thèse a consisté en la construction de souches spécifiques pour la caractérisation de la dispersion des biofilms d'*E. coli*. A mon arrivée au laboratoire de biologie et de pharmacologie appliquée (LBPA), la méthodologie de constructions génétiques chez *E. coli* était établie et j'ai pu profiter de la technologie en place pour développer mes propres souches. L'objectif de ce chapitre est donc de présenter la stratégie mise en œuvre pour élaborer, construire et caractériser les souches étudiées. En particulier, le chapitre explique d'abord la logique de sélection de gènes candidats pour caractériser la dispersion. Il décrit ensuite la stratégie générale de construction des souches. Il termine enfin sur la caractérisation des souches construites.

4.1 Sélection des candidats rapporteurs

L'objectif de ces travaux est de caractériser la dispersion des biofilms d'*E. coli* via la molécule modèle acide *cis*-2-décénoïque (CDA), comme expliqué au chapitre 1. Nous souhaitons effectivement caractériser la réponse bactérienne suite à l'application de la molécule en termes de changements d'expression génique et identifier ainsi des mécanismes de dispersion bactérienne. Il convient donc dans un premier temps de sélectionner des gènes possiblement impliqués dans le phénomène que nous souhaitons décrire ici, la dispersion.

Bien que la dispersion constitue la dernière phase du cycle de vie des biofilms, les mécanismes moléculaires impliqués à cette étape restent encore aujourd'hui peu connus (McDougald et al, 2012). En effet, les changements physiologiques et les procédés de régulation ayant lieu dans les biofilms matures sont mal compris (Ghigo, 2003). L'utilisation des technologies « omiques » ces dernières années a permis à de nombreux groupes de recherche d'étudier l'expression génique des biofilms d'*E. coli* à différentes phases de leur cycle de croissance (Kuchma et O'Toole, 2000 ; Schembri et al, 2003 ; Beloin et al, 2004 ; Ren et al, 2004 ; Prüß et al, 2006 ; Domka et al, 2007 ; Wood, 2009). Cependant, ces travaux n'ont pas considéré explicitement l'ensemble du cycle de vie des biofilms et les résultats n'incluent pas la phase dispersive. De plus, la diversité des modèles expérimentaux et conditions de culture de ces travaux ne permet pas de converger vers un profil transcriptomique type des biofilms d'*E. coli*.

Devant la complexité des régulations géniques des biofilms et la difficulté à sélectionner des gènes spécifiques rapportant la dispersion, un constat simple a été fait : la dispersion est la phase de transition entre bactéries sessiles et planctoniques et ces deux types de bactéries ont des phénotypes différents. Les cellules planctoniques forment une population plutôt homogène, sont isolées, possèdent une motilité et un métabolisme élevés, présentent une sensibilité aux antibiotiques et une faible virulence, alors que les cellules au sein des biofilms ont des caractéristiques opposées : population hétérogène, groupement en agrégats, motilité et métabolisme faibles, résistance accrue aux antibiotiques, virulence élevée (Barraud et al, 2015). Plus particulièrement, trois niveaux de phénotype sont considérés : (i) la matrice extracellulaire, (ii) la motilité et (iii) le métabolisme. En effet, les bactéries au sein des biofilms produisent une matrice extracellulaire que ne synthétisent pas les bactéries planctoniques. Ces dernières possèdent également une motilité et un métabolisme augmentés par rapport aux bactéries au sein du biofilm (Barraud et al, 2015). De plus, l'étude de Rahmani-Badi et collaborateurs parue en 2015 sur l'analyse transcriptomique après traitement au CDA chez *Pseudomonas aeruginosa* vient conforter notre choix de stratégie de sélection des candidats. En effet, l'étude révèle que les deux groupes de classification fonctionnelle dans lesquels les gènes sont les plus

positivement régulés au contact du CDA sont d'une part le groupe de métabolisme, d'autre part le groupe incluant motilité, chimiotaxie et biosynthèse du flagelle (Rahmani-Badi et al, 2015). La Figure 4.1 présente les gènes et opérons candidats à la caractérisation de la dispersion des biofilms d'*E. coli*, en fonction des trois niveaux phénotypiques considérés ici.

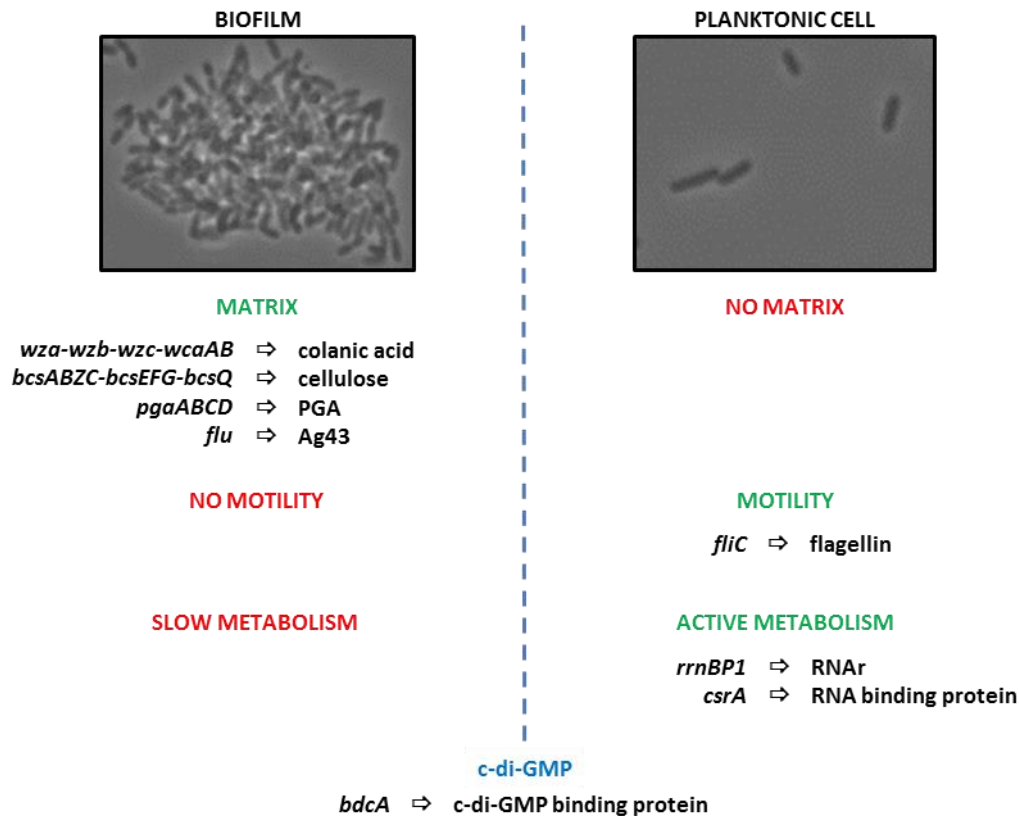


Figure 4.1. Gènes et opérons candidats pour caractériser la dispersion des biofilms d'*E. coli*. Les candidats sont classés en fonction de trois catégories phénotypiques : matrice extracellulaire, motilité et métabolisme.

Les gènes et opérons que nous avons choisis comme possibles candidats à la caractérisation de la dispersion des biofilms d'*E. coli* sont classés dans les trois catégories que sont la matrice extracellulaire, la motilité et le métabolisme actif (Figure 4.1). Cependant, un de nos candidats (décrit au paragraphe 4.1.3 est exclu de ce classement, le gène *bdcA*, codant pour une protéine interagissant avec le c-di-GMP. Ainsi, afin d'inclure et de décrire tous les candidats, un regroupement en trois sur-catégories est réalisé : (i) gènes caractéristiques d'un mode de vie sessile (partie gauche de la Figure 4.1), (ii) gènes caractéristiques d'un mode de vie planctonique (partie droite de la Figure 4.1) et (iii) gène caractéristique d'un état transitoire entre les deux modes de vie (médiane de la Figure 4.1). La première sur-catégorie comprend les gènes et opérons en lien avec la matrice extracellulaire, la seconde regroupe ceux en lien avec la motilité et le métabolisme, la dernière inclut le gène *bdcA*.

4.1.1 Gènes caractéristiques d'un mode de vie sessile

Les gènes caractéristiques d'un mode de vie communautaire considérés dans cette étude sont ceux impliqués dans l'adhésion des bactéries entre elles et au substrat ainsi que dans la production de la matrice extracellulaire des biofilms.

Le premier gène candidat que nous avons considéré est le gène *flu*, relatif à l'adhésion des bactéries entre elles et au substrat, codant pour une protéine d'auto-agrégation, l'antigène 43 (Ag43). En effet, l'Ag43 est une protéine de la surface cellulaire d'*E. coli* aux propriétés auto-agrégatives et adhésives

qui promeut la formation des biofilms de l'espèce (Pratt et Kolter, 1998 ; Kjærsgaard et al, 2000 ; Hasman et al, 2000). De plus, Schembri et collaborateurs montrent d'une part qu'une délétion du gène *flu* empêche la formation des biofilms d'*E. coli* et ce jusqu'à 42 h d'incubation, d'autre part que l'Ag43 est présent dans les cellules des biofilms de l'espèce et non dans les cellules planctoniques en phase exponentielle ou stationnaire de croissance (Schembri et al, 2003). Cependant, ceci est observé pour des biofilms d'âge inférieur à 42 h, on ne sait donc pas si la protéine est exprimée dans un biofilm plus âgé, de 72 h comme ceux développés ici. En effet, l'Ag43 est une protéine d'adhésion, d'auto-agrégation et de formation de microcolonies (Kjærsgaard et al, 2000 ; Hasman et al, 2000) qui n'est peut-être pas exprimée à toutes les étapes du développement du biofilm. Ce candidat n'est ainsi pas retenu pour nos travaux.

Des gènes candidats relatifs à la matrice extracellulaire sont ensuite sélectionnés ; ce sont principalement ceux impliqués dans les voies de biosynthèse et d'export des trois exopolysaccharides majeurs de la matrice extracellulaire d'*E. coli* : (i) le poly- β -1,6-N-acétylglucosamine (PGA), (ii) la cellulose et (iii) l'acide colanique.

- **PGA**

Le PGA est un polysaccharide extracellulaire stabilisant les biofilms d'*E. coli* et ceux d'autres espèces bactériennes (Wang et al, 2004). En effet, le polymère joue un rôle dans l'attachement aux surfaces et dans l'adhésion des bactéries entre elles. Chez *E. coli*, l'opéron *pgaABCD* code pour un ensemble de protéines nécessaires à la synthèse et à l'export du PGA (Wang et al, 2004). En particulier, la protéine PgaA est une porine de la membrane externe qui permet la translocation du PGA depuis le cytoplasme vers l'extérieur de la cellule (Itoh et al, 2008 ; Wang et al, 2016). Cependant, de précédents travaux ont mis en évidence que l'expression de l'opéron *pgaABCD* est post-transcriptionnellement réprimée par la protéine CsrA, qui se lie, déstabilise et inhibe la traduction des transcrits (Wang et al, 2005). Cette régulation post-transcriptionnelle ne permet donc pas ici de sélectionner des candidats relatifs au PGA pour la construction des rapporteurs de la matrice extracellulaire.

- **Cellulose**

La cellulose est un polysaccharide extracellulaire produit par de nombreuses espèces bactériennes. Les gènes *bcs* – pour « bacterial cellulose synthesis » – et en particulier les opérons *bcsABZC* et *bcsEFG* codent pour un ensemble de protéines impliquées dans la synthèse et l'export de la cellulose (Solano et al, 2002). Bien que certaines souches d'*E. coli*, telle la souche *E. coli* 1094, synthétisent la cellulose (Le Quéré et Ghigo, 2009), la souche *E. coli* K-12 de laboratoire ne produit la cellulose que dans certaines conditions particulières (Omadjela et al, 2013). De plus, environ la moitié des isolats d'*E. coli* ne produit pas de cellulose (Da Re et Ghigo, 2006). En effet, la présence d'un codon stop précoce dans le cadre de lecture du gène *bcsQ* restreint la production de cellulose chez *E. coli* (Kim et al, 2002 ; Serra et al, 2013 ; Nguyen et al, 2014). Par ailleurs, certaines protéines impliquées dans la formation des biofilms de l'espèce répriment sa production de cellulose (Ma et Wood, 2009). Ces constats ne nous confortent donc pas dans le choix de candidats relatifs à la cellulose pour notre étude.

- **Acide colanique**

L'acide colanique est un polysaccharide extracellulaire produit par la plupart des souches d'*E. coli* et par d'autres espèces des *Enterobacteriaceae* (Stevenson et al, 1996). Chez *E. coli* K-12, la production et l'export de l'acide colanique ne nécessitent pas moins de 19 gènes regroupés dans plusieurs opérons. Parmi ceux-ci, les unités de transcription *wcaAB* et *wza-wzb-wzc* codent respectivement pour des protéines impliquées dans les voies de biosynthèse et d'export de l'acide colanique. Ces protéines

sont notamment des enzymes de synthèse des monomères précurseurs de l'acide colanique, des glycosyl-transférases, des acétyl-transférases, des phosphatases, des lipoprotéines de la membrane externe ou encore des protéines de la membrane interne avec domaine de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP). Dans la pléthore de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse et d'export de l'acide colanique chez *E. coli*, un gène a tout particulièrement retenu notre attention : *wza*.

Le gène *wza* code pour la protéine Wza. Il s'agit d'une lipoprotéine intégrale de la membrane externe dont la région transmembranaire est une structure en tonneau α hélicoïdal (Dong et al, 2006). Wza fait partie de la famille des auxiliaires de la membrane externe et est reconnue comme protéine prototype des protéines d'export de polysaccharides de la membrane externe (Paulsen et al, 1997 ; Nickerson et al, 2014). Ces polysaccharides peuvent être sous forme de polymères sécrétés (exopolysaccharides) ou de polysaccharides capsulaires associés à la cellule. D'une part, l'opéron *wza-wzb-wzc-wcaAB* est sous le contrôle de l'opérateur RcsAB, régulateur essentiel de la biosynthèse des exopolysaccharides chez les bactéries entériques (Wehland et Bernhard, 2000). En particulier, le régulateur RcsA est un activateur de la synthèse du polysaccharide acide colanique capsulaire (Ebel et Trempey, 1999). D'autre part, la protéine Wza est requise pour l'expression de polysaccharides à la surface bactérienne chez *E. coli* ainsi que pour la translocation de l'acide colanique à travers la membrane externe (Paulsen et al, 1997 ; Whitfield et Paiment, 2003 ; Reid et Whitfield, 2005 ; Whitfield, 2006). Le gène *wza* semble donc être un bon candidat pour la construction d'un rapporteur caractéristique de la matrice extracellulaire sécrétée par les cellules en mode de vie communautaire. La Figure 4.2 présente le gène *wza* ainsi que le complexe protéique Wza dans le contexte de biosynthèse et d'export de l'acide colanique.

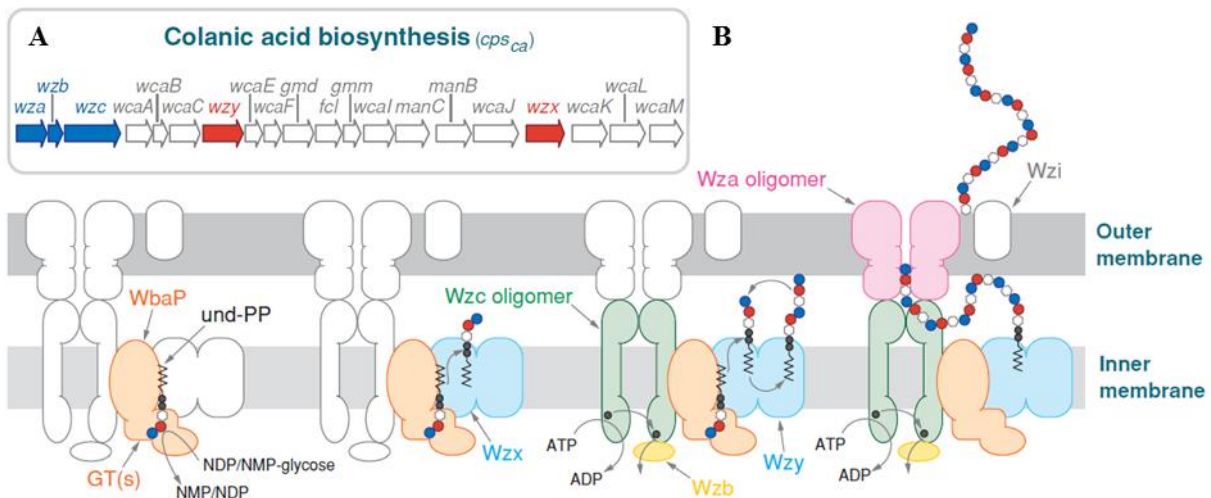


Figure 4.2. Le gène *wza* impliqué dans la biosynthèse et la protéine Wza impliquée dans l'export de l'acide colanique. (A) Organisation des gènes requis pour l'expression de l'acide colanique. Les gènes codant pour les protéines Wza, Wzb et Wzc impliquées dans le contrôle de la polymérisation et la translocation du produit depuis le cytoplasme vers la surface cellulaire sont indiqués en bleu. Les gènes codant pour les protéines membranaires intégrales Wzx et Wzy sont indiqués en rouge. (B) Modèle de biosynthèse et d'assemblage des capsules de groupe 1 et de groupe 4 (l'acide colanique est associé aux capsules de groupe 1). Les unités osiques de répétition liées aux lipides (und-PP) sont assemblées à l'interface entre le cytoplasme et la membrane interne à l'aide de glycosyl-transférases (GTs), puis « flippées » à travers la membrane par un procédé requérant Wzx. La polymérisation est alors effectuée par Wzy qui transfère les nouvelles unités de répétition à la chaîne en cours de synthèse. La polymérisation requiert également la transphosphorylation de résidus tyrosine C-terminaux dans l'oligomère Wzc et la déphosphorylation par la phosphatase Wzb. Le polymère est finalement transloqué par le complexe Wza agissant comme un canal. Les images de cette figure sont issues de la revue de Whitfield (Whitfield, 2006).

Le gène *wza* codant pour une protéine intervenant à la fin de la voie de biosynthèse de l'acide colanique – Wza est en effet impliquée dans l'export du polymère vers le milieu extérieur (Figure 4.2B) – cela suppose que lorsque Wza est produite, l'acide colanique est effectivement synthétisé par les bactéries qui le sécrètent alors dans la matrice extracellulaire des biofilms. En outre, la production d'acide colanique est essentielle pour la formation et le développement des structures tridimensionnelles complexes des biofilms d'*E. coli* (Danese et al, 2000 ; Whitfield, 2006). Le gène *wza* est finalement le candidat retenu dans ces travaux en tant que rapporteur caractéristique d'un mode de vie communautaire.

4.1.2 Gènes caractéristiques d'un mode de vie planctonique

Les gènes caractéristiques d'un mode de vie planctonique considérés dans cette étude sont ceux se rapportant aux deux phénotypes suivants : (i) motilité et (ii) métabolisme actif.

4.1.2.1 Motilité

La motilité est l'une des caractéristiques du mode de vie planctonique chez les microorganismes. Chez *E. coli*, la présence du flagelle est l'indication d'une motilité bactérienne active.

La synthèse du flagelle chez *E. coli* ne requiert pas moins de 14 opérons et plus de 50 gènes (Wei et al, 2001). Ces gènes s'expriment selon une hiérarchie à trois niveaux : gènes de classe 1, de classe 2 et de classe 3 (Kutsukake et al, 1990 ; Kalir et al, 2001). L'opéron master *flhDC* – qui est le premier à être activé dans la voie de biosynthèse du flagelle – code pour les sous-unités du tétramère FlhD₂C₂ qui reconnaît les promoteurs des gènes flagellaires de classe 2 (Komeda, 1986 ; Liu et Matsumura, 1994). Ceux-ci codent pour les protéines du corps basal et de l'ancre du flagelle ainsi que pour le facteur de régulation FliA, aussi dénommé σ^{28} , nécessaire à la transcription des gènes de classe 3 (Ohnishi et al, 1990). Ces derniers codent pour les protéines d'assemblage du filament flagellaire, de l'activité motrice et de la chimiotaxie ainsi que pour le facteur anti-sigma FlgM, inhibiteur de FliA (Hughes et al, 1993). L'organisation hiérarchique des gènes de synthèse du flagelle et la structure de l'organelle sont présentées en Figure 4.3.

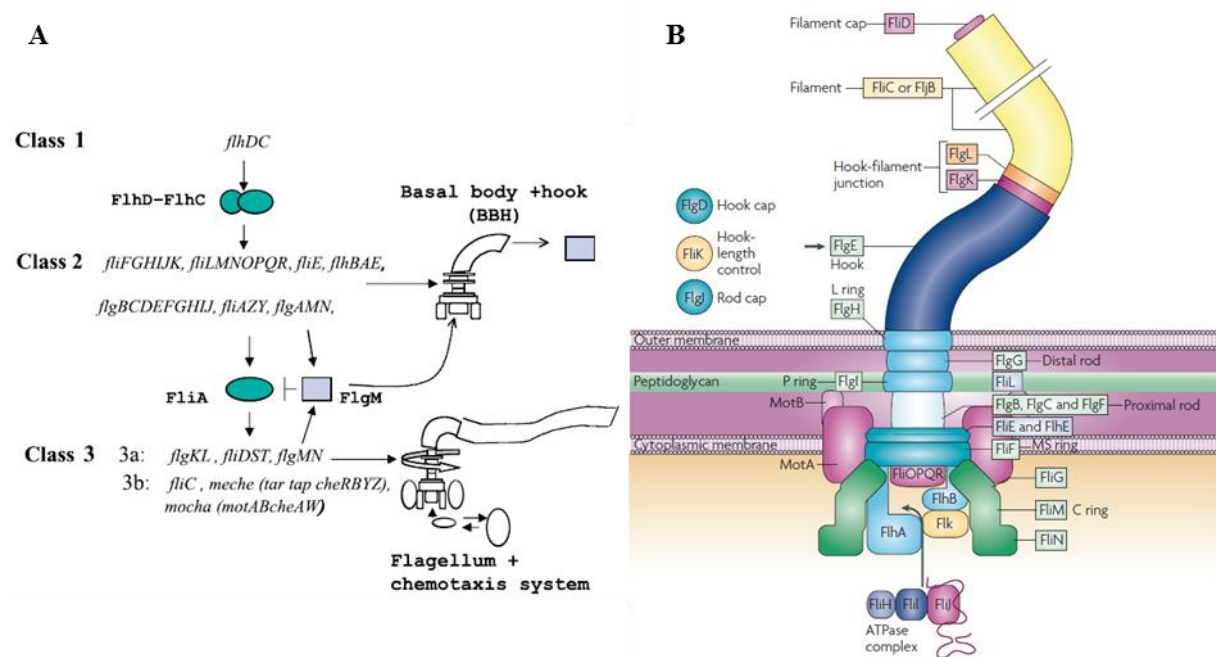


Figure 4.3. Expression de l'appendice flagellaire bactérien. (A) Hiérarchie génétique des opérons flagellaires chez *E. coli*. Le régulateur FlhDC active les gènes de classe 2 et l'un d'eux, codant pour FliA, active les gènes de classe 3. (B) Structure du flagelle bactérien dans le contexte de la paroi cellulaire. Les composants flagellaires présentés sont ceux de l'espèce bactérienne *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium. La figure en (A) provient des travaux de Kalir et collaborateurs, celle en (B) des travaux de Chevance et Hughes (Kalir et al, 2001 ; Chevance et Hughes, 2008).

Devant l'abondance de gènes requis pour une synthèse effective du flagelle chez *E. coli*, le choix d'un gène rapportant la motilité flagellaire repose sur l'axiome suivant : pour produire le flagelle, il faut nécessairement produire la protéine de structure du flagelle. De plus, comme l'appendice flagellaire résulte de la polymérisation d'une telle protéine, celle-ci doit être produite en grande quantité pour l'expression d'un phénotype flagellé.

Le gène *fliC* code pour la flagelline, protéine structurale du filament flagellaire (Komeda et Iino, 1979 ; Ohnishi et al, 1990). La flagelline constitue la sous-unité de base de polymérisation du flagelle. D'une part, les analyses *Western blot* et *Northern blot* de Lehti et collaborateurs démontrent respectivement la présence de la protéine FliC et de l'ARNm *fliC* dans les cellules planctoniques, en milieu de phase exponentielle, d'une souche pathogène d'*E. coli* cultivée à 37 et 20°C (Lehti et al, 2012). D'autre part, l'analyse *Western blot* menée par Hung et collaborateurs révèle la présence de la protéine FliC dans les bactéries planctoniques et son absence dans les biofilms de 72 h d'une souche uropathogène d'*E. coli* (Hung et al, 2013). De plus, une mutation dans le gène *fliC* induit l'inhibition de la biosynthèse du flagelle (Prigent-Combaret, 2000), prouvant que la protéine FliC est essentielle à la synthèse du flagelle et à la motilité. Enfin, un rôle possible du flagelle dans la dispersion de biofilms a été suggéré par certains chercheurs (Jackson et al, 2002 ; Houdt et Michiels, 2005). La sélection du gène *fliC* pour rapporter d'un état planctonique semble donc valable pour des expériences réalisées à température ambiante et l'expression du gène semble caractéristique d'un état planctonique motile. Par ailleurs, la flagelline constitue l'antigène flagellaire H utilisé pour sérotyper les souches d'*E. coli*. En effet, ses régions N et C terminales sont très bien conservées alors que sa région centrale, moins soumise aux pressions de sélection, est plus variable. L'utilisation de la flagelline pour le sérotypage des souches d'*E. coli* via l'antigène H indique que la protéine FliC est largement exprimée par les bactéries planctoniques de l'espèce, ce qui vient conforter le choix du gène *fliC* en tant que rapporteur dans notre étude.

4.1.2.2 Métabolisme

Un métabolisme accru est l'une des caractéristiques du mode de vie planctonique chez les microorganismes. Chez *E. coli*, deux gènes se révèlent être de bons candidats à la caractérisation du mode de vie planctonique en terme de métabolisme : *csrA* et *rrnBPI*.

- ***csrA***

Le gène *csrA* code pour une protéine de liaison à l'acide ribonucléique (ARN), régulant de manière globale la traduction et contrôlant le métabolisme du carbone, la formation de biofilms et la motilité de nombreuses espèces bactériennes. Chez *E. coli*, l'expression de *csrA* sert de signal général pour la dispersion des biofilms et semble favoriser un mode de vie planctonique. En effet, CsrA réprime la formation et active la dispersion des biofilms d'*E. coli* K-12 (Jackson et al, 2002), inhibe de façon post-transcriptionnelle l'opéron *pgaABCD* (Wang et al, 2005) et régule positivement la motilité en stimulant l'expression de l'opéron *flhDC* par un mécanisme post-transcriptionnel (Wei et al, 2001). Finalement, CsrA active la glycolyse, le métabolisme de l'acétate, la biosynthèse du flagelle et la dispersion de biofilms, alors qu'elle inhibe la gluconéogenèse, le métabolisme du glycogène, le transport de peptide et la formation de biofilms (Baker et al, 2007).

- ***rrnBP1***

Les bactéries au sein des biofilms présentent une activité métabolique plus faible que les bactéries planctoniques. La dispersion étant une étape du cycle de développement des biofilms faisant intervenir l'expression régulée de gènes (chapitre 1), les bactéries qui entrent en phase de dispersion doivent donc voir leur activité métabolique augmenter afin de produire le phénotype dispersé et retourner à un état planctonique. Si une molécule d'intérêt déclenche la dispersion active, elle peut induire une réactivation métabolique au sein des bactéries. En revanche, si cette molécule provoque une dispersion passive (détachement), elle n'induit pas de réactivation métabolique au sein de ces dernières, au moins sur le court terme. Dans ce dernier cas, la molécule disperse alors les biofilms par des mécanismes physicochimiques provoquant un relargage des bactéries du biofilm. Ainsi, même si on ne connaît pas encore le mécanisme ou le signal responsable de ce changement de style de vie, l'effet dispersant d'une molécule peut être évalué par la mesure du niveau d'activité métabolique des bactéries au sein des biofilms.

Dans tout organisme vivant, la synthèse et l'activité des ribosomes sont fondamentales à une activité métabolique. La Figure 4.4 présente la quantité de ribosomes par cellule en fonction de la vitesse de croissance chez *E. coli*. Celle-ci augmente avec la vitesse spécifique de croissance (Figure 4.4). Cette quantité constitue ainsi un indicateur de l'activité métabolique au sein des cellules et révèle l'état de croissance dans lequel se trouvent les bactéries. Un ribosome est constitué de protéines et d'acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr). Chez *E. coli*, il existe sept copies de l'opéron ARNr (Kiss et al, 1977), dont le mieux étudié est l'opéron *rrnB*. Deux promoteurs sont responsables de sa transcription : *rrnBP1* et *rrnBP2* (Gilbert et al, 1979). Le promoteur *rrnBP2* maintient un niveau basal d'expression et n'est pas directement sensible à la vitesse spécifique de croissance (Dennis et al, 2004). En revanche, le promoteur *rrnBP1* est quant à lui directement affecté par la vitesse spécifique de croissance : son expression augmente en même temps que cette dernière grâce à la régulation par la guanosine pentaphosphate (ppGpp), la protéine Fis et la topologie de l'ADN (Sarmientos et Cashel, 1983 ; Dennis et al, 2004).

doubling time (min)	ribosomes per cell	dry mass per cell (fg)	ribosome dry mass fraction (%)	ribosome fraction x doubling time (min)
24	72000	870	37	9.0
30	45000	640	32	9.5
40	26000	430	27	11
60	14000	260	24	14
100	6800	150	21	20

Figure 4.4. Nombre et fraction de ribosomes par cellule en fonction de la vitesse de croissance chez *E. coli*. Les valeurs sont arrondies à un chiffre significatif. Les valeurs de « ribosomes par cellule » et de « poids sec par cellule » proviennent du manuel « *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology » (Neidhardt, 1996). Les valeurs de « fraction de poids sec ribosomal » ont été calculées à partir de la masse ribosomale de 2,7 MDa (Yamamoto et al, 2006). Le tableau de cette figure est issu du site internet <http://book.bionumbers.org/how-many-ribosomes-are-in-a-cell/> qui s'appuie des travaux de Neidhardt et de Yamamoto et collaborateurs (Neidhardt, 1996 ; Yamamoto et al, 2006).

Le choix du candidat représentant un métabolisme actif s'est finalement porté sur le promoteur *rrnBP1* parce qu'il donne un accès immédiat à la quantité de ribosomes produite et donc à l'état d'activité métabolique dans lequel se trouvent les bactéries au sein du biofilm.

La construction de ce rapporteur a antérieurement été effectuée par Elisa Brambilla qui avait étudié le promoteur *rrnBPI* lors de son doctorat ; ce rapporteur est donc déjà disponible et caractérisé au laboratoire.

Au LBPA, il existe deux versions de la construction *rrnBPI* en fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur utilisé ici, celui de la GFPmut2 (voir section 4.2). La première contient le promoteur *rrnBPI* en entier et la deuxième est une version raccourcie de ce dernier dans laquelle il manque les séquences de fixation de la protéine Fis qui se trouvent en amont du site de fixation de l'ARN polymérase. L'expression du promoteur en fonction de l'état métabolique de la cellule est régulée par la ppGpp, la topologie de l'ADN et la quantité d'ARN polymérase disponible. La protéine Fis intervient pour augmenter l'expression lors de la transition qui a lieu pendant l'adaptation des cellules à un milieu plus riche (Zhang et Bremer, 1996). A plus long terme, la comparaison de l'activité de ces deux promoteurs au sein des biofilms pourra donner des informations intéressantes sur un rôle éventuel de la protéine Fis dans la régulation génique durant le processus de dispersion. La Figure 4.5 présente les versions longue et courte du promoteur *rrnBPI*.



Figure 4.5. Comparaison des versions longue et courte du promoteur *rrnBPI* (dénommé P1 sur la figure). La version longue comprend les sites de fixation de la protéine Fis ; il s'agit de la séquence allant de -190 à +7 sur le schéma. La version courte – appelée « short » – exclut les sites de fixation de la protéine Fis et un site de fixation de la protéine H-NS ; il s'agit de la séquence allant de -69 à +7 sur le schéma.

Les résultats présentés pour le promoteur *rrnBPI* dans la suite de ces travaux sont ceux issus d'expériences réalisées avec la souche *rrnBPI* short, c'est-à-dire avec la version courte du promoteur.

4.1.3 Gène caractéristique d'un état transitoire entre les deux modes de vie

Le bis-(3',5')-cyclic-dimeric-guanosine monophosphate (c-di-GMP) est un messager secondaire universel chez les bactéries (Römling et al, 2013). C'est une petite molécule intracellulaire rapidement diffusible qui transmet de l'information depuis un récepteur vers une cible. Le c-di-GMP est synthétisé par des diguanylate cyclases (DGC) à partir de deux molécules de guanosine triphosphate (GTP), et est dégradé par des phosphodiesterases (PDE) par clivage en 5'-phosphoguananylyl-(3'-5')-guanosine (pGpG) puis en deux molécules de guanosine monophosphate (GMP). En particulier, l'activité synthétique des DGC est associée à un domaine GGDEF hautement conservé tandis que l'activité hydrolytique des PDE à des motifs EAL et HD-GYP (Ausmees et al, 2001 ; Simm et al, 2004 ; Ryjenkov et al, 2005 ; Schmidt et al, 2005 ; Dow et al, 2006 ; Ryan et al, 2006). La Figure 4.6 présente la structure moléculaire du c-di-GMP, sa voie de régulation ainsi que ses fonctions physiologiques cibles.

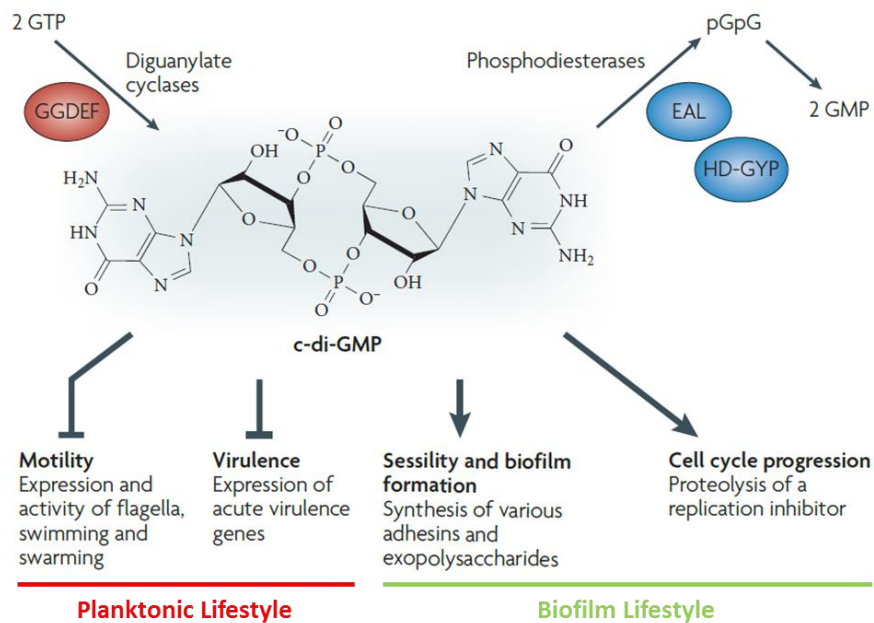


Figure 4.6. Structure, régulation et fonctions physiologiques du c-di-GMP. Le c-di-GMP est synthétisé à partir de deux molécules de GTP par des DGC à domaine GGDEF et est hydrolysé par des PDE à domaine EAL ou HD-GYP en pGpG puis en deux molécules de GMP. Le c-di-GMP inhibe la motilité et la virulence pendant qu'il active la formation de biofilms et la production d'exopolysaccharides. La figure est issue et adaptée de la revue de Hengge (Hengge, 2009).

Le c-di-GMP a été initialement découvert il y a trois décennies en tant qu'activateur de synthèse de cellulose chez la bactérie *Acetobacter xylinum* (Ross et al, 1987). Depuis, son activité régulatrice a été mise en lumière dans de nombreux processus microbiologiques, tels que le cycle cellulaire, la différenciation, la motilité, la virulence, la synthèse d'exopolysaccharides, l'interaction avec des hôtes eucaryotes ou encore la formation de biofilms. Les processus physiologiques influencés par le c-di-GMP sont donc nombreux et la plupart d'entre eux engagent un changement de style de vie des microorganismes (Römling et al, 2005 et comme indiqué sur la Figure 4.6).

Le c-di-GMP joue un rôle important dans la régulation des changements phénotypiques permettant la transition d'un mode de vie communautaire à un mode de vie planctonique. Plus particulièrement, c'est la concentration intracellulaire de c-di-GMP qui régule le mode de vie des bactéries : une augmentation de cette concentration facilite un mode de vie sessile, alors qu'une diminution favorise un mode de vie planctonique (modèle de Thormann et al, 2006). Ainsi, un faible taux intracellulaire de la molécule provoque un comportement motile et virulent alors qu'un fort taux intracellulaire promeut sessilité et persistance (Römling et Amikam, 2006). D'une part, la sessilité est induite par la production de composés adhésifs dans la matrice extracellulaire tels que les exopolysaccharides (Römling, 2002 ; Tischler et Camilli, 2004) ou les fimbriae (Kulasekara et al, 2005 ; Kader et al, 2006), et la persistance s'observe aussi bien dans l'environnement qu'au sein d'un organisme hôte (Goodman et al, 2004). Un récepteur au c-di-GMP est par exemple nécessaire pour la biosynthèse d'exopolysaccharides chez *Pseudomonas aeruginosa* (Lee et al, 2007b). D'autre part, le c-di-GMP réduit la motilité de nombreuses espèces bactériennes telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Caulobacter crescentus* ou *Escherichia coli*. Le messenger intervient en particulier dans la voie de régulation du flagelle chez *E. coli* en réduisant la vitesse de rotation du moteur flagellaire (Ryjenkov et al, 2006 ; Boehm et al, 2010 ; Paul et al, 2010). Le c-di-GMP constitue ainsi une piste à creuser pour identifier des gènes caractéristiques d'un état de transition entre biofilm sessile et bactérie motile. La Figure 4.7 présente les signaux environnementaux impactant la concentration intracellulaire de c-di-GMP ainsi que les voies de régulation cibles de la molécule.

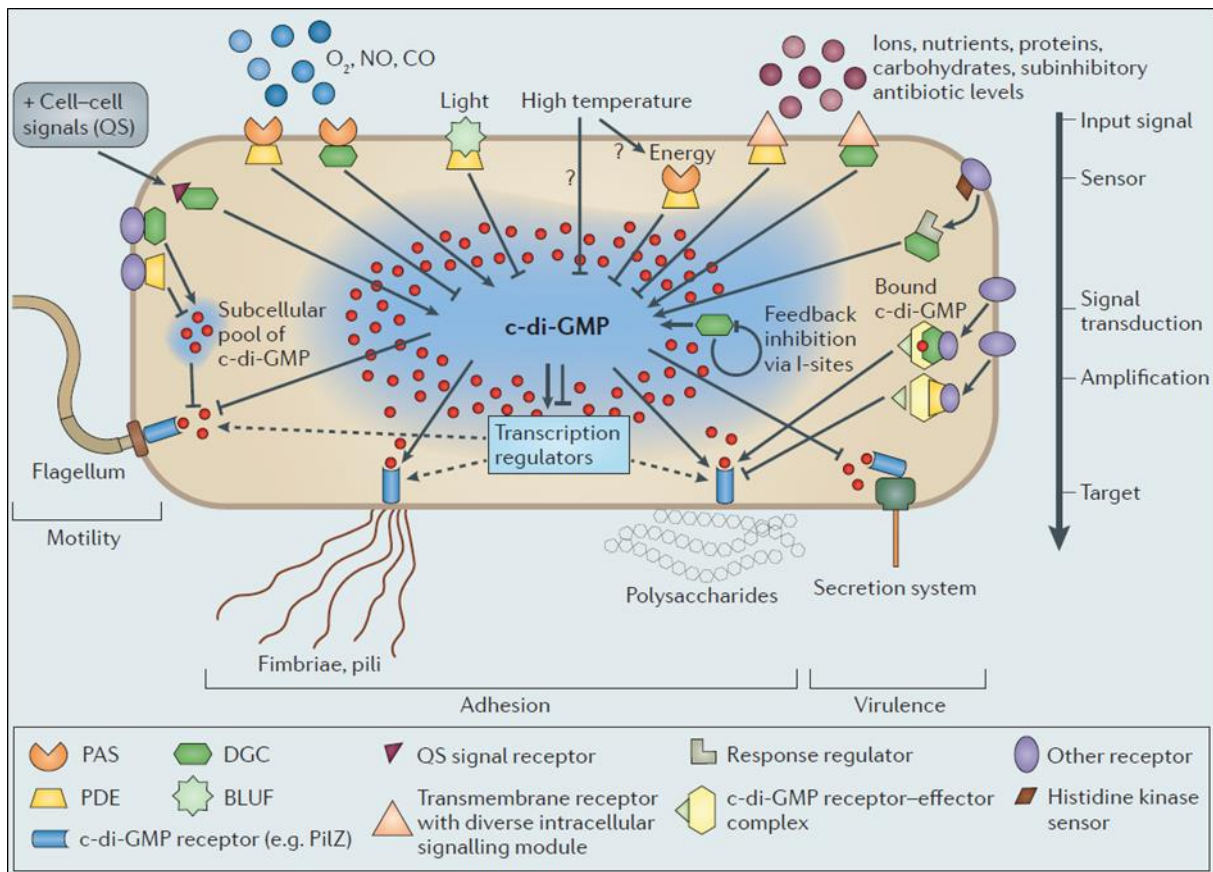


Figure 4.7. Signaux environnementaux impactant la concentration intracellulaire de c-di-GMP et voies de régulation cibles de la molécule. Des signaux environnementaux tels que la lumière, la température, la communication intercellulaire (QS pour « quorum sensing »), certains gaz (le dioxygène O₂, le monoxyde d'azote NO ou l'oxyde de carbone CO) et certaines molécules (ions, nutriments, protéines, carbohydrates ou antibiotiques) modulent la concentration intracellulaire de c-di-GMP par l'activité dynamique des enzymes DGC et PDE. Les PAS sont les récepteurs de ligands à domaine PER-ARNT-SIM et le BLUF est le senseur de lumière (« blue light using flavin »). Les voies de régulation dans lesquelles intervient le c-di-GMP sont principalement celles de la motilité, de l'adhésion et de la virulence. La figure est issue de la revue de McDougald et collaborateurs (McDougald et al, 2012).

Le c-di-GMP est une molécule clé dans la phase de transition entre un mode de vie sessile et un mode de vie planctonique. Une recherche bibliographique a donc été menée dans le but d'identifier des candidats ayant un lien avec ce messager. Une protéine interagissant avec le c-di-GMP a tout particulièrement retenu notre attention : BdcA, pour « biofilm dispersal via c-di-GMP ».

De précédents travaux ont mis en évidence que la protéine BdcA réduit le niveau intracellulaire de c-di-GMP en se liant à ce dernier et induit la dispersion des biofilms d'*E. coli* K-12 BW25113 (Ma et al, 2011a). D'une part, la délétion du gène *bdcA* induit une augmentation de la concentration intracellulaire du messager c-di-GMP et réduit de trois à six fois la dispersion des biofilms. D'autre part, la protéine BdcA purifiée se lie au c-di-GMP et la production de BdcA est corrélée à une augmentation de la dispersion des biofilms. Enfin, l'expression de BdcA augmente la motilité cellulaire et la production d'ADNe, alors qu'elle diminue l'agrégation cellulaire, la longueur des cellules et la production d'exopolysaccharides. La protéine BdcA contrôle ainsi la dispersion des biofilms d'*E. coli* en se liant au c-di-GMP et en diminuant la concentration intracellulaire du messager (Ma et al, 2011a). Bien que se liant au c-di-GMP, BdcA n'agit toutefois pas comme une PDE (Ma et al, 2011a) et bien que présentant une homologie avec les DGC de nombreuses bactéries, son activité synthétique n'est à ce jour pas encore démontrée (Steunou et al, 2013). BdcA a récemment été

identifiée comme protéine appartenant à la superfamille des déshydrogénases/réductases NAD(P)(H) dépendantes (Lord et al, 2014). Par ailleurs, la production de BdcA en *trans* augmente la dispersion des biofilms d'autres bactéries Gram négatives : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* et *Rhizobium meliloti* (Ma et al, 2011b). Une version modifiée du gène *bdcA* est en outre utilisée dans de récents travaux de biologie synthétique pour disperser presque intégralement des biofilms « colonisateurs » *via* des biofilms « disperseurs » (Hong et al, 2012). Le gène *bdcA* constitue donc un bon candidat et est finalement retenu en tant que rapporteur d'un état de transition entre biofilm sessile et bactéries planctoniques, c'est-à-dire en tant que rapporteur de l'étape de dispersion.

En conclusion, les gènes sélectionnés pour caractériser les mécanismes de dispersion des biofilms d'*E. coli* dans ces travaux sont *wza*, *fliC*, *rrnBP1* et *bdcA*. Le gène *wza* représente la matrice extracellulaire et est le rapporteur caractéristique d'un mode de vie communautaire ; les gènes *fliC* et *rrnBP1* représentent respectivement motilité et métabolisme et sont les rapporteurs caractéristiques d'un mode de vie planctonique ; le gène *bdcA* est le rapporteur caractéristique d'un état transitoire entre les modes de vie sessile et planctonique. Une fois la sélection effectuée, il est indispensable de construire les souches. En effet, seul le rapporteur *rrnBP1* était déjà construit et disponible au LBPA ; par souci de simplification, il sera nommé *P1* dans la suite de ce manuscrit. La stratégie générale de construction des souches est expliquée au paragraphe suivant.

4.2 Stratégie générale de construction des souches génétiquement modifiées

La stratégie adoptée pour la construction des rapporteurs génétiques est l'insertion dans le chromosome d'*E. coli* des promoteurs sélectionnés clonés en fusion transcriptionnelle avec un gène codant pour une protéine fluorescente. La protéine fluorescente sélectionnée ici est la « green fluorescent protein » (GFP), dont on utilisera une version de fluorescence particulièrement importante, nommée GFPmut2.

Depuis sa découverte en 1962 dans la méduse du Pacifique *Aequorea victoria* (Shimomura et al, 1962), la GFP a été étudiée dans de nombreux travaux scientifiques et constitue un marqueur de choix pour l'étude de la physiologie, de l'expression génique ou encore de la localisation protéique en temps réel dans divers organismes (Chalfie et al, 1994 ; Larrainzar et al, 2005). Des variantes de la GFP ont ensuite été développées par mutation du gène *gfp* dans le but d'exploiter tout le potentiel de cette protéine, d'obtenir de nouvelles caractéristiques et d'élargir le champ des applications possibles. Parmi ces variantes, trois classes de protéines mutées ont été construites chez *E. coli*, référées comme GFPmut1, GFPmut2 et GFPmut3 (Cormack et al, 1996). Le contrôle de deux propriétés intrinsèques à ces protéines a permis d'augmenter jusqu'à cent fois leur intensité de fluorescence par rapport à celle de la GFP sauvage : la solubilité et le spectre d'absorption du fluorophore. D'une part, le repliement conformationnel de ces GFP mutées chez *E. coli* est plus efficace que celui de la GFP sauvage, résultant en une solubilité améliorée. D'autre part, le maximum d'excitation de ces mutants est décalé d'environ 100 nm vers l'infrarouge par rapport à celui de la GFP sauvage, permettant une excitation efficace à 488 nm. Des trois mutants, la GFPmut2 est celui ayant présenté la plus grande intensité de fluorescence (Cormack et al, 1996). Il a de plus un temps de maturation très court, de quelques minutes, comparé à des dizaines de minutes pour d'autres protéines fluorescentes. Cet avantage devient précieux quand on veut suivre l'évolution de l'expression en fonction du temps. En outre, ces protéines sont stables : la GFPmut2 a une demi-vie de 5,6 h chez *Bacillus subtilis* (Rosenberg et al, 2012), celle de la GFPmut3 est de plus de 24 h chez *E. coli* (Andersen et al, 1998). C'est la protéine mutante GFPmut2 qui a été sélectionnée comme rapporteur dans ces travaux. Trois mutations de la

GFP sauvage permettent de l'obtenir : (i) substitution de la sérine 65 du chromophore tripeptidique par une alanine, (ii) substitution de la valine 68 par une leucine et (iii) substitution de la sérine 72 par une alanine. Les propriétés spectrales de la GFPmut2 sont données en annexe 7.

La Figure 4.8 présente schématiquement la stratégie générale de clonage et d'insertion chromosomique pour construire les souches. Le protocole des constructions génétiques est expliqué en détail au chapitre 2 section 2.2.

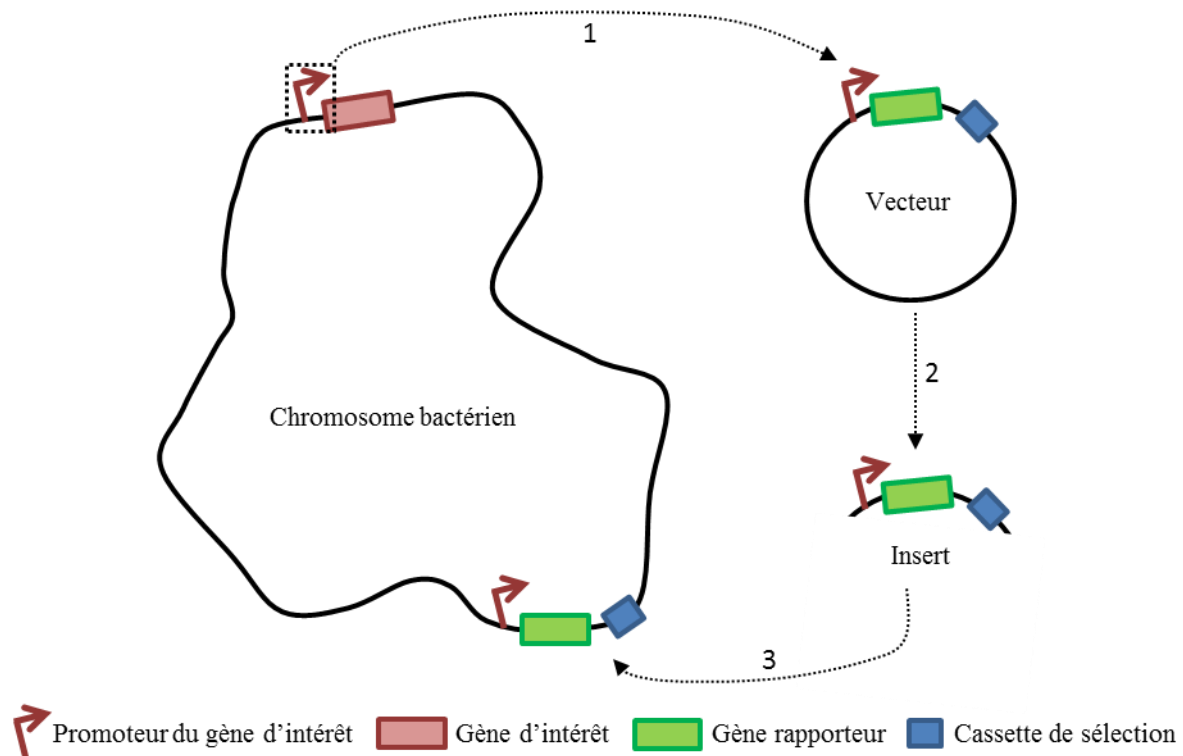


Figure 4.8. Stratégie générale de construction des rapporteurs génétiques. Le promoteur d'intérêt est cloné devant un gène rapporteur dans un vecteur portant une cassette de sélection (1). L'ensemble {promoteur d'intérêt + gène rapporteur + cassette de sélection} est amplifié (2) et inséré dans le chromosome bactérien (3). Dans cette étude, les promoteurs d'intérêt sont *P1*, *wza*, *bdcA* et *fliC*, le gène rapporteur est celui codant pour la GFPmut2, la cassette de sélection est un gène conférant une résistance à un antibiotique et le vecteur de clonage est une série de trois plasmides, dans l'ordre pGEM[®]-T Easy, pKK et pDOCK (voir chapitre 2 section 2.2).

La construction des rapporteurs est une stratégie en trois grandes étapes (Figure 4.8) :

1. Clonage du promoteur du gène d'intérêt devant le gène rapporteur dans un vecteur plasmidique portant une cassette de sélection.
2. Amplification de l'insert par PCR. L'insert correspond à l'ensemble {promoteur d'intérêt + gène rapporteur + cassette de sélection}.
3. Intégration de l'insert dans le chromosome bactérien par recombinaison homologue.

L'étape d'insertion chromosomique est importante en vue des expériences ultérieures pour quantifier l'expression des promoteurs lors de la dispersion des biofilms. En effet, d'une part, le nombre de copies de plasmide varie d'une cellule à l'autre, d'autre part, sans pression antibiotique, certaines cellules pourraient perdre le plasmide. L'insertion dans le chromosome garantit donc une unique copie du gène rapporteur par cellule.

Dans ces travaux, les promoteurs d'intérêt sont ceux sélectionnés à la section 4.1, c'est-à-dire le promoteur *P1* et ceux des gènes *wza*, *bdcA* et *fliC*. Le gène rapporteur utilisé est celui de la GFPmut2.

La cassette de sélection correspond à un gène de résistance à l'ampicilline (Amp) ou à la kanamycine (Kan) selon l'étape de clonage. Le vecteur de clonage correspond à la série chronologique des trois plasmides pGEM[®]-T Easy, pKK et pDOCK. Les protocoles sont détaillés au chapitre 2 section 2.2.

L'évaluation du changement de l'expression génique des bactéries suite à l'application de la molécule dispersante CDA repose sur le suivi de l'expression d'un gène rapporteur, celui de la GFPmut2. En effet, l'expression du gène reflète l'activité du promoteur derrière lequel il est cloné, ce qui donne accès à l'expression du gène endogène de ce promoteur. Ainsi, lors des expériences de dispersion, deux cas sont théoriquement possibles : présence ou absence de fluorescence.

Dans le cas d'une détection de fluorescence :

- * La fluorescence des cellules augmente en fonction du temps : la GFPmut2 est produite, le gène *gfpmut2* est donc exprimé et le promoteur est actif.
- * La fluorescence des cellules est constante en fonction du temps : la GFPmut2 a été produite, donc le promoteur étudié a été actif, avant que les cellules ne ralentissent leur croissance et entrent dans un état de dormance où la teneur en GFP est constante.

Dans le cas d'une non détection de fluorescence, la GFPmut2 n'est pas produite, le gène *gfpmut2* n'est donc pas exprimé et le promoteur est inactif. La non détection de fluorescence ne signifie toutefois pas obligatoirement une absence totale d'activité, mais correspond aussi à une fluorescence faible, inférieure au seuil de détection du signal.

La mesure de l'intensité de fluorescence provenant de la GFPmut2 permettra *in fine* de déterminer l'état d'activité des promoteurs. Par souci de raccourci, la GFPmut2 sera référée la plupart du temps en tant que GFP dans la suite de ce manuscrit.

Dans le cas particulier des promoteurs sélectionnés ici, on s'attend hypothétiquement aux observations suivantes lors d'une expérience de dispersion avec la molécule CDA :

- ***Avant épreuve de dispersion, observation d'un biofilm de 72 h :***
 - Le gène *wza* est exprimé, la protéine Wza est produite et l'acide colanique est sécrété dans la matrice extracellulaire des biofilms d'*E. coli*. Le promoteur *wza* est donc actif et la GFP est détectée.
 - L'opéron *rrnB* est plus ou moins exprimé et l'ARNr plus ou moins synthétisé selon l'état d'activité métabolique des cellules au sein du biofilm. Le promoteur *P1* est donc plus ou moins actif et la GFP est plus ou moins détectée.
 - Les gènes *bdcA* et *fliC* ne sont pas exprimés et les protéines BdcA et FliC ne sont pas produites par les cellules du biofilm à ce stade de développement. Les promoteurs *bdcA* et *fliC* ne sont donc pas actifs et la GFP n'est pas détectée.
- ***Après épreuve de dispersion, observation d'un biofilm ayant reçu le CDA :***
 - Le gène *wza* est réprimé, la protéine Wza n'est plus produite et l'acide colanique n'est plus sécrété dans la matrice extracellulaire des biofilms d'*E. coli*. Le promoteur *wza* a été inactivé et la quantité de GFP détectée est plus faible du fait de la dilution de la protéine par la croissance cellulaire.
 - L'opéron *rrnB* est plus exprimé et une plus grande quantité d'ARNr est synthétisée par les cellules du biofilm qui entrent en phase de dispersion. Le promoteur *P1* est donc plus actif et la quantité de GFP détectée est plus importante.

- Les gènes *bdcA* et *fliC* sont exprimés et les protéines BdcA et FliC sont produites par les cellules du biofilm qui entrent en phase de dispersion. Les promoteurs *bdcA* et *fliC* ont donc été activés et la GFP est détectée.

Après construction des souches, il est important de caractériser les rapporteurs génétiques en croissance planctonique ainsi qu'au sein des biofilms. Les sections suivantes détaillent ces deux études.

4.3 Caractérisation des rapporteurs génétiques en croissance planctonique

La caractérisation des souches correspond notamment à l'étude de l'expression génique au cours de la croissance planctonique.

Celle-ci peut être décrite par deux grandeurs caractéristiques : (i) la quantité de GFP produite pendant la croissance bactérienne entre l'instant initial et l'instant considéré, ramenée à la concentration de cellules, et (ii) la vitesse de production de la GFP, également divisée par la concentration de cellules. Cette dernière grandeur représente l'activité des promoteurs, ce qui donne accès à leur régulation. Les concentrations de GFP et la concentration des cellules sont mesurées par spectrofluorimétrie (voir chapitre 2 section 2.3).

4.3.1 Présentation des résultats de fluorimétrie

La fluorimétrie est une technologie de choix largement utilisée dans la communauté scientifique de la transcription pour l'étude de la dynamique des réseaux et régulations transcriptionnels en temps réel. C'est la technologie choisie dans ces travaux pour mesurer les concentrations de GFP et ainsi caractériser les souches en mode de vie planctonique.

Il convient tout d'abord d'expliquer précisément le type de données obtenues *via* cette technologie ainsi que la manière dont les résultats sont présentés (Figure 4.9).

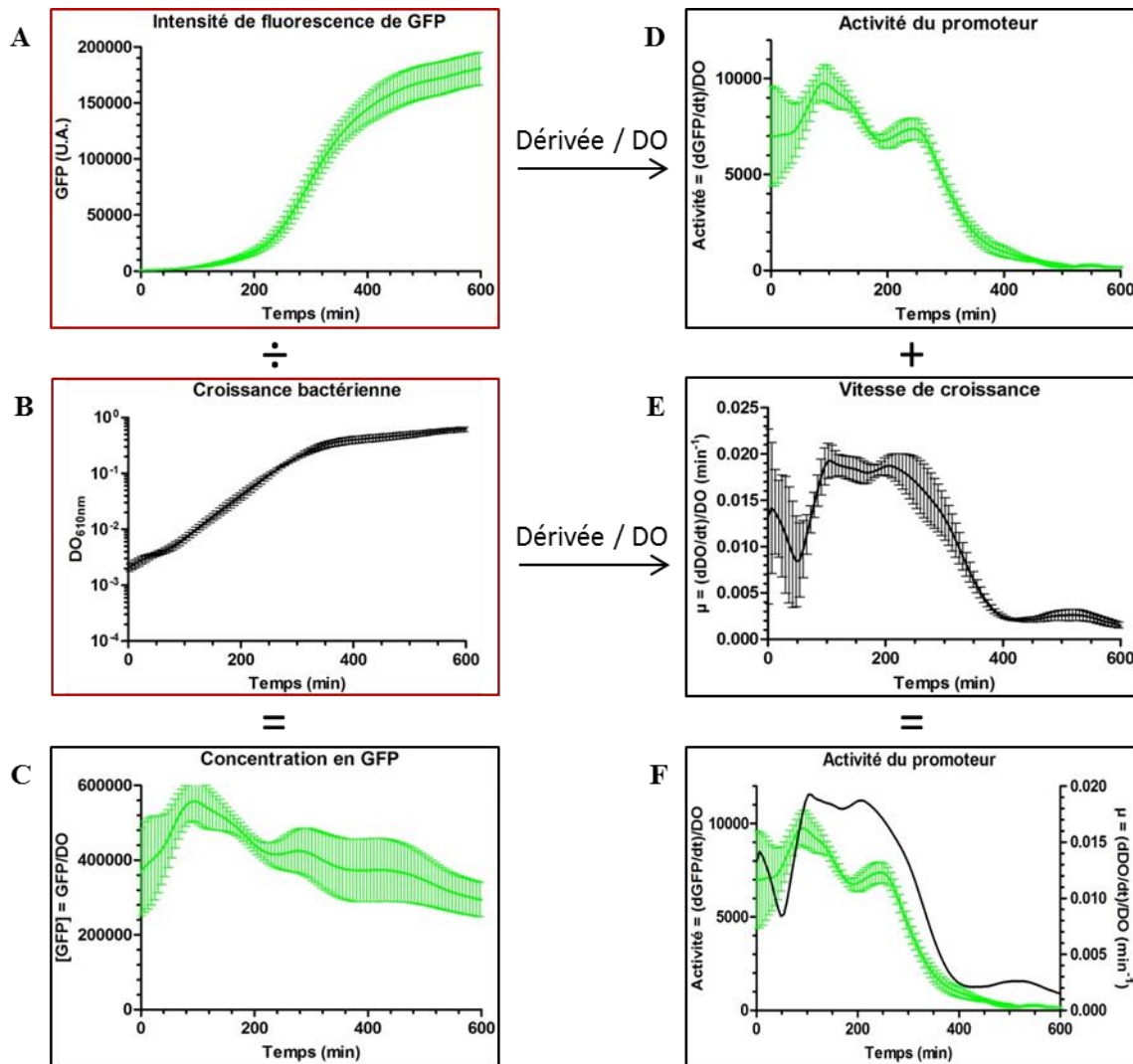


Figure 4.9. Planche explicative de présentation des données acquises en fluorimétrie. (A) L'intensité de fluorescence de GFP et (B) la DO_{610nm} sont mesurées par le fluorimètre. (C) La concentration en GFP correspond à l'intensité de fluorescence de GFP rapportée à la DO_{610nm} . (D) L'activité du promoteur et (E) la vitesse de croissance correspondent respectivement à la dérivée première de l'intensité de fluorescence de GFP et de la DO_{610nm} rapportées à la DO_{610nm} . (F) L'activité du promoteur est présentée avec la vitesse de croissance afin de voir son évolution pour chaque phase du cycle de croissance. Les encadrements en rouge sont les données mesurées par le fluorimètre, ceux en noirs sont les résultats obtenus après traitement de ces données.

Les mesures effectuées par le fluorimètre au cours de la croissance planctonique sont doubles : (i) absorbance à 610 nm référée comme DO_{610nm} (proportionnelle à la concentration des cellules) et (ii) intensité de fluorescence de GFP (encadrés rouges de la Figure 4.9). A partir de ces données, d'autres résultats peuvent être atteints : la vitesse de croissance de la souche, l'activité du promoteur et la concentration en GFP (encadrés noirs de la Figure 4.9). En effet, la vitesse spécifique de croissance à l'instant t , notée μ , correspond à la dérivée première de la DO_{610nm} par rapport au temps à cet instant t , divisée par la DO_{610nm} à ce même temps. L'activité du promoteur à l'instant t est définie comme la dérivée première de l'intensité de fluorescence de GFP (notée GFP) par rapport au temps à cet instant t , divisée par la DO_{610nm} à ce même temps. La concentration en GFP, notée $[GFP]$, correspond à l'intensité de fluorescence de GFP rapportée à la DO_{610nm} à chaque temps. Les équations donnant ces trois grandeurs sont présentées ci-après :

$$\mu(t) = \frac{d(DO(t))/dt}{DO(t)}$$

$$\text{Activité}(t) = \frac{d(\text{GFP}(t))/dt}{\text{DO}(t)}$$

$$[\text{GFP}(t)] = \frac{\text{GFP}(t)}{\text{DO}(t)}$$

L'activité des promoteurs et la vitesse de croissance des souches sont présentées sur un même graphique. Ceci permet de relier cette activité avec la phase de croissance des bactéries (Figure 4.9F). En ce qui concerne la concentration de GFP, le fait de diviser l'intensité de fluorescence par la DO et donc de la calculer par cellule, donne une idée des vitesses respectives de l'expression et de la croissance cellulaire. Si la concentration de GFP augmente, la production de GFP est plus rapide que la croissance cellulaire ; à l'inverse, si on observe une diminution de cette concentration, la protéine est diluée dans la cellule car elle est produite moins vite que ne se multiplient les cellules. Enfin, un blanc de fluorescence est toujours pris en compte dans la présentation des données traitées ; il correspond à l'auto-fluorescence de la souche sauvage BW25113.

Après avoir expliqué la façon dont les résultats pour la caractérisation des rapporteurs génétiques sont présentés dans ces travaux, il convient de présenter ces derniers.

4.3.2 Expression des rapporteurs génétiques en vecteur plasmidique

La première grande étape dans la construction des souches est le clonage des promoteurs d'intérêt devant le gène de la GFP dans un vecteur plasmidique, le plasmide pKK (Figure 4.8 du paragraphe 4.2 et chapitre 2 section 2.2.1.1). Il est donc fondamental d'observer l'expression des rapporteurs dans ce vecteur de clonage. Ceci permet d'une part de vérifier les constructions lors de cette étape intermédiaire, d'autre part de caractériser l'expression des promoteurs sur le plasmide.

Des mesures de fluorimétrie ont ainsi été réalisées avec les souches BW25113 comportant le plasmide pKK avec les promoteurs d'intérêt sélectionnés au paragraphe 4.1 (*P1*, *wza*, *bdcA* et *fliC*). La Figure 4.10 expose les résultats obtenus avec ces souches.

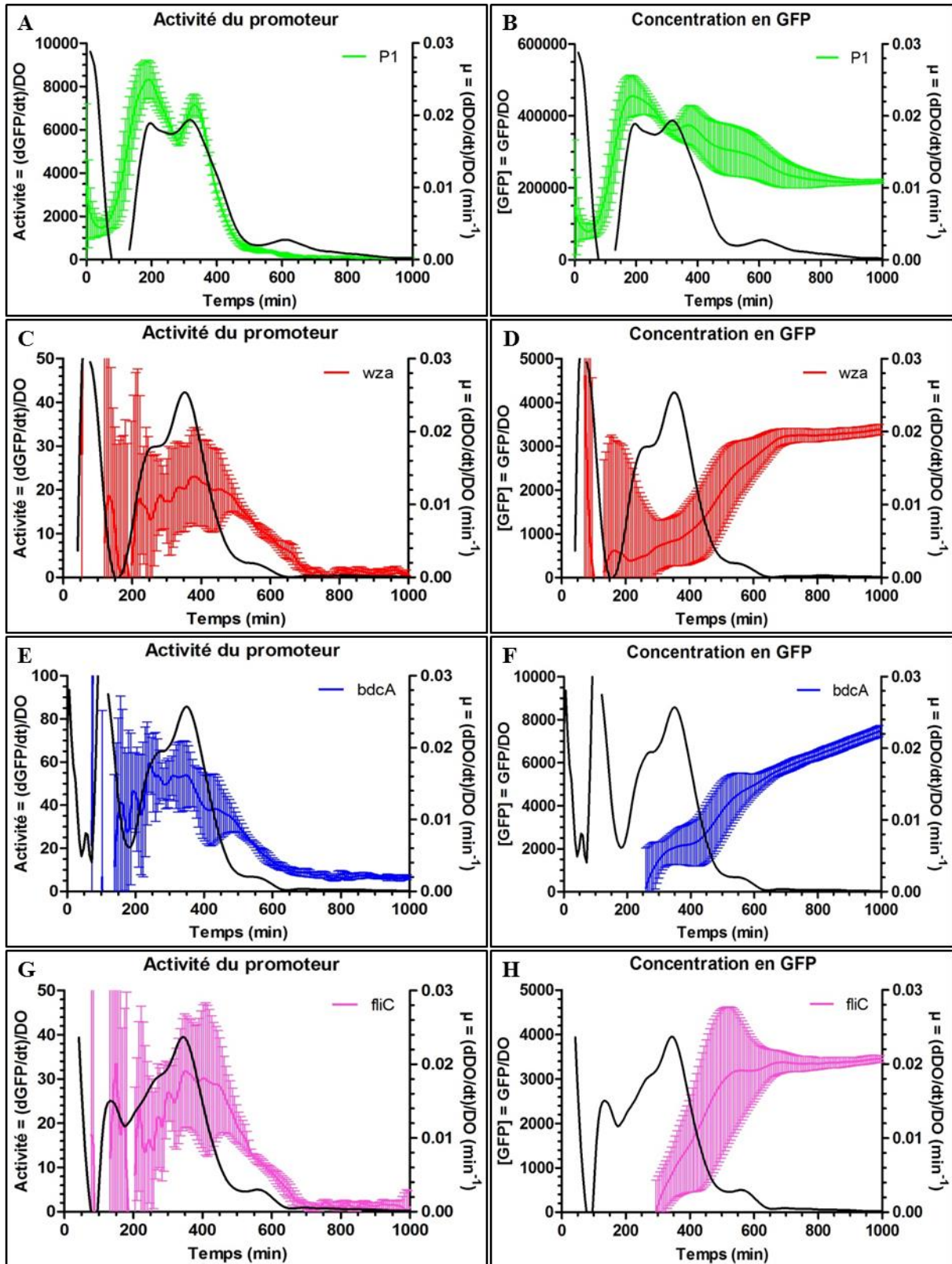


Figure 4.10. Caractérisation des promoteurs *PI* (–), *wza* (–), *bdcA* (–) et *fliC* (–) clonés sur le plasmide pKK au cours de la croissance planctonique. L'activité des promoteurs et les concentrations en GFP sont présentées pour les promoteurs *PI* (A et B), *wza* (C et D), *bdcA* (E et F) et *fliC* (G et H). La croissance planctonique est effectuée à 37°C en milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA. Les cultures sont initialement diluées au 10 000^{ème} depuis une préculture à 37°C en milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline avec agitation à 180 rpm. Les vitesses spécifiques de croissance sont reportées en noir pour chaque souche. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de 12 mesures.

L'activité de *PI* au cours de la croissance planctonique correspond avec ce qui est déjà connu dans la littérature, elle suit assez bien les changements de la vitesse de croissance : augmentation en phase d'accélération, diminution en phase de décélération et extinction en phase stationnaire (Figure 4.10A). Les activités des promoteurs *wza*, *bdcA* et *fliC* se ressemblent entre elles et sont différentes de celle de *PI*, dans leur niveau d'expression (activités autour de 50 pour ces promoteurs contre 10 000 pour *PI*, valeurs faibles donnant des erreurs plus importantes) et dans la relation entre l'activité et la croissance (Figure 4.10A, C, E et G). Il y a comme pour *PI* une augmentation d'activité en phases d'accélération et exponentielle, mais la diminution de l'expression de ces rapporteurs est retardée par rapport à la décélération de croissance alors qu'elle était en phase pour *PI*. Il en résulte une augmentation de la concentration en GFP dans les cellules en phase de décélération et en entrée de phase stationnaire pour ces promoteurs (Figure 4.10D, F et H) alors que cette concentration diminue pour *PI* à ce même stade (Figure 4.10B). Un arrêt de production de GFP est observé en phase stationnaire pour *wza* et *fliC* comme pour *PI* (concentration de GFP constante) (Figure 4.10C et D, G et H, et A et B) alors que *bdcA* conserve encore une activité (augmentation de la concentration en GFP) (Figure 4.10E et F).

Les différences de niveau d'expression entre *PI* et les autres promoteurs étaient attendues mais le faible niveau d'expression de ces derniers donne des doutes sur la qualité des constructions, surtout vis-à-vis du promoteur *fliC* qui est normalement responsable de l'expression de milliers de copies de flagelline, protéine de polymérisation du flagelle. Par ailleurs, le fait que les activités des promoteurs *wza* et *fliC* soient deux fois plus faibles que celle du promoteur *bdcA* et qu'elles cessent en phase stationnaire nous a amené à nous pencher sur les constructions de ces deux rapporteurs en particulier. On s'attendrait en effet par exemple à ce que l'expression de *fliC* augmente en phase stationnaire, lorsque les ressources du milieu sont épuisées, afin que les bactéries puissent nager et chercher de nouvelles sources nutritives.

Nous nous sommes donc demandé si le clonage était le bon pour les rapporteurs *wza* et *fliC*. Une non observation d'activité promotrice et/ou une non détection de fluorescence peuvent résulter de problèmes à trois niveaux : (i) le promoteur, (ii) le gène de la GFP et (iii) la séquence entre les deux. Les deux derniers points sont issus de la construction clonale mise au point et utilisée dans le laboratoire ; par ailleurs nous avons vérifié par séquençage que la séquence du gène rapporteur ne comportait pas de mutations. Il semblerait que le problème vienne du promoteur lui-même. Nous avons donc examiné de plus près les séquences promotrices de ces deux gènes, ainsi que présenté dans les deux paragraphes suivants.

4.3.2.1 Focus sur *wza*

La Figure 4.11 expose la séquence de la région promotrice du gène *wza*.

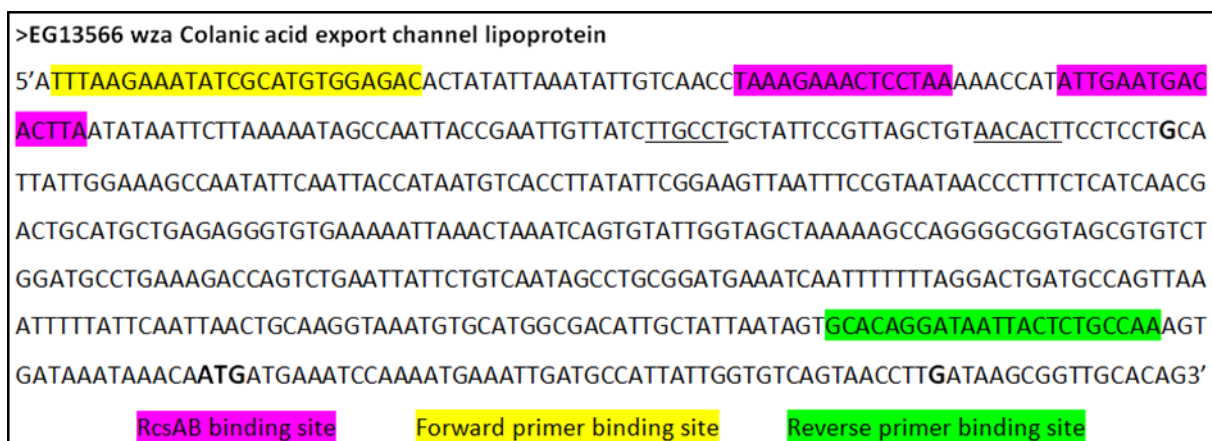


Figure 4.11. Région promotrice du gène *wza*. Les +1 de transcription et le codon initiateur sont indiqués en gras, les boîtes -10 et -35 sont soulignées. Le site de fixation des régulateurs RcsA et RcsB est surligné en rose, celui de l'amorce sens en jaune et celui de l'amorce antisens en vert.

Le promoteur *wza* contient en réalité deux promoteurs (Figure 4.11, deux +1 de transcription) : un promoteur principal possédant les séquences de fixation du facteur sigma de transcription globale, σ^{70} , et un promoteur secondaire possédant les séquences de fixation du facteur sigma spécifique à la réponse aux stress et induit en phase stationnaire, σ^{24} (Raina et al, 1995 ; Rhodius et al, 2006 ; Gopalkrishnan et al, 2014). De plus, la longue distance entre le site d'initiation de la transcription du promoteur σ^{70} et le gène suggère que l'ARN non-codant pourrait être une cible de régulation par la formation d'une structure de type riboswitch, le motif ARN JUMPstart – acronyme de « just upstream of many polysaccharide-associated gene starts » et dont la séquence consensus est GGCGGTAG (Hobbs et Reeves, 1994 ; Nieto et al, 1996) – comme indiqué sur le site RegulonDB pour ce promoteur (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>).

La plateforme internet EcoCyc (<https://ecocyc.org/>) de base de données d'*E. coli* stipule que le codon initiateur du gène *wza* pourrait avoir été mal annoté car le site du second +1 de transcription est 50 pb en aval de celui-ci. Dans nos constructions, l'amorce antisens d'amplification est en amont de ce site ; il se retrouve donc exclu de l'amplification du promoteur *via* le couple d'amorces utilisé. Il faudrait donc concevoir une nouvelle amorce antisens s'hybridant dans la séquence codante du gène *wza* en aval de ce deuxième +1 de transcription afin de cloner la totalité du promoteur.

Nous avons choisi de ne pas poursuivre la suite de ces travaux avec ce promoteur à cause de ces niveaux complexes de régulation. De plus en regardant le cas du PGA, mieux décrit dans la littérature que celui de l'acide colanique, on voit que les opérons impliqués dans les voies de biosynthèse et de sécrétion de ce polymère sont hautement régulés, avec notamment la régulation post-transcriptionnelle de l'opéron *pgaABCD* par CsrA (Wang et al, 2005). Par analogie, les voies de biosynthèse et d'export de l'acide colanique pourraient subir une régulation de l'expression de leurs gènes non limitée à l'unique activité des promoteurs, mais étendue à d'autres mécanismes post-transcriptionnels ou post-translationnels. Ceci pourrait donner lieu à de « faux positifs » : la production de GFP ne reflèterait peut-être pas la présence réelle de protéine Wza au sein des cellules.

4.3.2.2 Focus sur *fliC*

La Figure 4.12A expose la séquence de la région promotrice du gène *fliC*. En ce qui concerne la construction de ce rapporteur, tous les éléments promoteurs sont inclus par l'amplification *via* le couple d'amorces F1/R1 initialement utilisé (Figure 4.12A). L'encadrement par ces amorces comprend effectivement le site de fixation du régulateur FlhDC, les boîtes -10 et -35 ainsi que le +1 de transcription. En se rapprochant de la littérature, nous avons constaté que les travaux de Zaslaver et collaborateurs ont permis d'élaborer une librairie de fusions transcriptionnelles fluorescentes chez *E. coli*, incluant plus de 75 % des promoteurs de cette espèce, dont le promoteur *fliC* (Zaslaver et al, 2006). Nous avons donc comparé les amorces utilisées par l'équipe de Zaslaver pour cloner le promoteur *fliC* à celles que nous avons utilisées (amorces F1 et R1), puis nous avons conçu de nouvelles amorces (F2, R2 et R3). Les sites d'hybridation des amorces F2 et R2 sont exactement ceux utilisés dans les travaux de Zaslaver pour cloner le promoteur *fliC*. Le site d'hybridation de l'amorce R3 est le même que celui de l'amorce R2 avec cependant quatre nucléotides supplémentaires. La Figure 4.12 montre les sites d'hybridation des amorces utilisées pour la construction du rapporteur *fliC* dans le contexte de la région promotrice et dans le contexte du clonage résultant. Les séquences des amorces sont détaillées en annexe 1, où les noms respectifs des amorces F1, F2, R1, R2 et R3 sont For_fliC_XmaI, For2_fliC_XmaA, Rev_fliC_XbaI, Rev2_fliC_XbaI et Rev3_fliC_XbaI.



Figure 4.12. Zoom sur la construction *fliC*. (A) Région promotrice du gène *fliC*. (B) Séquence du début de la région transcrite dans les cas de construction avec les amorces antisens R1 (cas n°1), R2 (cas n°2) et R3 (cas n°3). Le +1 de transcription ainsi que le codon initiateur sont indiqués en gras, les boîtes -10 et -35 sont soulignées. Le site de fixation des régulateurs FlhD et FlhC est surligné en rose, celui de l'amorce sens F1 en jaune, celui de l'amorce sens F2 en bleu, celui de l'amorce antisens R1 en vert, celui de l'amorce antisens R2 en gris et celui de l'amorce antisens R3 est encadré. Les sites RBS (endogène et apporté par le clonage) sont indiqués en rouge. Le codon initiateur de la GFP est indiqué en vert.

L'amplification du promoteur *fliC* par le couple d'amorces F1/R1 semble *a priori* contenir tous les éléments nécessaires à la régulation de ce promoteur. Cependant, le site d'hybridation de l'amorce sens F1 est bien plus en amont que celui de l'amorce sens F2 (de 163 pb) et celui de l'amorce antisens R1 est également plus en amont que celui de l'amorce antisens R2 (de 85 pb) (Figure 4.12A). Ainsi, il est envisageable que les portions d'ADN comprises entre les amorces sens F1 et F2 et entre les amorces antisens R1 et R2 incluent des séquences bloquant l'initiation de la transcription et excluent des séquences importantes dans la régulation du promoteur, respectivement. La construction avec le couple d'amorces F2/R2 reproduit donc un encadrement du promoteur *fliC* tout à fait identique à celui utilisé par Zaslaver et collaborateurs. Cependant, lorsqu'on regarde de plus près la région transcrite et traduite dans le contexte du plasmide pKK pour cette construction, on s'aperçoit qu'un décalage du cadre ouvert de lecture est possible. En effet, dans le cas de l'utilisation de l'amorce R2, deux cas de traduction sont possibles : le ribosome reconnaît (i) le site de fixation du ribosome (RBS) endogène ou

(ii) celui apporté par le plasmide (Figure 4.12B). Dans le cas de la fixation du RBS plasmidique, la traduction commence bien au codon initiateur de la GFP et la séquence codante est en phase avec le cadre de lecture du ribosome. En revanche, dans le cas de la fixation du RBS endogène, la traduction commence au codon initiateur de *FliC* et un décalage du cadre de lecture apparaît pour la séquence codante de la GFP, puisqu'il y a 101 paires de bases (non divisible par trois) entre les deux ATG. Dans ce deuxième cas la GFP n'est pas produite. C'est pourquoi une ultime amorce a été ajoutée, l'amorce antisens R3, s'hybridant à la même séquence que l'amorce R2 plus quatre nucléotides, permettant à la GFP d'être effectivement traduite dans le cas d'une fixation du RBS endogène. En effet, dans ce cas, 105 paires de bases (divisible par trois) séparent les deux codons initiateurs et la séquence codante de la GFP se retrouve bien en phase avec le cadre de lecture du ribosome. La construction avec le couple d'amorces F2/R1 a également été ajoutée comme contrôle supplémentaire. En effet, en cas d'utilisation de l'amorce R1, que le ribosome reconnaisse le RBS endogène ou celui apporté par la construction, le premier ATG traduit est bien celui de la GFP.

Des mesures de fluorimétrie ont été effectuées avec les souches BW25113 portant le plasmide pKK avec le promoteur *fliC* ayant été cloné *via* les couples d'amorces F1/R1, F2/R1, F2/R2 et F2/R3. La souche BW25113 contenant le plasmide pUA66 portant le promoteur *fliC* en fusion transcriptionnelle avec le gène de la GFPmut2 provenant de la collection des travaux de Zaslaver et collaborateurs a également été ajoutée en tant que contrôle positif. Les résultats sont présentés en Figure 4.13.

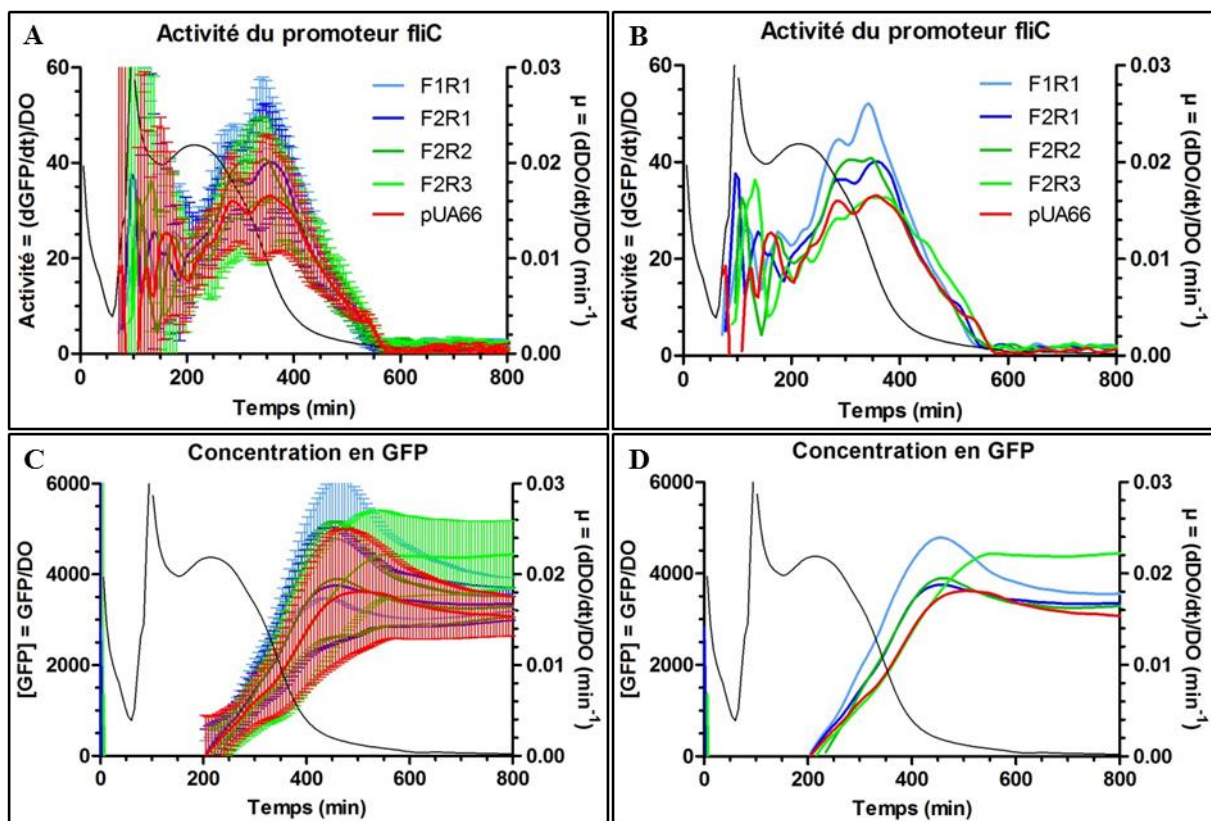


Figure 4.13. Comparaison des concentrations en GFP et des activités promotrices de *fliC* cloné avec les couples d'amorces F1/R1 (—), F2/R1 (—), F2/R2 (—) et F2/R3 (—) ainsi qu'avec le plasmide pUA66 (—) obtenu de la collection de Zaslaver et collaborateurs (Zaslaver et al, 2006). La croissance planctonique est effectuée à 37°C en milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA. Les cultures sont initialement diluées au 10 000^{ème} depuis une préculture à 37°C en milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline (plasmides pKK) ou 50 µg/mL de kanamycine (plasmide pUA66) avec agitation à 180 rpm. Les activités promotrices sont présentées (A) avec barres d'erreur et (B) sans barres d'erreur. Les concentrations en GFP sont présentées (C) avec barres d'erreur et (D) sans barres d'erreur. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de 12 mesures. La courbe noire représente la vitesse spécifique de croissance.

On observe que les profils d'activité promotrice de *fliC* des constructions F1/R1, F2/R1, F2/R2 et F2/R3 sont similaires entre eux mais aussi avec celui du promoteur *fliC* porté par le plasmide pUA66 (Figure 4.13B). En tenant compte des barres d'erreur ces profils sont équivalents (Figure 4.13A). Le promoteur *fliC* est donc activé en milieu de phase exponentielle (environ 200 min), son activité augmente entre la fin de la phase exponentielle et le début de phase de décélération (300-350 min), elle diminue ensuite jusqu'à la fin de la phase de décélération pour finalement s'éteindre en phase stationnaire (vers 600 min). Ce profil correspond aussi à ce qui a été observé par Zaslaver et collaborateurs pour le promoteur *fliC*.

En ce qui concerne les concentrations en GFP, des observations semblables s'effectuent : les profils de concentration sont similaires entre eux (Figure 4.13D) et équivalents en tenant compte des barres d'erreur (Figure 4.13C). La production de GFP est initiée en fin de phase exponentielle, augmente en phase de décélération et est stabilisée en phase stationnaire.

Nous pouvons finalement conclure que les clonages du promoteur *fliC* ont été correctement réalisés et que toutes les constructions sont valables. De plus, la construction F2/R2 aboutissant aux mêmes résultats que les autres, nous pouvons supposer que le RBS plasmidique est plus fort que le RBS endogène. La construction F1/R1 présentant une activité promotrice légèrement supérieure à celle des autres, c'est elle qui a été sélectionnée pour l'insertion dans le chromosome d'*E. coli*.

4.3.3 Expression des rapporteurs génétiques en insertion chromosomique

La dernière étape dans la construction des souches est l'insertion des promoteurs d'intérêt clonés devant le gène de la GFP dans le chromosome d'*E. coli* (Figure 4.8 du paragraphe 4.2 et chapitre 2 section 2.2.1.2). Il est donc indispensable d'observer l'expression des rapporteurs dans le contexte chromosomique. Ceci permet de caractériser l'expression des promoteurs sélectionnés lors de la croissance planctonique d'*E. coli*.

Des mesures de fluorimétrie ont ainsi été réalisées avec les souches BW25113 comportant les insertions chromosomiques des promoteurs *P1*, *bdcA* et *fliC* clonés devant le gène rapporteur. La Figure 4.14 expose les résultats obtenus avec ces souches.

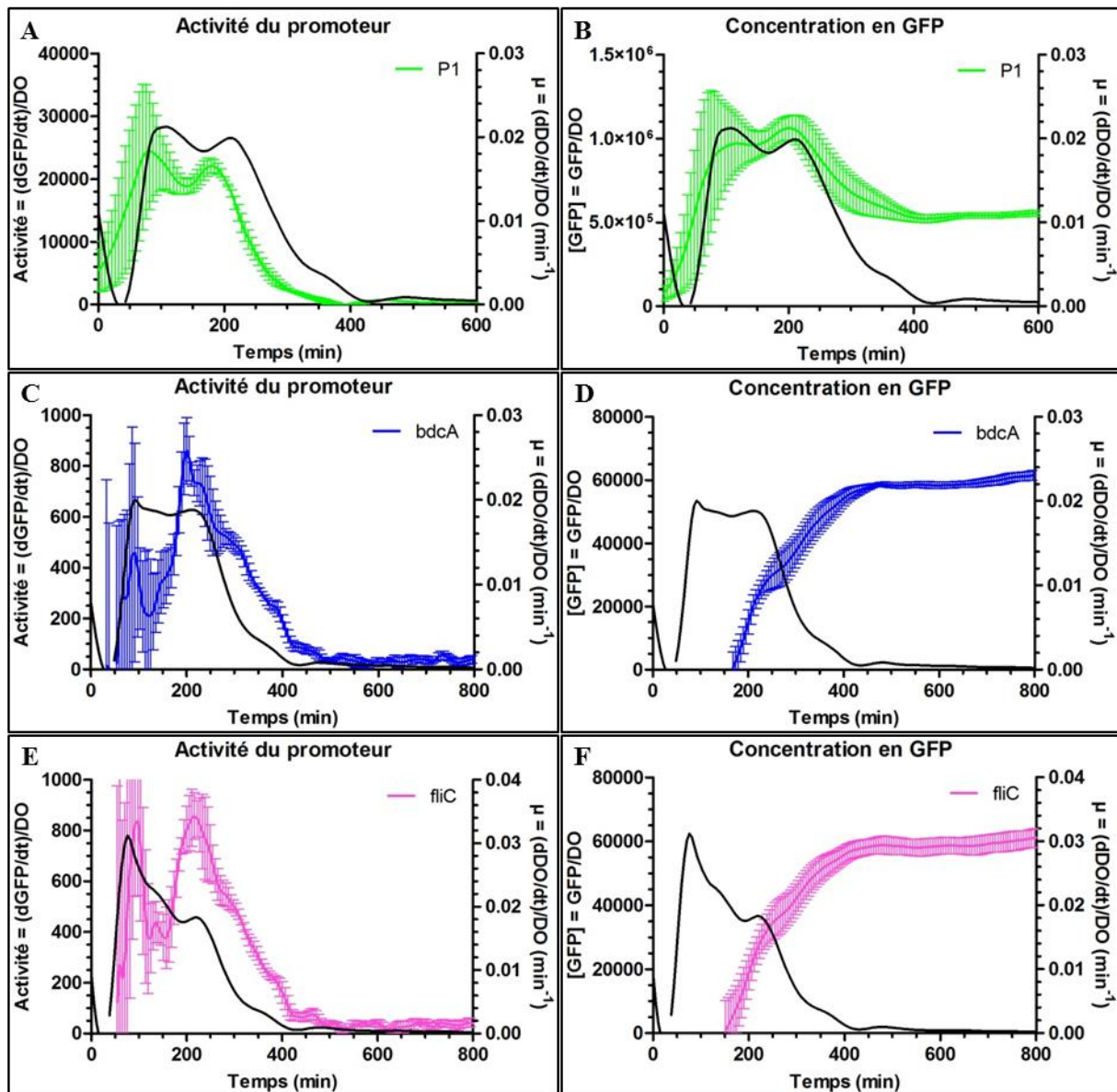


Figure 4.14. Caractérisation des promoteurs *P1* (—), *bdcA* (—) et *fliC* (—) insérés en position ori3 du chromosome bactérien au cours de la croissance planctonique. L'activité des promoteurs et les concentrations en GFP sont présentées pour les promoteurs *P1* (A et B), *bdcA* (C et D) et *fliC* (E et F). La croissance planctonique est effectuée à 37°C en milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA. Les cultures sont initialement diluées au 1000^{ème} depuis une préculture à 37°C en milieu LB contenant 50 μg/mL de kanamycine avec agitation à 180 rpm. Les vitesses spécifiques de croissance sont reportées en noir pour chaque souche. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de 12 mesures.

Comme attendu, l'activité de *P1* au cours de la croissance planctonique correspond à ce qui est déjà connu et à ce qui a été observé avec le plasmide (Figure 4.10A et Figure 4.14A). La concentration en GFP issue de l'activité de ce promoteur augmente en phase d'accélération, reste constante en phase exponentielle, diminue en phase de décélération et se stabilise en phase stationnaire (Figure 4.14B). Les activités des promoteurs *bdcA* et *fliC* se ressemblent (Figure 4.14C et E) et les concentrations en GFP issues de l'activité de ces promoteurs augmentent en fin de phase exponentielle et en phase de décélération et se stabilisent en phase stationnaire (Figure 4.14D et F). Comme déjà observé lors de l'étude plasmidique, l'expression de *P1* suit la croissance et s'éteint en fin de phase exponentielle alors que celles de *bdcA* et de *fliC* sont toujours actives pendant la phase de transition vers la phase stationnaire. On constate par ailleurs à nouveau que les activités promotrices des gènes *bdcA* et *fliC* sont plus de 10 fois plus faibles que celle de *P1*. Devant ces plus faibles intensités, nous nous sommes

demandé si un facteur pouvait gêner l'initiation de la transcription de ces deux gènes dans le contexte des insertions chromosomiques. L'unique élément inséré avec les promoteurs dans le chromosome bactérien est un gène conférant une résistance à la kanamycine (Kan), noté *kan^R*, résistance utilisée pour sélectionner les clones ayant effectivement reçu l'insert. D'autres travaux de notre équipe ont montré que la présence de ce gène divergent augmente l'expression du promoteur *P1* par l'augmentation du surenroulement négatif de l'ADN produit lors de sa transcription. En effet, une transcription en cours génère une augmentation de super tours négatifs en amont de l'ARN polymérase et de super tours positifs en aval (Liu et Wang, 1987). La Figure 4.15 présente ce concept.

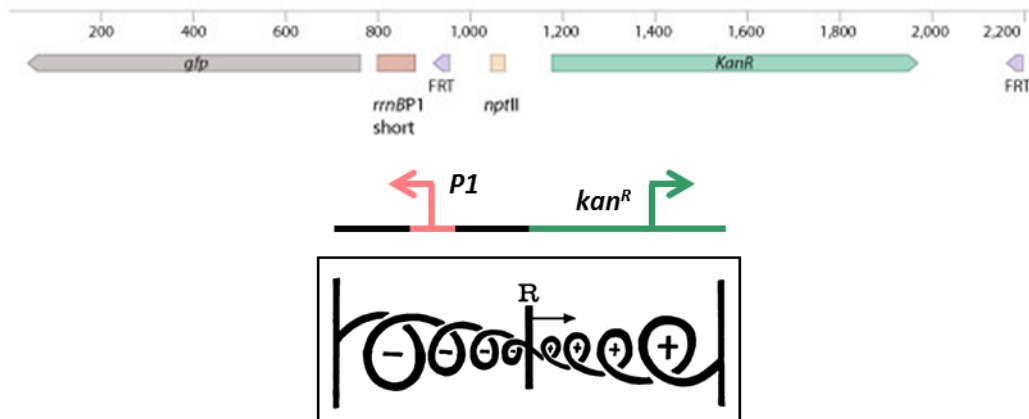


Figure 4.15. Surenroulement négatif de la séquence d'ADN des promoteurs divergents du gène *kan^R* généré par la transcription de celui-ci. La figure encadrée en noir est issue de la publication de Liu et Wang (Liu et Wang, 1987).

Ainsi, nous nous sommes demandé si la présence du gène *kan^R* divergent des promoteurs constituait une entrave à l'expression des rapporteurs *bdcA* et *fliC* et si la délétion de celui-ci pouvait augmenter l'activité des promoteurs.

4.3.4 Délétion du gène de résistance à la kanamycine (*kan^R*)

La transcription d'un gène peut influencer l'expression du gène voisin par des mécanismes de compétition pour le recrutement d'ARN polymérase, d'interférence transcriptionnelle et par la production de super tours dans l'ADN lors du processus de transcription (Callen et al, 2004 ; Sneppen et al, 2005). Ainsi, la présence du gène *kan^R* divergent aux promoteurs étudiés peut éventuellement constituer un obstacle à l'initiation de la transcription des gènes rapporteurs. Afin de lever cette hypothèse, le gène *kan^R* a été excisé des inserts par la technologie de recombinaison site-spécifique FLP/FRT et l'expression des rapporteurs a été mesurée pour les constructions avec et sans *kan^R*. Le protocole de délétion du gène *kan^R* via cette technologie est détaillé au chapitre 2, paragraphe 2.2.2.

4.3.4.1 Principe de délétion du gène *kan^R*

Le marqueur de sélection des insertions chromosomiques est le phénotype résistant à la Kan, noté [Kan^R]. L'insert contient effectivement le gène *kan^R* dont la séquence est flanquée par des séquences spécifiques appelées *FRT* pour « flippase recognition target ». Les séquences *FRT* sont reconnues par une flippase nommée FLP recombinant l'ADN. La recombinaison génétique par la protéine FLP a été démontrée chez *E. coli* en 1983 (Cox, 1983). Depuis, la technologie a été largement utilisée en biologie moléculaire pour exécuter insertion, excision, inversion ou translocation génétique dans divers organismes. La Figure 4.16 schématise le principe de la technologie de recombinaison site-spécifique FLP/FRT utilisée dans ces travaux pour exciser le gène *kan^R*.

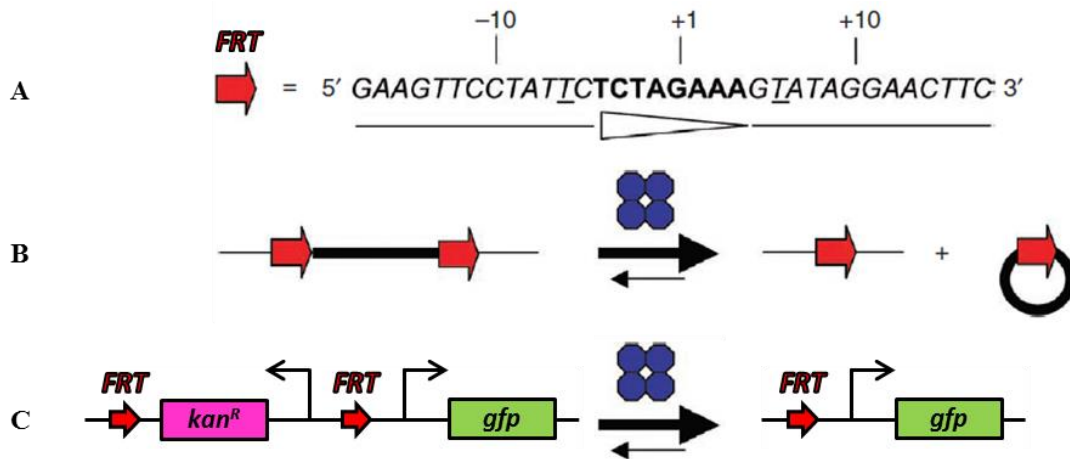


Figure 4.16. Principe de délétion du gène *kan^R* via la technologie de recombinaison site-spécifique FLP/FRT (schéma adapté de Lacroix et al, 2011). (A) Séquence nucléotidique du site *FRT* de 34 pb de long. Le site contient deux séquences palindromiques de 13 pb chacune (en italique), à l'exception d'une paire de bases (soulignée), séparées par une séquence centrale et asymétrique de 8 pb (en gras) qui définit l'orientation du site. Les séquences palindromiques sont les sites de fixation de la FLP ; la séquence centrale est le site de cassure et de ligature de l'ADN. (B) Recombinaison site-spécifique catalysée par la FLP. La FLP excise l'ADN localisé entre deux sites *FRT* ayant la même orientation. La réaction d'excision est réversible mais la réintégration de l'ADN excisé est cependant moins favorable cinétiquement. (C) Recombinaison site-spécifique dans le contexte des constructions génétiques. La FLP excise le gène *kan^R*, ce qui résulte en une insertion chromosomique conférant un phénotype sensible à la Kan, noté [Kan^S]. Le site *FRT* est symbolisé par la flèche rouge et la FLP est symbolisée par le tétramère bleu.

Un site *FRT* est constitué de 34 pb contenant deux séquences palindromiques de 13 pb chacune, séparées par une séquence centrale de 8 pb (Figure 4.16A). La protéine FLP est une enzyme reconnaissant les sites *FRT* et recombinant l'ADN flanquant ces sites. Les séquences palindromiques des sites *FRT* sont les sites de fixation de l'enzyme, les séquences centrales sont les sites de cassure et de ligature de l'ADN. Selon l'orientation des sites *FRT*, la FLP recombine l'ADN par insertion/délétion, inversion ou encore translocation génétique. Dans notre cas, les sites *FRT* présents dans les séquences plasmidiques flanquant le gène *kan^R* sont orientés dans le même sens. Ainsi, la FLP reconnaît ces sites et excise la portion d'ADN comprise entre les deux, portion contenant le gène *kan^R* et son promoteur (Figure 4.16B et C). Cette recombinaison génétique résulte en une insertion chromosomique ne comportant plus de résistance à la Kan, conférant ainsi un phénotype [Kan^S] aux souches.

La délétion du gène *kan^R* a été effectuée pour les souches BW25113 *bdcA* et *fliC* ; pour la souche P1, elle avait été faite auparavant par Elisa Brambilla lors de sa thèse au LBPA.

4.3.4.2 Expression des rapporteurs après délétion du gène *kan^R*

Des mesures de fluorimétrie avec les souches BW25113 P1, *bdcA* et *fliC* ont été réalisées pour évaluer l'effet de la délétion du gène *kan^R* sur l'expression des rapporteurs. Les résultats sont présentés en Figure 4.17.

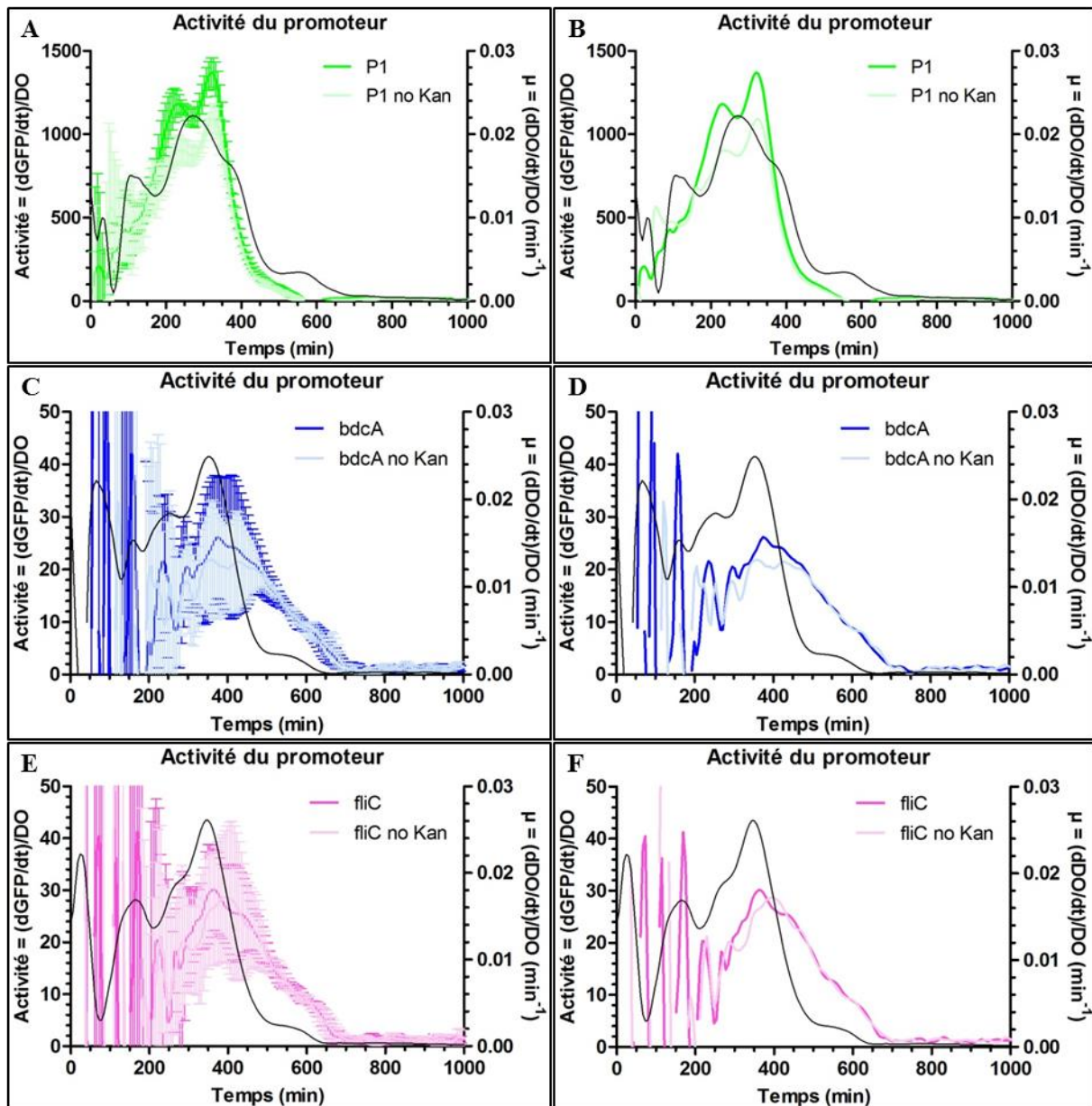


Figure 4.17. Comparaison des activités promotrices des rapporteurs *P1* (— et —), *bdcA* (— et —) et *fliC* (— et —) avec et sans *kan^R*. Les activités promotrices sont présentées avec et sans barres d'erreur pour les promoteurs *P1* (A et B), *bdcA* (C et D) et *fliC* (E et F). La croissance planctonique est effectuée à 37°C en milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA. Les cultures sont initialement diluées au 10 000^{ème} depuis une préculture à 37°C en milieu LB avec agitation à 180 rpm. Les promoteurs sont insérés en position *ori3* du chromosome bactérien. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de 12 mesures. Les vitesses spécifiques de croissance sont reportées en noir pour chaque souche.

Comme déjà observé auparavant, la délétion du gène *kan^R* induit une diminution de l'activité promotrice de *P1* (Figure 4.17A et B). En effet, lors de sa thèse, Elisa Brambilla a notamment étudié l'influence du gène *kan^R* sur l'expression du promoteur *P1* en fonction de la position chromosomique de l'insert. Elle a démontré que la délétion du gène *kan^R* induit une diminution de l'expression de *P1* à toutes les positions étudiées (Brambilla et al, en préparation). Ceci s'explique par la sensibilité du promoteur *P1* au surenroulement de l'ADN. Le retrait du gène *kan^R* induit une diminution de super-tours négatifs dans la région du promoteur *P1* résultant en une diminution de son activité.

Concernant les promoteurs *bdcA* et *fliC*, les profils observés sont identiques avec et sans *kan^R*, la délétion du gène n'induit donc ni augmentation ni diminution de leur activité promotrice (Figure

4.17C, D, E et F). Des résultats similaires ont également été observés par Elisa Brambilla pour le promoteur constitutif *P5* inséré en position *ori3*. Ainsi, l'expression des rapporteurs *bdcA* et *fliC* est indépendante de la présence d'un gène divergent de ces promoteurs, lorsque ceux-ci sont insérés en position *ori3* du chromosome bactérien. De plus, ces résultats permettent de supposer que ces promoteurs sont insensibles au surenroulement de l'ADN.

C'est finalement les rapporteurs génétiques dont les insertions chromosomiques portent le gène *kan^R* qui ont été sélectionnés pour la suite de ces travaux. Ce choix permet de sélectionner les souches lors de la préparation des échantillons. Une fois l'expression des rapporteurs étudiée en croissance planctonique, il est nécessaire de l'évaluer dans l'autre mode de vie des microorganismes, au sein des communautés sessiles.

4.4 Caractérisation des rapporteurs génétiques au sein des biofilms

La caractérisation des souches correspond notamment à l'étude de l'expression génique au sein des biofilms. La microscopie confocale à balayage laser (CLSM) est une technologie de choix largement utilisée dans la communauté scientifique des biofilms pour l'étude de l'expression génique *in situ*. C'est la technologie choisie pour caractériser les souches en mode de vie communautaire dans ces travaux.

Les épreuves de dispersion des biofilms par la molécule CDA menées dans ces travaux ont lieu sur des biofilms âgés de 72 h. C'est donc à ce stade de développement des biofilms qu'est observée l'expression des rapporteurs génétiques. Les résultats sont présentés en Figure 4.18.

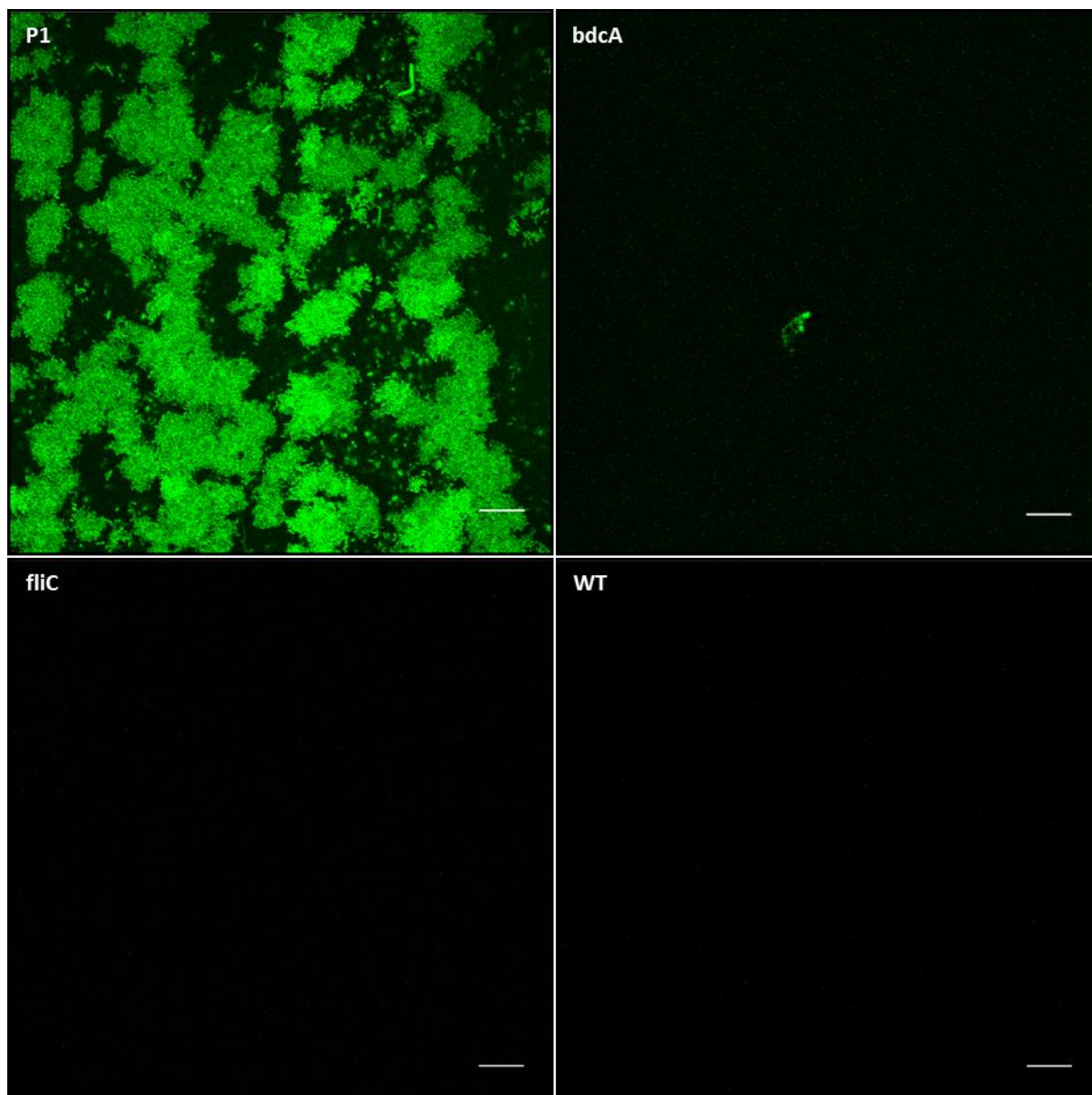


Figure 4.18. Expression des rapporteurs génétiques *PI*, *bdcA* et *fliC* au sein des biofilms d'*E. coli* à 72 h de croissance. Les biofilms sont développés en bioréacteur microfluidique à température ambiante (22°C) dans du milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA introduit à un débit de 50 µL/min. La souche sauvage (WT) a été ajoutée comme contrôle négatif de fluorescence. Les barres d'échelle représentent 20 µm. Les images sont acquises en CLSM avec le microscope confocal SP2.

Concernant le promoteur *PI*, toutes les bactéries du biofilm semblent être fluorescentes, la GFP est produite ou a été produite dans les cellules du biofilm, *PI* est donc exprimé ou a été exprimé dans tout le biofilm (Figure 4.18).

Le gène *bdcA* est exprimé par certains groupes de bactéries à des endroits spécifiques du biofilm (Figure 4.18). On observe en effet de petits regroupements fluorescents épars et disséminés à travers le biofilm.

On n'observe pas l'expression du gène *fliC* au sein des biofilms d'*E. coli* âgés de 72 h (Figure 4.18). Comme attendu, les bactéries ne synthétisent pas d'appendice flagellaire lorsqu'elles sont en mode de vie communautaire à ce stade de développement.

L'expression de *PI* dans apparemment toutes les bactéries au sein du biofilm permet de bien les visualiser. Ceci nous a amené à nous demander si ce rapporteur pouvait également être utilisé comme marqueur cellulaire interne lors des expériences de dispersion, ce qui permettrait d'éviter une étape préalable de marquage des cellules avec un marqueur externe comme le SYTO9. En effet, d'une part le processus de marquage – qui consiste en l'injection, l'incubation et le lavage de la molécule marqueur – génère nécessairement des perturbations au sein des chambres fluidiques pouvant affecter les structures tridimensionnelles des biofilms. D'autre part, comme expliqué au chapitre précédent, le SYTO9 utilisé pour mettre en évidence les bactéries est un intercalant de l'ADN. Ceci peut potentiellement gêner l'accès à l'ADN de molécules effectrices et empêcher ainsi une réponse génétique physiologique à un événement de dispersion. De plus, le SYTO9 marque également l'ADN extracellulaire (ADNe), ce qui n'est pas souhaité pour l'étude de la biomasse bactérienne. Un marquage externe peut donc rendre difficile l'observation d'un phénotype traduisant une dispersion et/ou la mise en évidence des mécanismes moléculaires caractérisant l'adaptation bactérienne à la dispersion des biofilms. L'utilisation du rapporteur *PI* en tant que marqueur cellulaire permettrait donc de s'affranchir de l'étape de marquage et d'éviter les difficultés potentielles déjà citées.

Dans le but de déterminer si le rapporteur *PI* peut constituer un bon marqueur de cellules au sein des biofilms, l'expérience suivante a été réalisée : des biofilms de la souche BW25113 *PI* ont été développés en microfluidique et marqués avec la molécule SYTO61 au troisième jour de croissance. Comme le marqueur SYTO9 (décrit au chapitre 3), le SYTO61 est un fluorophore se liant aux acides nucléiques par intercalation entre les bases azotées. Le pic d'émission du SYTO61 étant à 645 nm, la lumière émise est rouge ; celui de la GFPmut2 étant à 507 nm, la lumière émise est verte. L'utilisation simultanée de ces deux fluorophores est donc possible. Ainsi, après marquage, toutes les cellules marquées par le SYTO61 sont rouges, alors que seules les cellules exprimant le promoteur *PI* sont vertes. Le rapport des deux signaux permet d'évaluer la pertinence de l'utilisation du rapporteur *PI* pour la mise en évidence des bactéries au sein du biofilm. Les résultats sont présentés en Figure 4.19. Le protocole des expériences de marquage est décrit au chapitre 2 paragraphe 2.4.2 et rappelé en légende de la Figure 4.19. Les propriétés spectrales du fluorophore SYTO61 sont données en annexe 7.

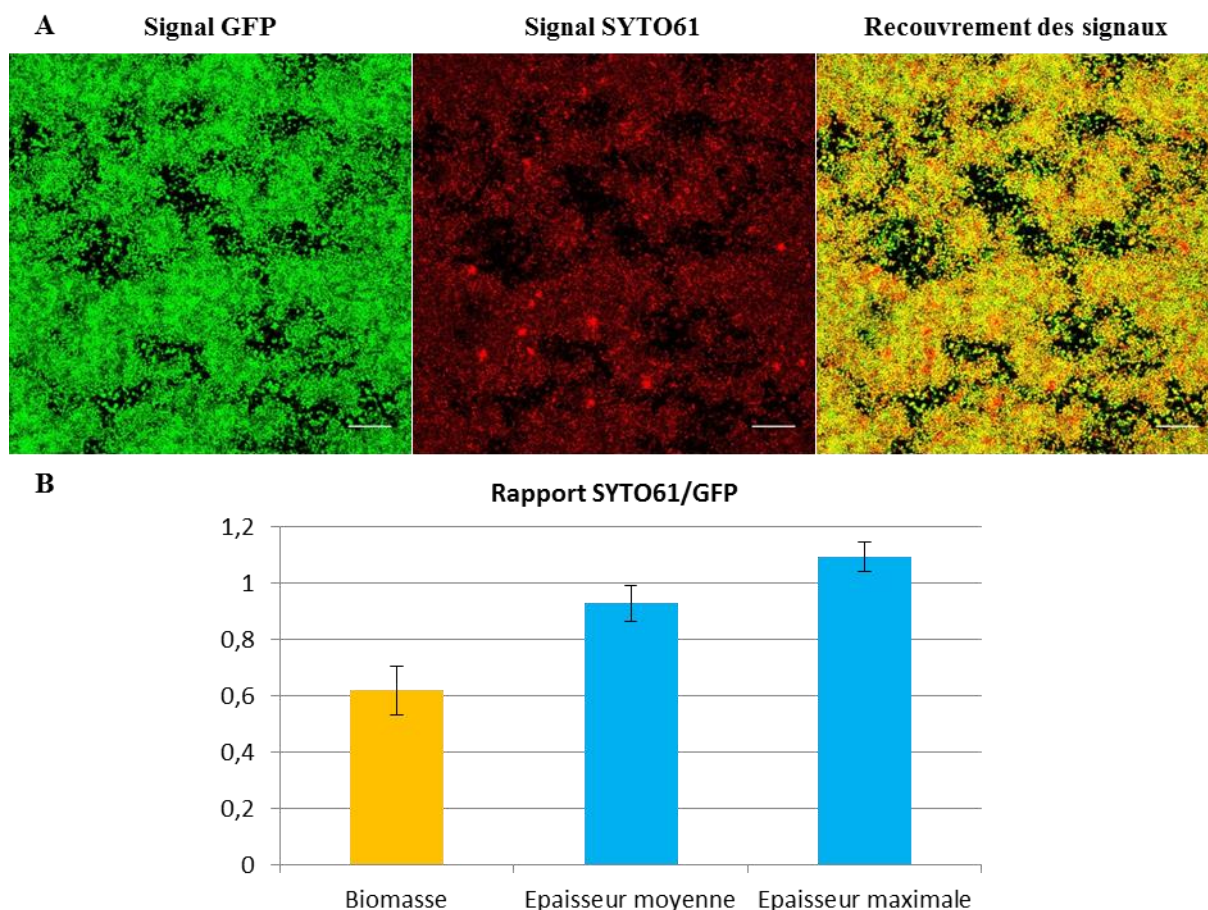


Figure 4.19. Comparaison des marquages cellulaires SYTO61 et GFP. (A) Image à 0 µm (au niveau du substrat) d'un biofilm pour le signal GFP (vert), le signal SYTO61 (rouge) et le recouvrement des signaux (jaune). (B) Rapport de la biomasse, de l'épaisseur moyenne et de l'épaisseur maximale des biofilms entre les marquages SYTO61 et GFP (calculées avec le logiciel COMSTAT). Les biofilms sont développés en bioréacteur microfluidique à température ambiante (22°C) dans du milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA introduit à un débit de 50 µL/min. L'expérience de marquage consiste en l'injection du marqueur suivie d'une incubation de 30 min et d'un lavage de 15 min. La concentration en SYTO61 est de 5 µM. Les barres d'échelle représentent 20 µm. Les images sont acquises en CLSM avec le microscope confocal SP8. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de quatre régions distinctes pour deux biofilms.

On observe que la grande majorité des bactéries marquées par le SYTO61 le sont également par la GFP (Figure 4.19A). Cependant, on observe quelques endroits uniquement rouges dans l'image de recouvrement des signaux, correspondant notamment aux points rouges plus intenses de l'image du signal SYTO61. Ces regroupements de fluorescence plus intense pourraient correspondre soit à des petits cristaux du fluorophore, soit à un marquage de l'ADNe. A l'inverse, on observe également quelques bactéries émettant uniquement un signal vert, plutôt situées en périphérie. Par ailleurs, lorsque l'on compare les caractéristiques du biofilm – déterminées avec le logiciel COMSTAT – on remarque des valeurs plus faibles pour le SYTO61 que pour la GFP (Figure 4.19B) que ce soit pour la biomasse ou l'épaisseur moyenne. Le rapport SYTO61/GFP vaut en effet $0,62 \pm 0,09$ pour la biomasse, $0,93 \pm 0,06$ pour l'épaisseur moyenne et $1,10 \pm 0,05$ pour l'épaisseur maximale.

On peut alors se poser la question du seuillage lors du traitement des données. En effet, l'algorithme de COMSTAT utilisé pour seuiller les images donne des seuils différents pour les images GFP et les images SYTO61. Un seuil de segmentation de 5 a ainsi été appliqué pour les images GFP alors qu'un seuil de 2 a été appliqué pour les images SYTO61. Afin d'évaluer l'impact de ce seuil sur les résultats, le traitement des images SYTO61 a également été effectué avec les seuils 5, 4, 3 et 1, et les rapports

SYTO61/GFP à ces seuils ont été déterminés pour la biomasse des biofilms. Les résultats sont présentés en Figure 4.20.

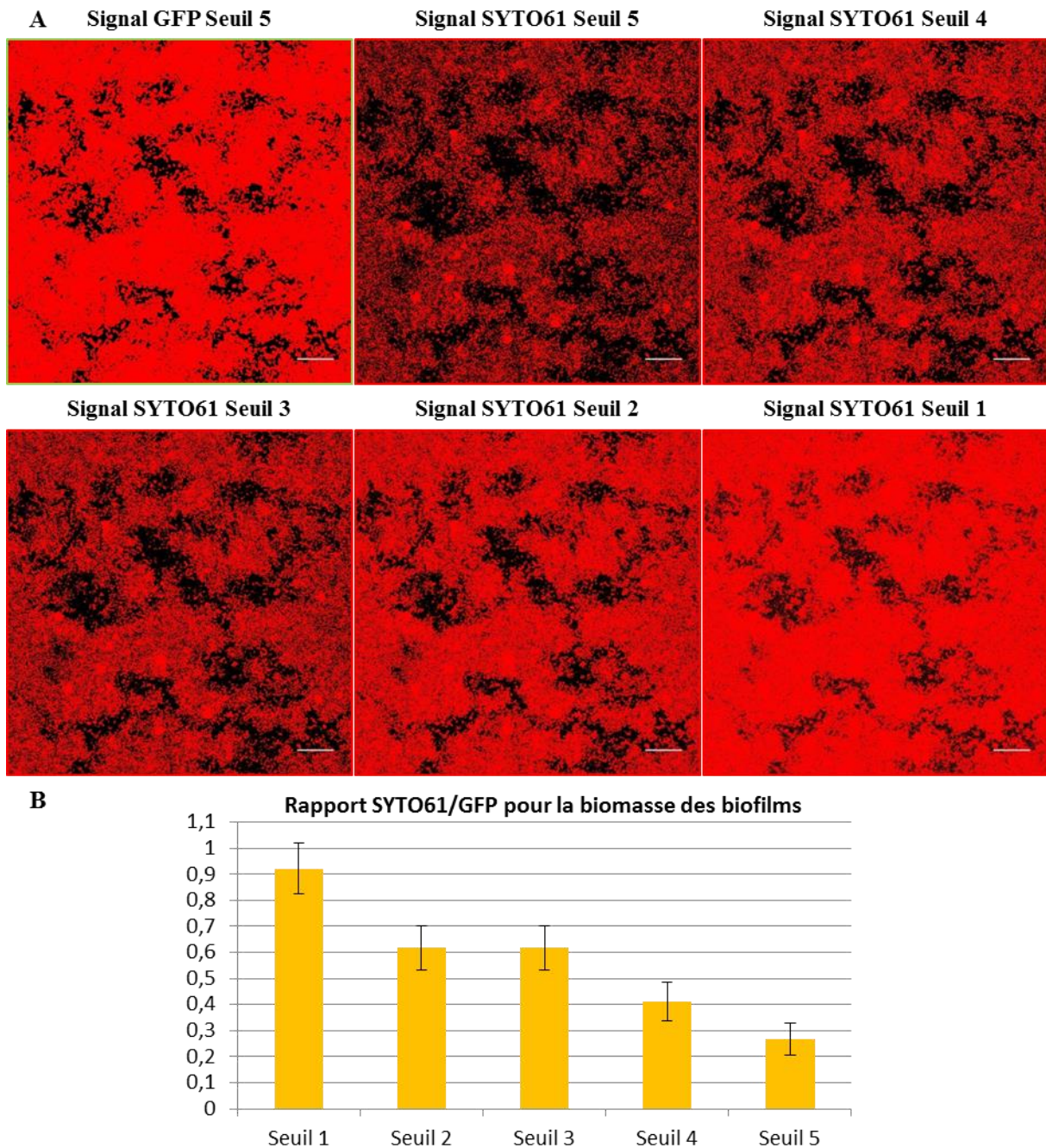


Figure 4.20. Comparaison de la biomasse des biofilms entre les images acquises avec le signal SYTO61 et celles acquises avec le signal GFP, pour différents seuils de segmentation des images SYTO61. (A) Images à 0 μm (au niveau du substrat) d'un biofilm pour un seuil de segmentation de 5 pour le signal GFP et des seuils de segmentation de 1 à 5 pour le signal SYTO61. (B) Rapport de la biomasse des biofilms entre les marquages SYTO61 et GFP, pour une segmentation différentielle des images SYTO61. Les barres d'échelle représentent 20 μm . Les images sont acquises en CLSM avec le microscope confocal SP8. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de quatre régions distinctes pour deux biofilms.

On observe que pour un même seuil de segmentation de 5, les images des signaux GFP et SYTO61 sont très différentes (Figure 4.20A). On constate également que plus le seuil est faible, plus l'image du signal SYTO61 se rapproche de celle du signal GFP ; on compte ainsi en effet de plus en plus de cellules. Cette observation se retrouve dans les rapports des signaux SYTO61/GFP lors de la

quantification de la biomasse des biofilms : plus le seuil de segmentation des images SYTO61 est bas, plus le rapport des signaux est équilibré (Figure 4.20B). Le seuil 1 est le plus petit seuil possible pour différencier les pixels de biomasse des pixels de fond et le rapport des signaux est en moyenne proche de 1 uniquement pour ce seuil. Ainsi, quel que soit le seuil utilisé pour segmenter les images acquises avec le signal SYTO61, la biomasse calculée est toujours plus importante à partir des images GFP qu'à partir des images SYTO61.

Dans un premier temps on s'attendrait plutôt à l'inverse ou à une égalité entre les deux biomasses. En effet en partant du principe que toutes les cellules sont marquées par le SYTO61, le rapport doit être égal à 1 si toutes les cellules expriment *PI* ou supérieur à 1 si certaines cellules n'expriment pas *PI*. Ceci serait d'autant plus vrai que le SYTO61 marque également l'ADNe. Cependant le résultat est inverse ; une hypothèse permettant de l'expliquer pourrait être la suivante : les deux marqueurs ont des localisations subcellulaires différentes. En effet, le marqueur SYTO61 est un fluorophore se liant aux acides nucléiques, il n'est donc présent qu'au niveau du nucléoïde des bactéries, alors que la GFP produite diffuse dans tout le cytosol et occupe ainsi un plus grand volume au sein des bactéries.

Finalement, que ce soit déterminé de manière qualitative *via* l'observation des images ou de manière quantitative *via* le calcul de la biomasse, il semble que toutes les bactéries au sein du biofilm expriment *PI*. On peut donc conclure que le rapporteur *PI* est un bon indicateur de biomasse bactérienne et qu'il peut être utilisé comme marqueur de cellules au sein des biofilms.

4.5 Discussion et perspectives du chapitre 4

L'étude des rapporteurs en culture planctonique a montré une expression différente des promoteurs au cours de la croissance bactérienne. En effet, l'activité du promoteur *PI* suit la croissance des bactéries, alors que celle des promoteurs *bdcA* et *fliC* est initiée en phase exponentielle et perdure jusqu'en entrée de phase stationnaire où elle s'éteint. De plus, les intensités de fluorescence des activités promotrices de *bdcA* et *fliC* sont environ 10 fois plus faibles que celles de *PI*.

Aussi, dans le but d'augmenter la fluorescence de ces rapporteurs, il serait envisageable de construire de nouvelles souches contenant les promoteurs *bdcA* et *fliC* clonés en fusion transcriptionnelle avec un autre gène rapporteur codant pour une protéine fluorescente plus intense, telle que la superfolder GFP (sfGFP). En effet, cette protéine fluorescente – mutante de la GFP – a démontré par rapport à la GFP sauvage des qualités intéressantes telles qu'une meilleure résistance à la dénaturation, une cinétique de repliement conformationnel augmentée ou une diminution de l'agrégation pendant le repliement (Pédelacq et al, 2006 ; Andrews et al, 2007). De plus, d'autres travaux ont montré que la sfGFP présente une fluorescence jusqu'à 100 fois plus intense que celle de la GFPmut2 (Fisher et DeLisa, 2008).

En outre, il serait intéressant de croiser les résultats de fluorimétrie en croissance planctonique avec des données de cytométrie en flux. En effet, les mesures de fluorimétrie sont à l'échelle de la population, ce qui permet une approche globale avec une intensité de fluorescence de la biomasse totale, alors que la cytométrie, qui donne une intensité de fluorescence par cellule, permet une approche plus fine. Ceci permettrait probablement de discriminer des sous-populations cellulaires. Par exemple dans le cas de l'expression de *fliC*, une partie de la population bactérienne peut exprimer effectivement le flagelle alors qu'une autre ne l'exprimera pas.

Lors de l'étude particulière sur la construction du rapporteur *fliC*, des observations en microscopie à épifluorescence ont également été réalisées (données non montrées) en fin de phase exponentielle de

croissance. En effet, d'après les résultats de nos travaux, c'est en milieu de cette phase que l'expression du flagelle est initiée, puis elle augmente en fin de celle-ci. Ces essais ont été réalisés en milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA à 37°C avec les souches BW25113 pKK *fliC* pour les quatre constructions (F1/R1, F2/R1, F2/R2 et F2/R3). Les résultats ont montré qu'à ce stade de croissance, environ 1 % ($1,1 \pm 0,3$ %) des cellules expriment la GFP et ce pour les quatre constructions. De plus, les bactéries « nageuses » ou « tourbillonnantes » étaient également fluorescentes. Ces données viennent conforter le fait qu'une étude de cytométrie en flux serait nécessaire pour évaluer l'intensité de fluorescence de la population exprimant le flagelle à différents temps de la croissance planctonique. Un exemple de ces résultats est présenté en Figure 4.21.

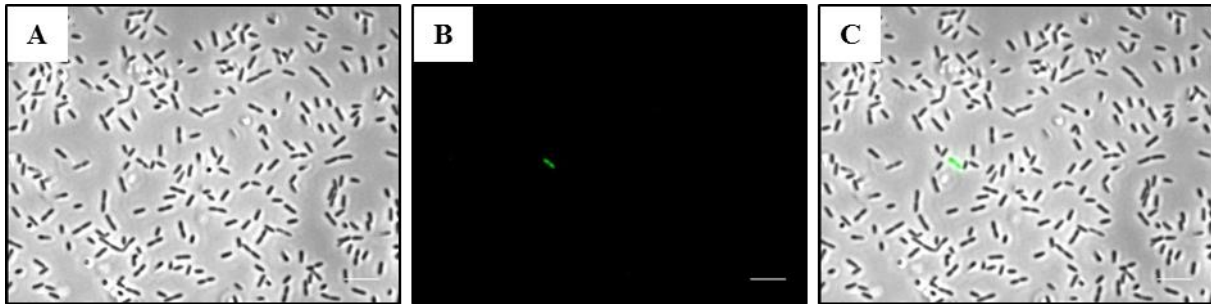


Figure 4.21. Expression de *fliC* au sein d'une culture planctonique d'*E. coli* BW25113 pKK *fliC* (construction F1/R1) en milieu minimal M9 en phase exponentielle de croissance. L'image (A) est celle en contraste de phase. L'image (B) est celle avec filtre FITC. L'image (C) est la superposition des images (A) et (B). Les images sont acquises en microscopie à épifluorescence. Les barres d'échelle représentent 10 µm.

L'étude des biofilms d'*E. coli* a montré une expression différente des promoteurs dans les communautés sessiles. En effet, à 72 h de croissance, *PI* est exprimé à travers tout le biofilm alors que *bdcA* ne l'est que dans certains regroupements bactériens et que *fliC* ne l'est pas du tout.

En ce qui concerne le rapporteur *PI*, toutes les bactéries du biofilm ont montré une fluorescence significative ; autrement dit le promoteur *PI* est ou a été exprimé dans toutes les cellules du biofilm. En effet, au vu de la stabilité de la GFPmut2 utilisée dans ces travaux, il est possible que des cellules ayant cessé toute activité métabolique depuis quelques heures contiennent encore la protéine fluorescente et émettent donc encore un signal après excitation à 488 nm. Afin d'évaluer l'expression de *PI* dans un temps plus court, il serait intéressant de construire de nouvelles souches avec un gène rapporteur codant pour une protéine moins stable que la GFPmut2, telle que les variantes de la GFPmut3b (Andersen et al, 1998). En effet, ces protéines mutantes présentent de courts temps de demi-vie, de 40 à 110 min chez *E. coli*, ce qui permettrait d'accéder à une expression plus instantanée de *PI*. Une autre solution serait de réaliser des observations microscopiques de *time-lapse* en CLSM des biofilms formés à partir de la souche BW25113 *PI* afin de mesurer les variations d'intensité de fluorescence en fonction du temps. Malgré tout, le fait de trouver une expression de *PI* – et donc une activité métabolique – dans toutes les cellules du biofilm ne paraît pas incohérent avec les résultats de la littérature. En effet, une étude sur les biofilms de l'espèce *Shewanella oneidensis* a montré que le promoteur *PI* est exprimé dans la totalité du biofilm, y compris dans les régions métaboliquement moins actives, et que les régions de croissance nulle du biofilm sont néanmoins métaboliquement actives (Teal et al, 2006). Par ailleurs, l'activité métabolique au sein des biofilms *via* l'activité du promoteur *PI* a déjà été étudiée chez l'espèce *Pseudomonas putida* (Sternberg et al, 1999 ; Christensen et al, 2002) mais n'a encore jamais été décrite chez *E. coli*. Il serait donc intéressant de poursuivre les recherches sur *PI* au sein des biofilms d'*E. coli* et de décrire l'expression du promoteur sous différentes conditions, par exemple dans un milieu de culture plus riche tel que le milieu LB ou bien à une température de croissance plus élevée comme 37°C pour simuler la température des intestins humains dans lesquels on retrouve l'espèce.

En ce qui concerne le rapporteur *bdcA*, quelques groupements bactériens ont montré une fluorescence, autrement dit le gène *bdcA* est (ou a été) exprimé dans des endroits spécifiques du biofilm. Cependant il n'est pas possible, à partir des expériences réalisées ici, de déterminer où se logent ces groupes de bactéries au sein des biofilms. Pour ce faire, il faudrait marquer les biofilms de la souche avec un marqueur exogène tel que le SYTO61, compatible comme on l'a vu avec la GFPmut2 puisqu'il émet dans le rouge lointain. Cependant, l'étape de marquage de la biomasse bactérienne pouvant déstabiliser l'architecture des biofilms, il serait plus pertinent de développer des biofilms avec une souche spécialement construite et contenant un double marquage : (i) le promoteur *bdcA* étudié en fusion transcriptionnelle avec le gène de la *gfpmut2* et (ii) un promoteur constitutif (tel que le promoteur phagique *P5*) en fusion transcriptionnelle avec un gène codant pour une protéine fluorescente rouge (telle que la Strawberry). Ceci permettrait de localiser les groupements bactériens exprimant *bdcA* au sein du biofilm et d'en découvrir des caractéristiques communes, par exemple leur taille, la quantité de biomasse ou l'épaisseur maximale du biofilm qui les comporte. L'expression du gène *bdcA* dans les biofilms d'*E. coli* K-12 a précédemment été évaluée par qRT-PCR dans des travaux montrant que la transcription du gène augmente avec le temps d'incubation des biofilms (Ma et al, 2011a). Toutefois, nos résultats sont particulièrement intéressants car c'est la première fois que l'expression endogène de *bdcA in situ* au sein de biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique est observée et que des groupes de bactéries localisés au sein des biofilms exprimant *bdcA* sont identifiés.

En ce qui concerne le rapporteur *fliC*, aucune fluorescence n'a été détectée, autrement dit le gène *fliC* n'est pas exprimé par les cellules du biofilm à 72 h de croissance. Ceci est en parfait accord avec ce qui est déjà observé dans la littérature pour *E. coli* K-12. En effet, tout d'abord, le criblage d'une banque d'insertions de *lacZ* par mutagenèse aléatoire a révélé que la synthèse de flagelline (FliC) est réprimée au sein des biofilms de l'espèce (Prigent-Combaret et al, 1999). De plus, la microscopie électronique n'a pas mis en évidence d'appendice flagellaire sur les bactéries de biofilms d'*E. coli* alors que celui-ci est visible sur les bactéries planctoniques de l'espèce (Prigent-Combaret et al, 1999). Finalement, la technologie de puce à ADN n'a pas permis de détecter l'expression de gènes codant pour le flagelle au sein des biofilms d'*E. coli* K-12 développés en chambre fluidique (Schembri et al, 2003). Nos résultats et ceux de la littérature suggèrent donc que les bactéries dans nos biofilms n'ont pas d'appendice flagellaire.

D'autre part, il serait intéressant de réaliser des expériences de *time-lapse* en CLSM pendant la période de croissance des biofilms, afin de caractériser l'expression de l'opéron *rrnB* et des gènes *fliC* et *bdcA* aux différentes étapes du cycle de développement des biofilms d'*E. coli*. On s'attendrait ainsi à observer par exemple une expression de *fliC* au début du cycle de vie des biofilms, lors des étapes d'adhésion où les flagelles permettent aux bactéries d'atteindre le matériau du support sur lequel s'établira le biofilm, de détecter la surface de ce matériau (O'Toole et Wong, 2016), de faciliter les interactions avec ce matériau (Tuson et Weibel, 2013) et sont importants pour l'attachement initial (O'Toole et Kolter, 1998). Bien que l'expression du flagelle ne soit pas indispensable à la formation de biofilms (Prigent-Combaret et al, 2000), la présence du flagelle affecte cependant l'architecture des biofilms d'*E. coli* (Wood et al, 2006) : étudier l'expression de *fliC* au cours du développement des biofilms – à d'autres étapes du cycle de vie que la dispersion étudiée ici – permettrait ainsi peut-être de lier expression du flagelle et structure du biofilm. En effet, de précédents travaux ont par exemple montré qu'une sous-population cellulaire de l'espèce *Bacillus thuringiensis* est capable de créer des tunnels à travers la matrice extracellulaire en se propulsant à l'aide du flagelle, affectant ainsi la structure des biofilms (Houry et al, 2012). Les expériences de *time-lapse* en CLSM permettraient également de mesurer les variations d'intensité de fluorescence du rapporteur *PI* au cours de la

croissance du biofilm, et d'évaluer ainsi des changements d'activité métabolique en fonction de l'étape du cycle de vie des biofilms.

Finalement, l'étude du rapporteur *PI* en tant que marqueur cellulaire a montré que le signal GFP était plus important que le signal SYTO61 au sein des biofilms. Les images correspondantes ont montré que certaines bactéries vertes (GFP) n'émettaient pas de signal rouge (SYTO61). Ceci a également été observé dans de précédents travaux sur des biofilms de *Pseudomonas putida* marqués au SYTO60 et exprimant la GFP (Nancharaiah et al, 2005). Cependant, malgré des différences de localisation des fluorophores observées dans la cellule – la GFP diffuse dans le cytoplasme alors que le SYTO60 se lie aux acides nucléiques – les travaux ont conclu à une corrélation du pourcentage de recouvrement de la surface et de la taille des microcolonies entre les signaux GFP et SYTO60 (Nancharaiah et al, 2005). Ceci dit, nos résultats ne sont comparables à ceux précédemment décrits que dans une certaine mesure car la résolution et l'analyse des paramètres des biofilms sont différentes. Le rapport SYTO61/GFP mesuré dans nos travaux reflète probablement plus un rapport ADN/biomasse qu'un rapport biomasse/biomasse.

4.6 Conclusion du chapitre 4

Ce deuxième chapitre de résultats a permis la sélection, la construction et l'analyse de l'expression de gènes rapporteurs dans le but de caractériser la dispersion des biofilms d'*E. coli* via la molécule modèle CDA.

Les promoteurs ont été sélectionnés en fonction des catégories phénotypiques matrice extracellulaire (*wza*), métabolisme (*rrnBPI*), motilité (*fliC*) et interaction avec le messager secondaire c-di-GMP (*bdcA*). Le gène *wza* code en effet pour la protéine Wza, porine permettant la sécrétion de l'acide colanique à l'extérieur de la cellule ; l'opéron *rrnB* code pour les ARNr, intervenant dans la composition des ribosomes ; le gène *fliC* code pour la flagelline, protéine de polymérisation du flagelle et le gène *bdcA* code pour la protéine BdcA, protéine de liaison au c-di-GMP. Les premiers résultats en croissance planctonique sont satisfaisants dans trois cas sur quatre, montrant que la méthodologie envisagée avec *PI*, *fliC* et *bdcA* est pertinente et fiable. Par contre la difficulté d'interprétation des résultats avec le promoteur *wza* ne nous a pas permis de poursuivre les travaux avec ce rapporteur.

La stratégie de construction des rapporteurs suivie a été le clonage des promoteurs des gènes sélectionnés en fusion transcriptionnelle avec le gène codant pour la protéine fluorescente GFPmut2 et l'insertion de l'ensemble dans le chromosome bactérien. Nous avons montré qu'elle était satisfaisante dans tous les cas.

L'expression des rapporteurs a été observée et caractérisée lors de la croissance planctonique des bactéries et *in situ* au sein des biofilms d'*E. coli* développés en microfluidique à 72 h de croissance. D'une part, les promoteurs *fliC* et *bdcA* ont une activité différente de celle de *PI* en croissance planctonique, beaucoup plus faible, avec notamment une activité encore présente en phase de déclin et de transition vers la phase stationnaire. Une stratégie envisagée pour augmenter l'expression des rapporteurs, la délétion du gène divergent *kan^R* – marqueur de sélection des constructions génétiques – n'a pas donné le résultat escompté. D'autre part, nos résultats montrent que *PI* est exprimé à travers tout le biofilm, que *bdcA* est exprimé dans certaines régions du biofilm et que *fliC* n'est pas exprimé dans le biofilm à 72 h de croissance.

Ce chapitre a également permis d'expliquer notre approche pour l'exploitation et la présentation des données acquises par fluorimétrie. En effet, à partir des données d'absorbance à 610 nm et d'intensité

de fluorescence mesurées par le fluorimètre, il est possible d'atteindre la vitesse de croissance des souches, l'activité des promoteurs et la concentration en GFP des cellules. Ces paramètres sont importants pour caractériser le comportement physiologique des souches et identifier une perturbation éventuelle provoquée par la molécule dispersante CDA dans la suite de ces travaux.

Par ailleurs, la définition à la bactérie près des cellules au sein des biofilms avec la souche BW25113 P1 a permis d'identifier le rapporteur *PI* comme marqueur de biomasse bactérienne dans les biofilms d'*E. coli*. L'utilisation de cette souche pour la mise en évidence des cellules au sein des biofilms permet de s'affranchir d'une étape préalable de marquage des biofilms, étape pouvant perturber l'architecture des biofilms et la réponse physiologique des bactéries faisant suite à un événement de dispersion. La souche BW25113 P1 va donc permettre dans un premier temps d'évaluer l'effet de la molécule dispersante CDA sur les biofilms d'*E. coli*, en terme de biomasse bactérienne, l'un des paramètres décrivant la structure des biofilms. La réponse génétique des bactéries *via* le rapporteur *PI* pendant un événement de dispersion sera également étudiée dans un deuxième temps.

C'est finalement avec les souches BW25113 P1, *bdcA* et *fliC* que les épreuves de dispersion sont réalisées et que la réponse génétique des bactéries des biofilms d'*E. coli* au CDA est évaluée dans ces travaux.

5. Etude de la dispersion des biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA

La dernière partie de mes travaux de thèse a consisté en l'étude de la dispersion des biofilms d'*E. coli* développés en bioréacteur microfluidique *via* la molécule dispersante modèle acide *cis*-2-décénoïque (CDA). L'objectif de ce chapitre est donc d'évaluer l'impact de cette molécule sur la structure des biofilms et l'expression génique des bactéries sessiles. Pour cela, des paramètres structuraux (biomasse fixée, épaisseur moyenne, aire de recouvrement des biofilms) et l'intensité de fluorescence de rapporteurs spécifiques (*P1*, *bdcA*, *fliC*) ont été mesurés en présence et en absence de CDA. Une méthodologie expérimentale pour l'acquisition des images des biofilms par microscopie confocale à balayage laser (CLSM) a été mise en place et un outil d'analyse a été développé en collaboration avec Bertrand Cinquin du LBPA pour la quantification des paramètres structuraux et des intensités de fluorescence des rapporteurs. Afin d'évaluer l'impact spécifique du CDA sur les biofilms, une étude décrivant l'effet de la molécule sur la croissance et l'expression des rapporteurs en culture planctonique a également été menée. Le chapitre décrit dans un premier temps les effets de la molécule sur les bactéries planctoniques et dans un deuxième temps ceux sur les biofilms.

5.1 Effets du CDA sur les bactéries en mode de vie planctonique

Les effets du CDA sur les bactéries en mode de vie planctonique ont été évalués à deux niveaux : (i) croissance bactérienne et (ii) expression des rapporteurs.

Dans les sections suivantes, la croissance planctonique est effectuée à 37°C en milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA. Les cultures sont initialement diluées au 10 000^{ème} à partir d'une préculture. La condition avec CDA correspond au milieu de culture contenant 110 µM de CDA et 0,7 % (v/v) d'éthanol. La condition sans CDA correspond au milieu de culture contenant 0,7 % (v/v) d'éthanol. Les promoteurs sont insérés en position *ori3* du chromosome bactérien. Les mesures sont effectuées au spectrofluorimètre. Pour des informations complémentaires, regarder les sections 2.1 et 2.3 du chapitre 2.

5.1.1 Effets du CDA sur la croissance des souches

Dans un premier temps, l'effet de la molécule dispersante CDA a été testé sur la croissance planctonique des bactéries. La croissance des souches BW25113 *P1*, *bdcA* et *fliC* a été suivie en milieu de culture contenant ou non le CDA. Les résultats sont présentés en Figure 5.1.

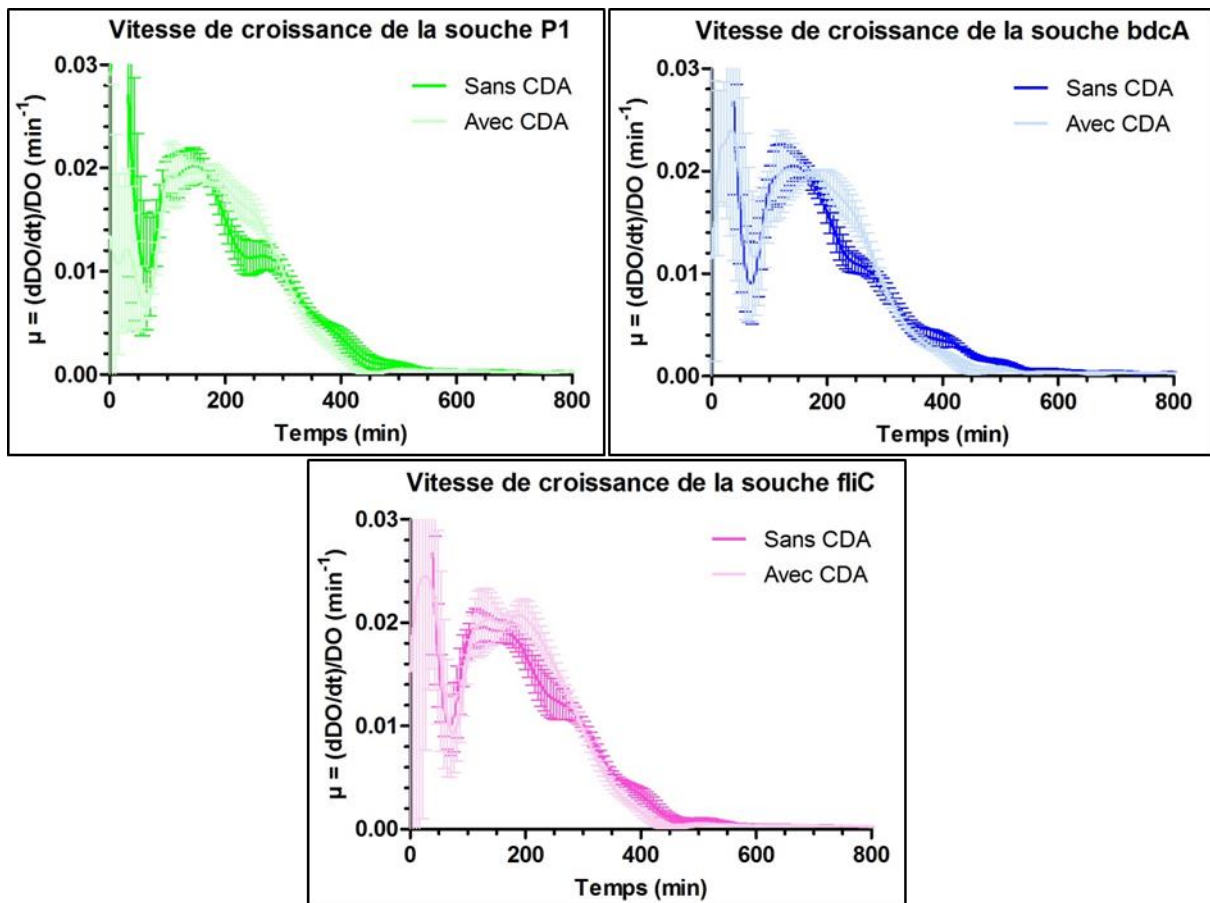


Figure 5.1. Vitesse spécifique de croissance des bactéries planctoniques sans et avec CDA pour les souches BW25113 P1, bdcA et fliC. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de la mesure de 6 puits dans la plaque de lecture.

Les vitesses spécifiques de croissance présentent un profil général similaire avec et sans CDA pour chaque souche considérée (Figure 5.1). Cependant, la durée de la phase exponentielle de croissance des souches en présence de CDA semble être légèrement plus importante qu'en son absence. En effet le CDA étant un acide gras il peut éventuellement constituer une source de carbone métabolisable par les bactéries. En fin de phase exponentielle, les cellules auraient donc une source de nutrition supplémentaire disponible, ce qui prolongerait leur phase exponentielle de croissance. Par ailleurs, le CDA n'empêche ni ne ralentit la croissance planctonique des bactéries : il ne s'agit donc pas d'une molécule cytotoxique.

5.1.2 Effets du CDA sur l'expression des rapporteurs

Dans un deuxième temps, l'effet de la molécule dispersante CDA a été étudié sur l'expression des rapporteurs génétiques pendant la croissance planctonique des bactéries. La fluorescence des souches BW25113 P1, bdcA et fliC a été suivie en milieu de culture contenant ou non le CDA, et l'activité des promoteurs ainsi que la concentration en GFP pour chaque promoteur ont été calculées. Les résultats sont présentés en Figure 5.2.

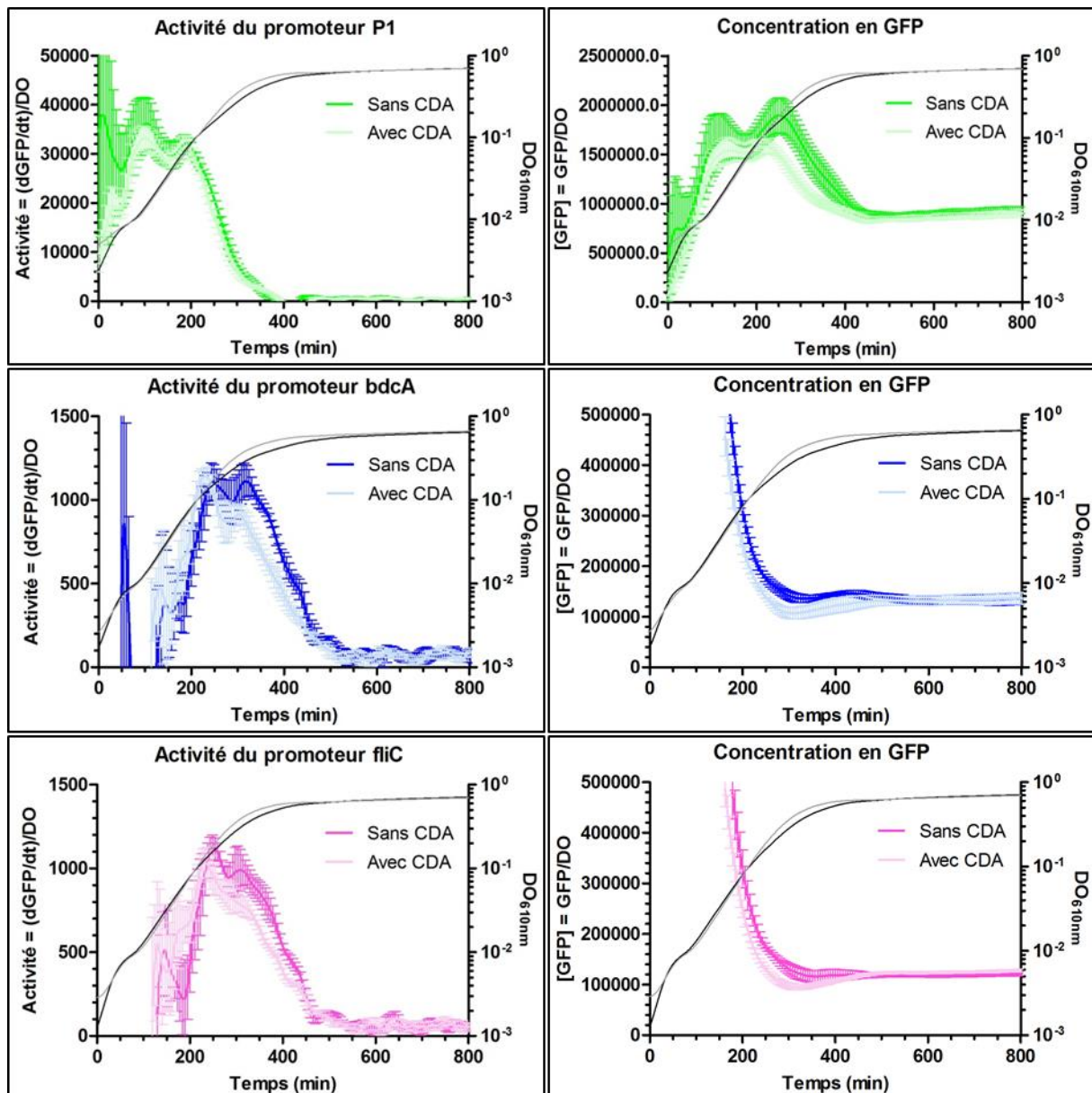


Figure 5.2. Activité des promoteurs et concentration en GFP en croissance planctonique, sans et avec CDA, pour les souches BW25113 P1, bdcA et fliC. Les courbes de croissance sont reportées en noir en absence de CDA et en gris en présence de CDA pour chaque rapporteur. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de la mesure de 6 puits dans la plaque de lecture.

Les activités des promoteurs et les concentrations en GFP des rapporteurs présentent des profils globalement similaires pour les conditions avec et sans CDA, lors de la croissance planctonique, pour chaque souche considérée (Figure 5.2). Cependant, ces deux paramètres sont légèrement plus faibles en présence de CDA entre la fin de la phase exponentielle de croissance et l'entrée en phase stationnaire. Cette observation peut s'expliquer par la croissance légèrement plus rapide des bactéries en présence de CDA dans cette fenêtre de temps, comme le montrent les courbes de croissance des souches (courbes noires et grises). Ceci est conforté par le fait que les bactéries en présence de CDA entrent plus tardivement en phase stationnaire, comme décrit au paragraphe précédent. Par ailleurs, le CDA n'augmente pas l'activité des promoteurs étudiés : la molécule n'induit donc pas l'expression des rapporteurs P1, bdcA et fliC lors de la croissance bactérienne planctonique.

Finalement, le CDA ne semble avoir d'effets ni sur la vitesse spécifique de croissance des souches ni sur l'expression des rapporteurs lorsque les bactéries sont en mode de vie planctonique. Toute réponse

des bactéries au sein des biofilms après application du dispersant sera donc spécifique d'un mode de vie communautaire.

5.2 Effets du CDA sur les bactéries en mode de vie communautaire

Les effets du CDA sur les bactéries en mode de vie communautaire ont été évalués à deux niveaux : (i) structures des biofilms et (ii) expression des rapporteurs au sein des biofilms.

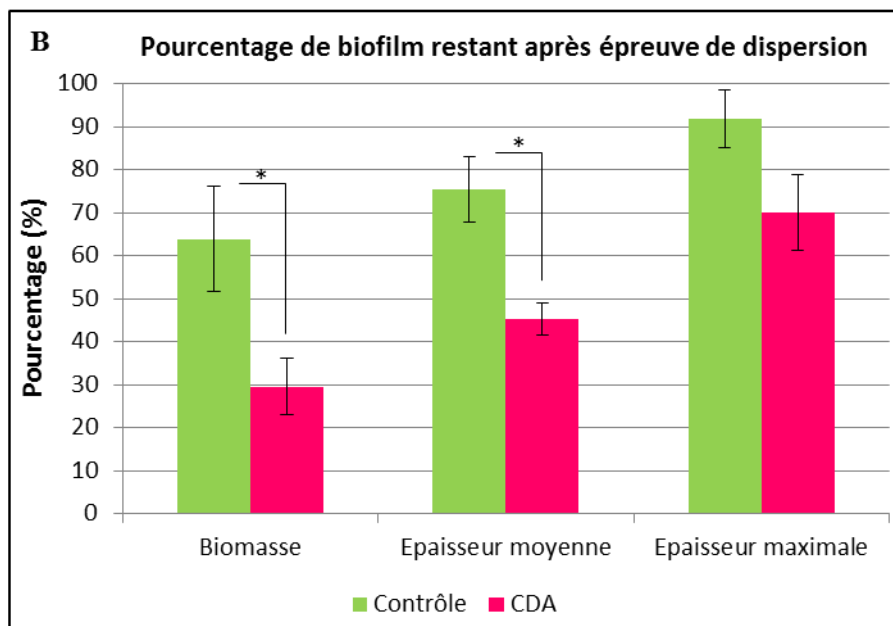
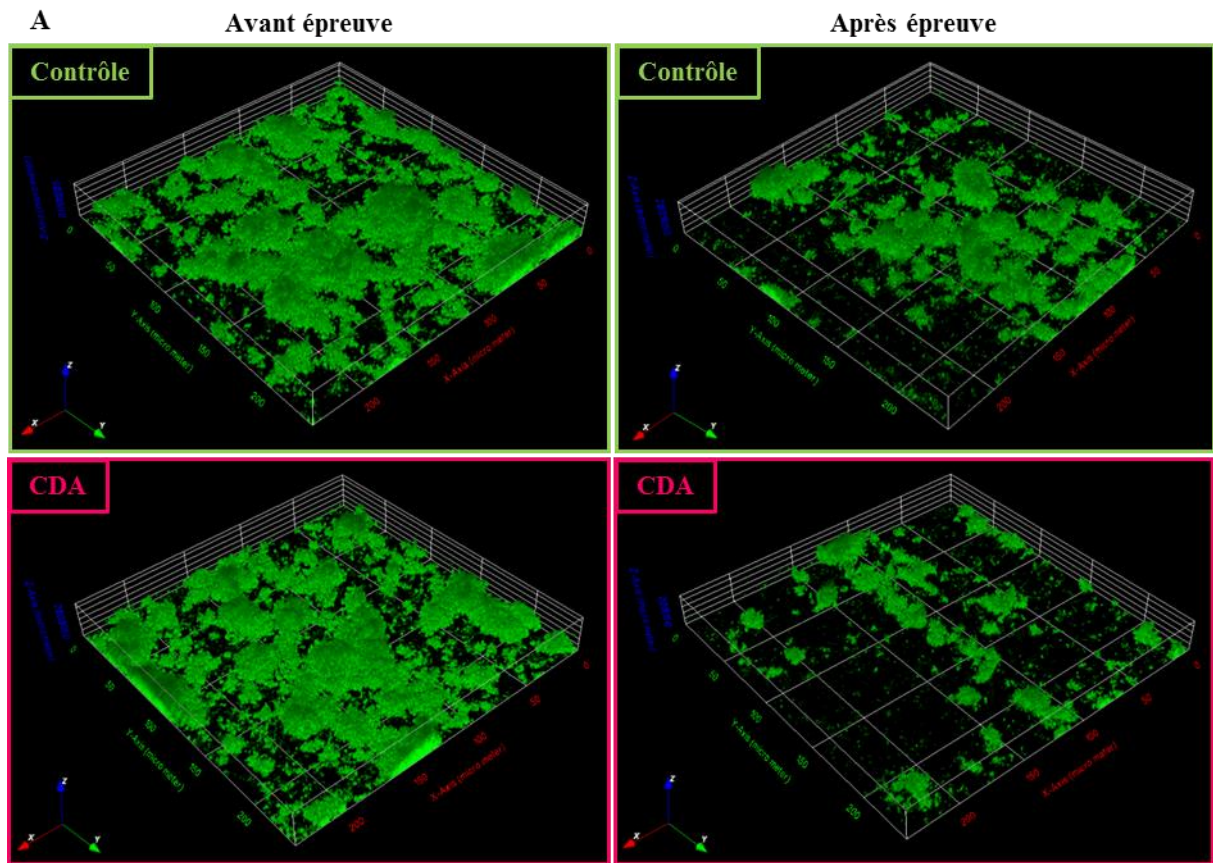
5.2.1 Effets du CDA sur les structures des biofilms

Comme décrit au chapitre 4, la souche BW25113 P1 est un bon indicateur de la biomasse bactérienne et permet de s'affranchir d'une étape préalable de marquage des biofilms. C'est donc celle qui a été utilisée dans les essais d'évaluation des effets du CDA sur les structures des biofilms.

Des épreuves de dispersion ont été réalisées avec la molécule CDA sur des biofilms d'*E. coli* souche BW25113 P1 développés en microfluidique. Les biofilms sont incubés 72 h à 22°C en milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA, introduit à un débit de 50 µL/min. L'épreuve de dispersion consiste en l'injection de milieu de culture contenant 110 µM de CDA et 0,7 % (v/v) d'éthanol ou en l'injection contrôle (milieu de culture + 0,7 % (v/v) éthanol), suivie de 1 h d'incubation et de 15 min de lavage. Pour des informations complémentaires, regarder la section 2.4 du chapitre 2.

5.2.1.1 Mise en évidence des effets du CDA par rapport au contrôle

Des séries d'images en z sont acquises par CLSM à différents endroits du biofilm avant et après l'épreuve de dispersion, référées respectivement comme « avant épreuve » et « après épreuve ». Les résultats sont présentés dans la Figure 5.3.



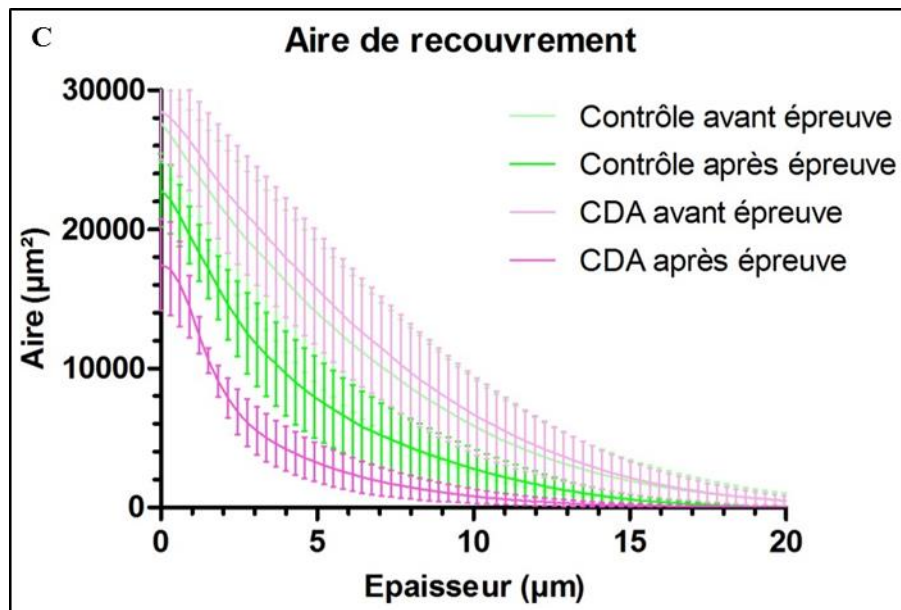


Figure 5.3. Dispersion des biofilms d'*E. coli* souche BW25113 P1 formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA. (A) Représentations tridimensionnelles des biofilms avant et après l'épreuve de dispersion, en présence et absence de CDA, générées par le logiciel Icy. (B) Proportions de biomasse, d'épaisseur moyenne et d'épaisseur maximale restant après l'épreuve de dispersion pour des biofilms ayant reçu le CDA et pour des biofilms ayant reçu l'injection contrôle. (C) Aire de recouvrement des biofilms en fonction de l'épaisseur des biofilms (l'épaisseur à 0 µm correspond au substrat), pour des biofilms ayant reçu le CDA et pour des biofilms ayant reçu l'injection contrôle, avant et après l'épreuve de dispersion. Les images ont été acquises en CLSM (microscope confocal SP2) avec un pas de 0,3 µm. Les moyennes et barres d'erreur associées en (B) sont issues de trois expériences indépendantes pour lesquelles quatre régions des biofilms avant et quatre régions après épreuve de dispersion ont été observées à chaque fois. Les moyennes et barres d'erreur associées en (C) sont les résultats de l'une des trois expériences. Les paramètres en (B) et (C) sont mesurés avec COMSTAT. Les astérisques indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) entre le contrôle et le CDA.

On observe sur la Figure 5.3A que le biofilm diminue significativement après l'épreuve, avec ou sans CDA ; toutefois la diminution est beaucoup plus importante en présence de CDA. Avec le logiciel COMSTAT, comme expliqué au chapitre 2, il est possible d'obtenir des caractéristiques structurales descriptives du biofilm telles que sa biomasse ou ses épaisseurs moyenne et maximale. Le rapport de ces paramètres avant et après l'épreuve de dispersion, représenté sur la Figure 5.3B, permet d'apprécier quantitativement l'effet du CDA par rapport au contrôle. En effet, le rapport des réductions du biofilm, avec CDA par rapport au contrôle, vaut $2,2 \pm 0,1$ ($p < 0,05$) pour la biomasse, $1,7 \pm 0,2$ ($p < 0,05$) pour l'épaisseur moyenne et $1,3 \pm 0,3$ pour l'épaisseur maximale. Les aires occupées par les biofilms à chaque épaisseur après dispersion sont également plus petites dans le canal CDA que dans le canal contrôle, alors que les aires de recouvrement avant épreuve sont équivalentes pour les deux canaux (Figure 5.3C). Toutes les couches du biofilm sont affectées par la dispersion avec le CDA, ce qui confirme une diffusion de la molécule dans les couches profondes du biofilm. Ce résultat est particulièrement intéressant, c'est en effet la première fois que l'effet dispersant du CDA en fonction de la profondeur du biofilm est observé.

Comme remarqué plus haut, on observe systématiquement une perte de biomasse, d'épaisseur moyenne, d'épaisseur maximale et d'aire de recouvrement en fonction de l'épaisseur du biofilm dans le canal contrôle. Ces pertes peuvent être dues à différents facteurs : le processus d'injection qui peut générer des turbulences dans le canal et induire ainsi une dispersion mécanique, le processus de lavage avec une action hydrodynamique ou la présence de l'éthanol contenu dans le milieu qui peut agir chimiquement sur le biofilm. Afin de vérifier le rôle de l'éthanol, une épreuve de dispersion avec un contrôle supplémentaire a été réalisée.

5.2.1.2 Effet de l'éthanol

Afin de tester l'effet de la présence d'éthanol sur la dispersion des biofilms, trois conditions d'épreuve ont été testées : les deux précédentes (référées « contrôle » et « CDA ») et une nouvelle consistant en l'injection de milieu de culture (référée « M9 »). Les résultats sont présentés dans la Figure 5.4.

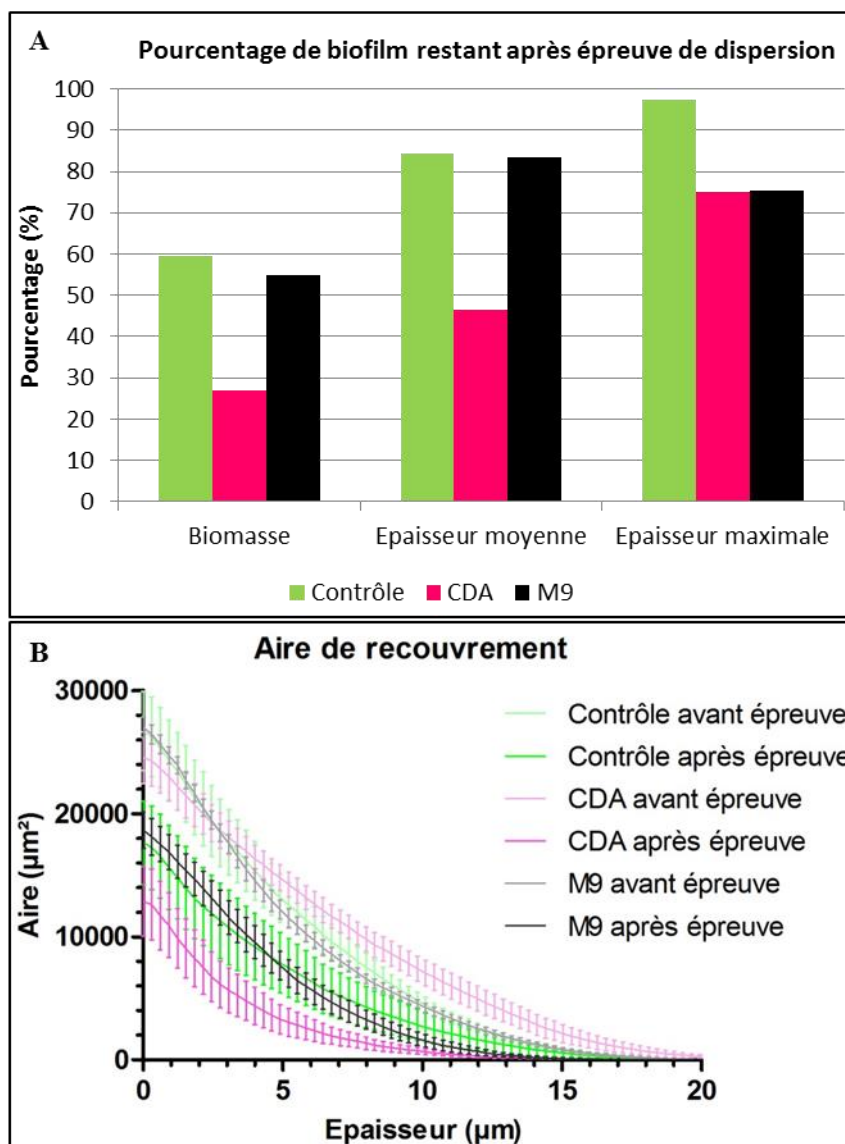


Figure 5.4. Effet de la présence d'éthanol lors de la dispersion des biofilms d'*E. coli* souche BW25113 P1 formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA. (A) Rapports de biomasse, d'épaisseur moyenne et d'épaisseur maximale avant et après épreuve de dispersion pour des biofilms ayant reçu le CDA (CDA), l'injection contrôle (contrôle) ou uniquement le milieu de culture (M9). (B) Aire de recouvrement des biofilms en fonction de leur épaisseur, pour des biofilms ayant reçu le CDA, le contrôle ou le milieu de culture, avant et après l'épreuve de dispersion. Les images ont été acquises en CLSM (microscope confocal SP2) avec un pas de 0,3 μm . Les moyennes sont issues de quatre régions des biofilms avant et quatre régions après épreuve de dispersion pour chaque condition lors d'une expérience. Les paramètres sont mesurés avec COMSTAT.

L'injection M9 (sans éthanol) a autant d'effet sur les biofilms que l'injection contrôle (avec éthanol) en ce qui concerne la biomasse, l'épaisseur moyenne et l'aire de recouvrement par couche des biofilms (Figure 5.4). On confirme donc bien que l'éthanol n'a aucun effet sur la dispersion. La dispersion des biofilms « contrôle » et « M9 » serait ainsi plutôt liée aux effets de l'injection ou du lavage. La dispersion plus importante observée en présence du CDA est par conséquent due à cette molécule.

Toutefois, on peut se demander quelle est la part de dispersion occasionnée par l'injection et par le lavage dans les diverses conditions. Afin de répondre à cette question, une épreuve de dispersion avec des acquisitions en CLSM supplémentaires avant l'étape de lavage a été réalisée et est présentée dans le paragraphe suivant.

5.2.1.3 Effet du lavage

Trois séries d'images de CLSM ont été acquises en présence et en absence de CDA : (i) une série avant l'étape d'injection, au début de l'épreuve de dispersion (référée « avant épreuve »), (ii) une série après la période d'incubation, juste avant l'étape de lavage (référée « avant lavage ») et (iii) une série après l'étape de lavage, à la fin de l'épreuve de dispersion (référée « après épreuve »). Les résultats sont présentés dans la Figure 5.5.

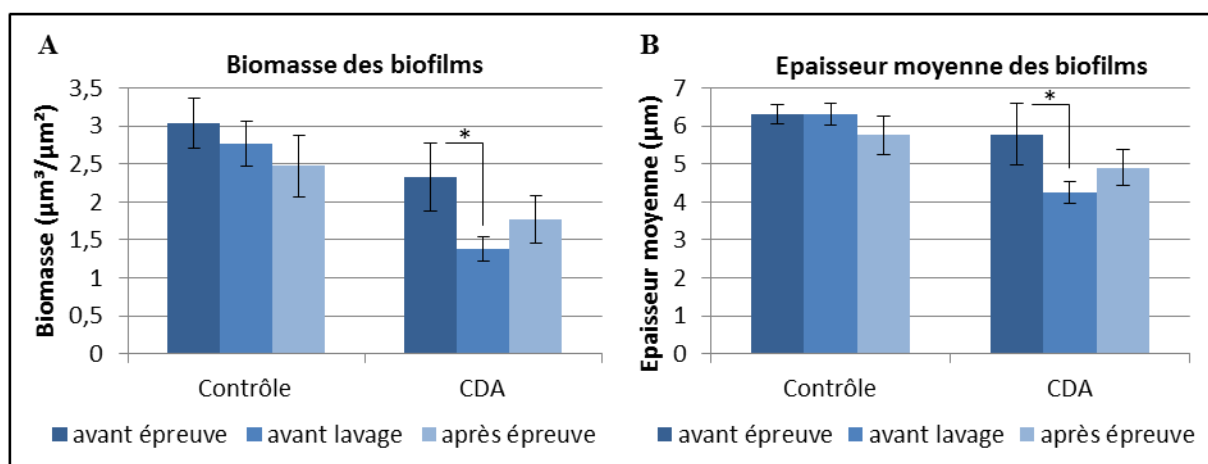


Figure 5.5. Effet du lavage lors de la dispersion des biofilms d'*E. coli* souche BW25113 P1 formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA. Biomasse (A) et épaisseur moyenne (B) des biofilms avant épreuve, avant lavage et après épreuve de dispersion en présence et en absence de CDA. Les images ont été acquises en CLSM (microscope confocal SP8) avec un pas de $0,5 \mu\text{m}$. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de trois régions des biofilms pour les images avant lavage et de quatre régions des biofilms pour les images avant et après épreuve de dispersion lors d'une expérience. Les paramètres sont mesurés avec COMSTAT. Les astérisques indiquent des différences significatives ($p < 0,05$).

Tout d'abord, les résultats suggèrent que le lavage n'a pas d'effet sur les paramètres structuraux mesurés (pas de différences significatives observées entre « avant lavage » et « après épreuve »).

Par ailleurs, l'effet dispersant du CDA est encore confirmé ; il s'observe déjà avant l'étape de lavage avec une diminution significative des paramètres mesurés ($p < 0,05$) (Figure 5.5). Cependant, nous n'observons pas, comme attendu, une diminution significative des paramètres structuraux en présence de CDA entre avant et après l'épreuve de dispersion ($p < 0,15$).

Pour le contrôle, même si une tendance de diminution semble s'observer, les paramètres des trois séries varient peu, indiquant une faible dispersion, ce qui paraît surprenant par rapport aux essais précédents (Figure 5.3).

Une hypothèse pouvant expliquer ces dernières observations est que les régions du biofilm observées lors de cet essai sont très hétérogènes, ce qui induirait des variations de biomasse et d'épaisseur moyenne trop importantes pour observer un effet significatif entre avant et après épreuve pour le CDA et le contrôle. En effet, les quatre positions observées avant épreuve sont différentes de celles observées après épreuve car les microscopes confocaux (SP2 et SP8) des plateformes d'imagerie utilisés ne disposent pas de platine motorisée XY. Une façon de s'affranchir de cette hétérogénéité

serait de pouvoir observer les mêmes régions des biofilms à chaque série d'acquisition d'images, c'est-à-dire les mêmes régions entre avant et après épreuve de dispersion.

Afin de tester cette hypothèse et de mesurer l'impact de l'hétérogénéité des régions de biofilms observées sur les résultats des épreuves de dispersion, un masque adapté aux cellules de flux ibidi® utilisées dans ces travaux a été conçu et développé dans le but de pouvoir repositionner les chambres à des endroits spécifiques, et d'observer ainsi les mêmes régions des biofilms au cours des essais de dispersion. L'idée de la conception du masque ainsi que les épreuves de dispersion réalisées avec repositionnement des chambres fluidiques sont présentées dans le paragraphe suivant.

5.2.1.4 Effet du repositionnement dans les chambres fluidiques

L'hétérogénéité des biofilms est une caractéristique susceptible d'entraver l'évaluation fine de l'effet dispersant de la molécule CDA. La Figure 5.6 présente schématiquement l'impact de l'hétérogénéité des régions des biofilms scannées par microscopie sur les résultats des épreuves de dispersion.

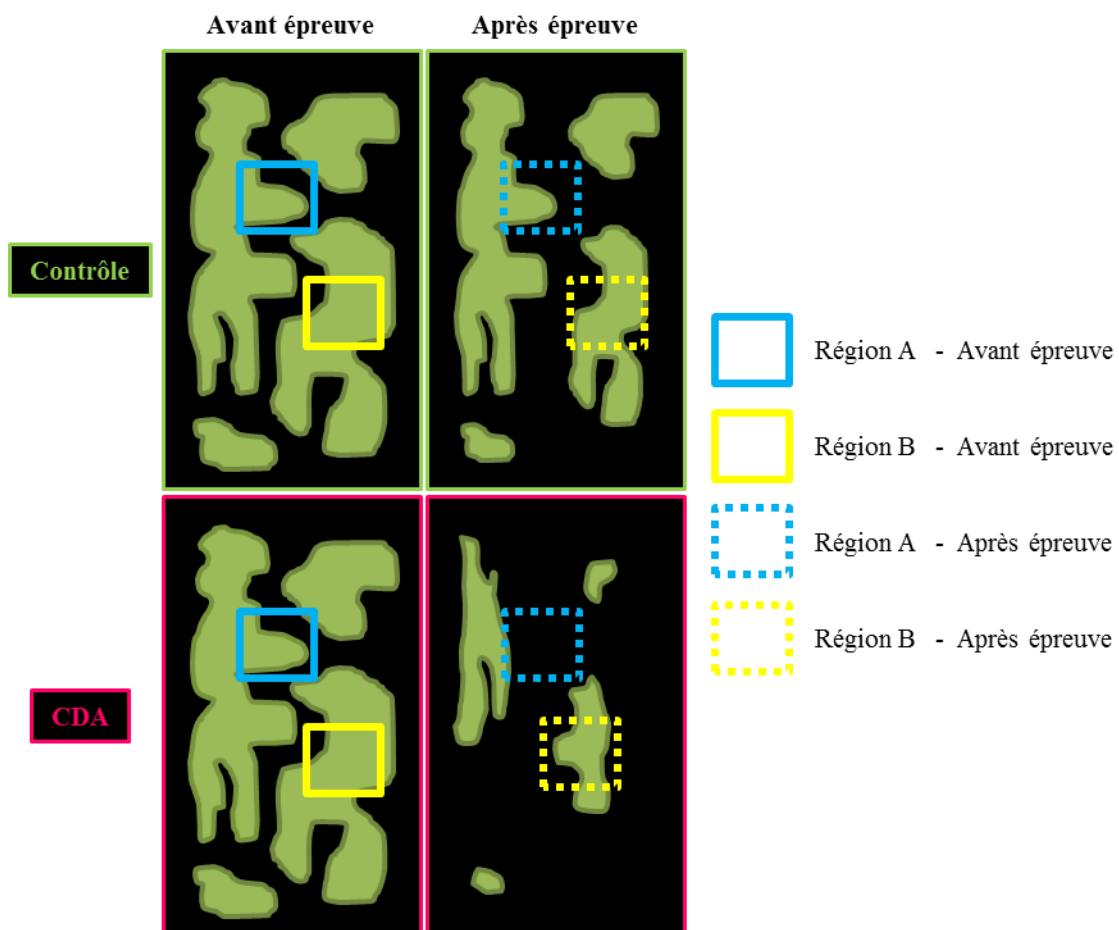


Figure 5.6. Schéma de l'impact de l'hétérogénéité des biofilms sur les résultats des épreuves de dispersion. Les encadrements roses correspondent au canal recevant le CDA, ceux en vert correspondent au canal contrôle. Les encadrements bleus et jaunes correspondent à deux régions distinctes du biofilm, respectivement A et B, ceux en trait plein sont les régions avant épreuve et ceux en pointillés sont les régions après épreuve.

Imaginons la situation où des biofilms sont identiquement développés au sein des chambres fluidiques (Figure 5.6). Soient deux régions distinctes du biofilm, nommées A et B. Dans l'une des chambres est injectée la molécule dispersante CDA, dans l'autre le milieu de culture, constituant le contrôle. Pour chaque canal, le microscope confocal scanne une région du biofilm avant et une région du biofilm après l'épreuve de dispersion. Le non repositionnement des zones scannées correspond au fait que le

microscope confocal scanne une région différente du biofilm entre avant et après épreuve de dispersion (les combinaisons « avant A + après B » et « avant B + après A » sur la Figure 5.6). On voit qu'on pourrait avoir dans certains cas l'impression d'une dispersion faible alors qu'il n'en est rien. Cette méthode permet d'atteindre des valeurs moyennes indicatives, donnant une bonne idée de la dispersion des biofilms, mais ne suffit pas à une caractérisation plus fine.

En revanche, le repositionnement des zones scannées permet au microscope confocal d'imager la même région du biofilm avant et après épreuve de dispersion (combinaisons « avant A + après A » ou « avant B + après B ») ; on observe alors l'effet dispersant local, ce qui donne une meilleure idée de la dispersion. Il paraît donc important de pouvoir repositionner l'échantillon après dispersion exactement sur les régions du biofilm observées avant dispersion.

Dans cette optique, un masque adapté aux cellules de flux ibidi® utilisées dans ces travaux a été conçu. En effet, le modèle ibidi® présente des réservoirs en entrée et en sortie de chambre autour desquels il est possible d'encaster un masque. Ce masque est conçu aux dimensions de la cellule de flux et des gravures en croix viennent repérer cinq positions distinctes au niveau des chambres fluidiques. Ces repères en croix permettent de repositionner l'échantillon à l'endroit désiré. La Figure 5.7 présente le masque de la cellule de flux ibidi® qui a été développé pour ces travaux, en collaboration avec Jeff Audibert et Jean-Pierre Lefèvre du laboratoire de photophysique et photochimie supramoléculaires et macromoléculaires (PPSM) et la société de tôlerie industrielle et mécanique (STIM) à Cachan.

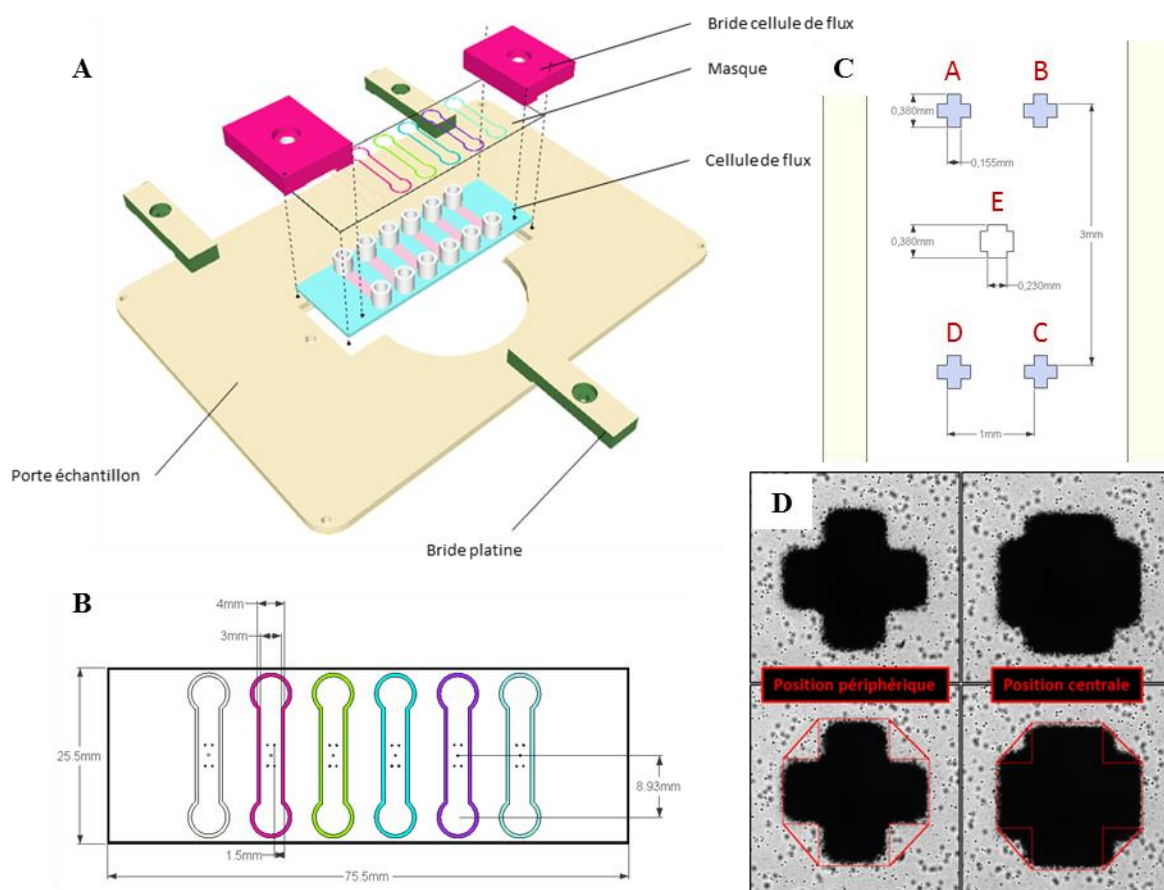


Figure 5.7. Masque de la cellule de flux ibidi®. (A) Masque dans le contexte du montage expérimental. (B) Dimensions du masque et localisation des positions dans le masque. (C) Dimensions des positions périphériques (A-D) et centrale (E) au sein du masque. (D) Repositionnement de la cellule de flux par recouvrement des régions d'intérêt (ROI) via le masque. Les images de cette figure ont été réalisées par Jeff Audibert du PPSM.

Le masque a été conçu aux dimensions de la cellule de flux ibidi® afin qu'il puisse s'encaster sur le dessus des réservoirs d'entrée et de sortie des chambres fluidiques (Figure 5.7A et B). Le matériau du masque est un film polyester gélifié de 0,1 mm d'épaisseur. L'impression du masque est réalisée par un phototraceur de chez FilmStar-PLUS® avec une résolution de 8128 dpi et une résolution garantie par l'impression de 10 µm. Dans chaque canal du masque sont gravés cinq repères en forme de croix permettant d'identifier cinq régions distinctes du biofilm : quatre régions périphériques (positions A, B, C et D) et une région centrale (position E) (Figure 5.7C). Le positionnement et le repositionnement de l'échantillon à une position particulière s'opèrent en transmission en faisant coïncider le repère en croix du masque avec la région d'intérêt (ROI) correspondante sur la fenêtre de prévisualisation du logiciel de microscopie Micro-Manager (Figure 5.7D). Ces étapes nécessitent donc l'observation des repères en croix du masque au-dessus de la cellule de flux, ce qui implique de passer par un objectif de grossissement moindre que celui d'imagerie des biofilms et de distance de travail adaptée. En effet, l'objectif x100 du microscope confocal SP8 ne permettant pas de faire la visualisation, cette dernière s'effectue en passant sur l'objectif x10 qui a une distance de travail supérieure à 1,7 mm.

Le repositionnement des chambres par la stratégie de recouvrement des ROI a été testé sur les biofilms d'*E. coli* formés en microfluidique. La Figure 5.8 montre le résultat pour une position du canal.

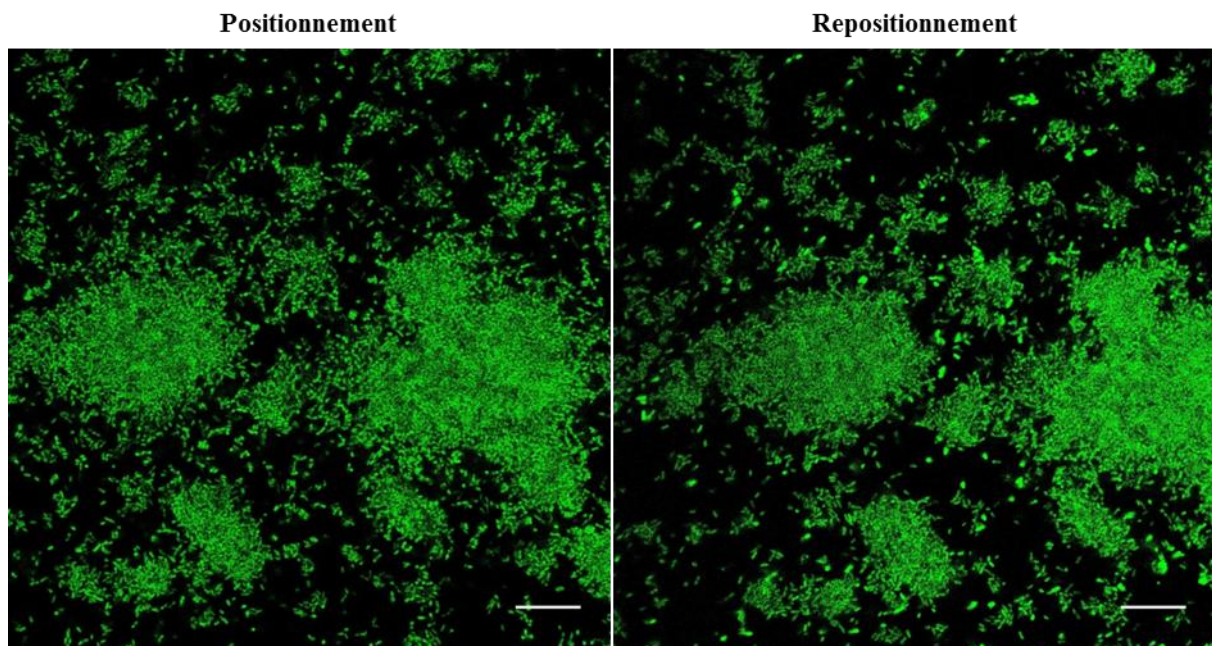


Figure 5.8. Test *in vitro* de repositionnement des chambres par recouvrement des ROI. Les biofilms d'*E. coli* souche BW25113 P1 sont cultivés comme présenté précédemment. Le repositionnement est effectué après avoir déplacé aléatoirement la platine du microscope (donc après avoir changé de position dans le canal). Les barres d'échelle représentent 20 µm.

La comparaison des images de positionnement et de repositionnement des chambres par la stratégie de recouvrement des ROI montre que la stratégie est efficace (Figure 5.8). En effet, les images de la région observée du biofilm entre positionnement et repositionnement ne sont décalées que d'une dizaine de microns en X et en Y, ce qui est faible par rapport aux dimensions des ROI (380 sur 380 µm). La stratégie est donc validée pour observer les mêmes régions des biofilms entre avant (positionnement) et après (repositionnement) une épreuve de dispersion.

Des expériences de dispersion ont ensuite été réalisées dans les mêmes conditions qu'au paragraphe 5.2.1.1, avec cependant la présence du masque sur les cellules de flux. Les résultats sont présentés en Figure 5.9.

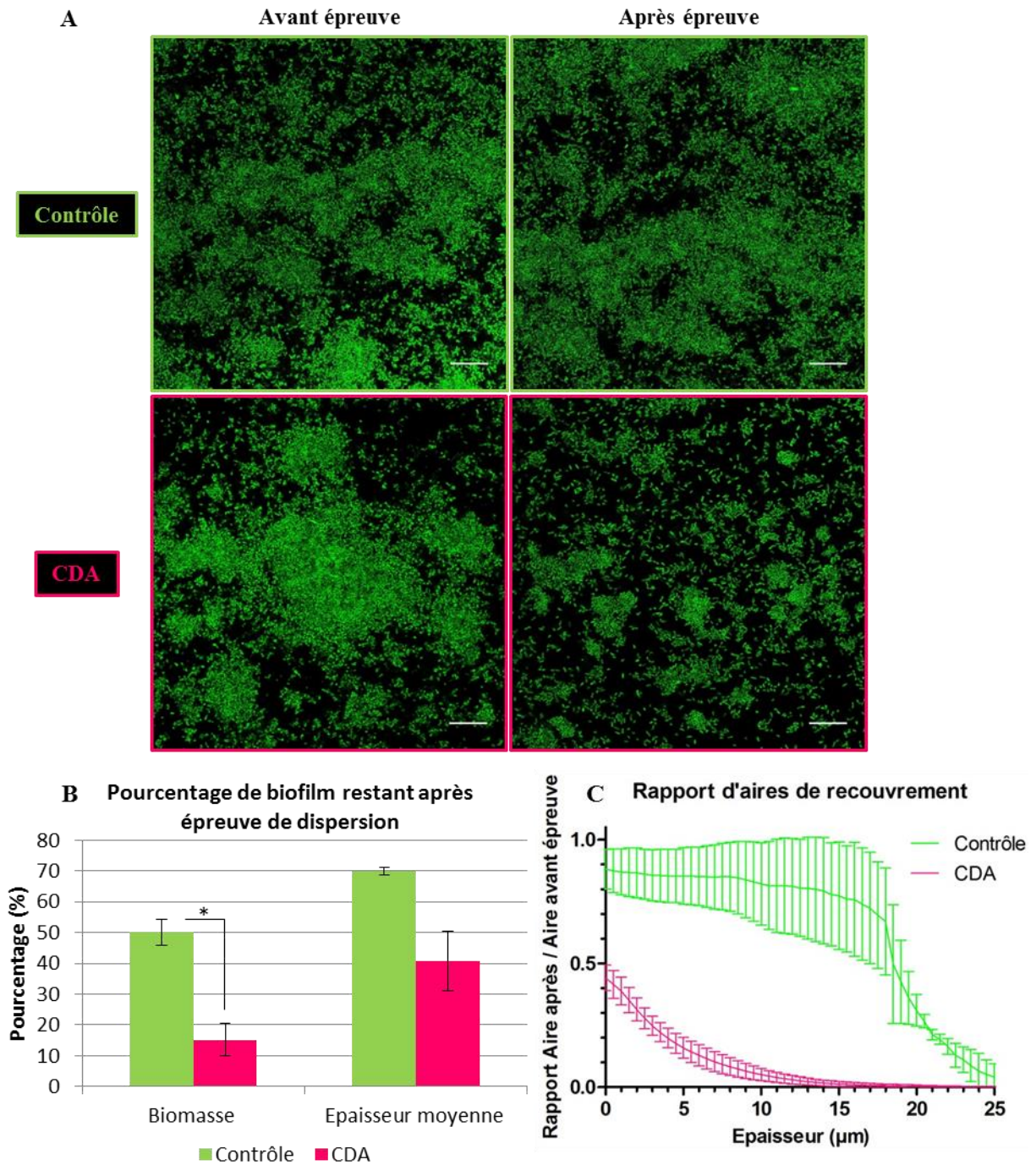


Figure 5.9. Dispersion des biofilms d'*E. coli* souche BW25113 P1 formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA avec repositionnement des chambres par recouvrement des ROI. (A) Images des biofilms à 0 μm d'épaisseur (au niveau du substrat) avant et après épreuve de dispersion, pour la condition avec et la condition sans CDA. (B) Rapports de biomasses et d'épaisseurs moyennes entre avant et après épreuve de dispersion pour des biofilms en présence et en absence de CDA. (C) Rapports d'aires de recouvrement des biofilms en fonction de l'épaisseur des biofilms (0 μm correspond au substrat) entre avant et après épreuve de dispersion, pour des biofilms ayant reçu le CDA et pour des biofilms ayant reçu l'injection contrôle. Les images ont été acquises en CLSM (microscope confocal SP8) avec un pas de 0,5 μm. Les barres d'échelle représentent 20 μm. Les moyennes et barres d'erreur associées sont issues de deux expériences indépendantes pour lesquelles quatre

régions des biofilms avant et après épreuve de dispersion ont été observées à chaque fois. Les paramètres en (B) et (C) sont mesurés avec COMSTAT. L'astérisque indique des différences significatives ($P < 0,05$) entre le contrôle et le CDA.

Visuellement, on constate que le CDA réduit la quantité et affecte la structure des biofilms (Figure 5.9A) ; la molécule semble réduire les biofilms observés à de petites colonies éparses. La réduction est plus importante en présence du dispersant que pour le contrôle, ce qui est en accord avec les données présentées en section 5.2.1.1.

Le rapport des caractéristiques structurales des biofilms – obtenues avec le logiciel COMSTAT – entre avant et après l'épreuve de dispersion permet de quantifier l'effet du CDA. Ainsi, le CDA diminue la biomasse des biofilms 3 ± 1 fois plus que le contrôle et leur épaisseur moyenne $1,8 \pm 0,4$ fois plus (Figure 5.9B). Les images ayant été acquises par repositionnement des chambres *via* le masque, il est possible d'effectuer un rapport d'aire de recouvrement des biofilms entre avant et après épreuve de dispersion pour chaque épaisseur de biofilm. On constate que ces rapports sont plus faibles pour le CDA que pour le contrôle à chaque épaisseur de biofilm, avec notamment un ratio de $0,44 \pm 0,05$ pour le CDA contre un ratio de $0,88 \pm 0,08$ pour le contrôle au niveau du substrat (à $0 \mu\text{m}$ d'épaisseur) (Figure 5.9C). Ces rapports diminuent par ailleurs plus rapidement en présence du dispersant qu'en son absence dans les premières couches des biofilms.

Il est finalement intéressant de comparer les résultats de dispersion sur la biomasse et l'épaisseur moyenne obtenus lors des essais réalisés avec et sans repositionnement des chambres par la stratégie de recouvrement des ROI. Le Tableau 5.1 présente ces résultats.

	Biomasse	Epaisseur moyenne
Sans repositionnement	$54 \pm 3 \%$	$39 \pm 8 \%$
Avec repositionnement	$70 \pm 10 \%$	$40 \pm 10 \%$

Tableau 5.1. Résultats de dispersion sans et avec repositionnement des chambres fluidiques. Les résultats sont les pourcentages de biomasse dispersée et d'épaisseur moyenne des biofilms par rapport au contrôle pour trois expériences indépendantes sans repositionnement et deux expériences indépendantes avec repositionnement.

On améliore donc l'estimation de la dispersion en utilisant la méthodologie proposée : la biomasse dispersée suite à l'application du dispersant est augmentée avec repositionnement (Tableau 5.1). Par contre l'épaisseur moyenne est peu affectée.

Ce résultat vient confirmer l'impact de l'hétérogénéité des régions du biofilm sur les résultats obtenus lors des épreuves de dispersion.

En conclusion, (1) les résultats obtenus lors de cette étape sont en accord avec ceux montrés précédemment : le CDA conduit à la dispersion du biofilm d'*E. coli* BW25113 ; (2) le masque de la cellule de flux ibidi® que nous avons conçu et qui permet le repositionnement des chambres par la stratégie de recouvrement des ROI constitue un outil important pour quantifier l'effet dispersant du CDA.

5.2.2 Effets du CDA sur l'expression des rapporteurs au sein des biofilms

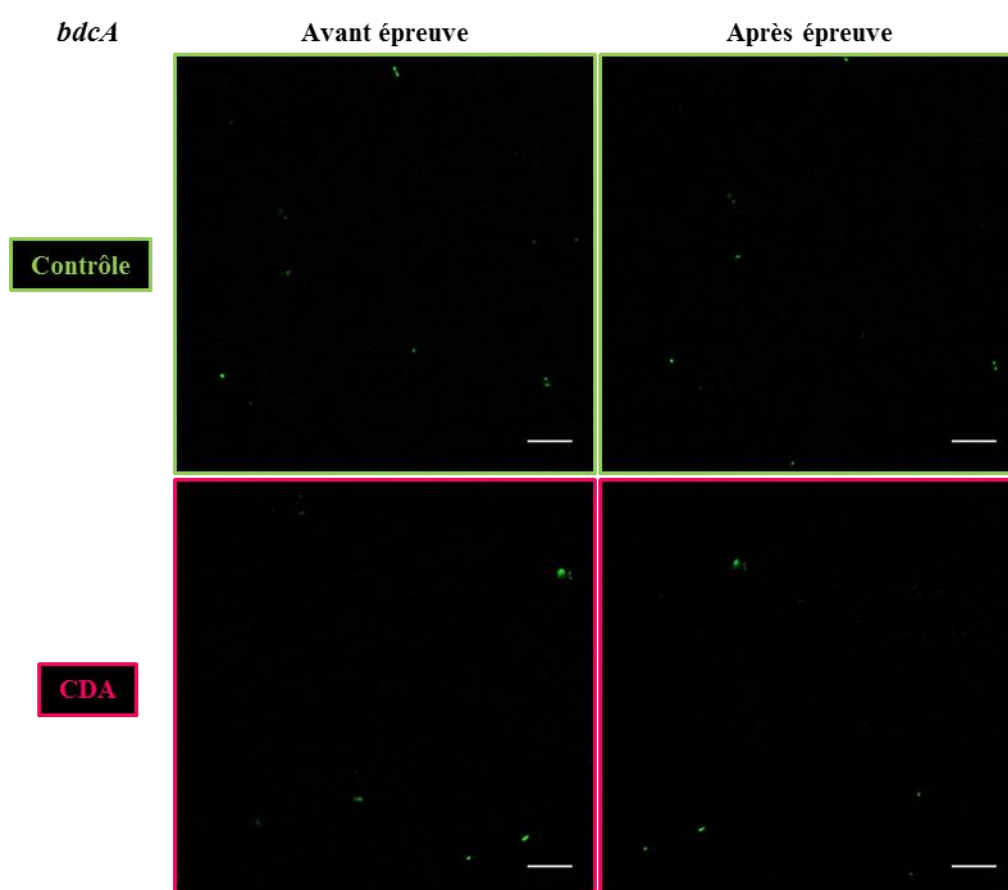
Dans un deuxième temps, l'effet de la molécule dispersante a été étudié sur l'expression des rapporteurs génétiques au sein des biofilms. L'objectif est d'évaluer l'effet du CDA sur l'expression des gènes et opéron *bdcA*, *fliC* et *rrnB* codant respectivement pour une protéine de liaison au c-di-GMP, la flagelline et l'ARNr, lorsque les bactéries sont en mode de vie communautaire.

5.2.2.1 Les rapporteurs *bdcA* et *fliC*

Des épreuves de dispersion ont été réalisées avec la molécule CDA sur des biofilms d'*E. coli* souches BW25113 *bdcA* et *fliC* développés en microfluidique à 72 h de croissance. La fluorescence est inexistante pour *fliC* et très rare pour *bdcA* avant et après épreuve de dispersion (données non montrées) sur les images acquises en CLSM. Aussi de nouveaux essais ont été menés avec les souches BW25113 pKK *bdcA* et BW25113 pKK *fliC*, souches intermédiaires lors des constructions génétiques et décrites au chapitre 4. En effet, dans ces souches, le gène rapporteur est positionné sur le vecteur plasmidique pKK, qui est un plasmide moyen à faible copie (Olliver et al, 2010), ce qui signifie qu'il y a une dizaine de copies du plasmide par cellule, soit une dizaine de copies du rapporteur par cellule. C'est différent des souches BW25113 *bdcA* et BW25113 *fliC* où le rapporteur est positionné sur le chromosome bactérien, résultant ainsi en une unique copie du rapporteur par cellule.

Les biofilms sont incubés 72 h à 22°C dans du milieu minimal M9 supplémenté avec 2 g/L de Glc et 5 g/L de CAA introduit à un débit de 50 µL/min. Les épreuves de dispersion ont été réalisées avec le repositionnement des chambres fluidiques par la stratégie de recouvrement des ROI décrite au paragraphe 5.2.1.4. Pour des informations complémentaires, regarder la section 2.4 du chapitre 2.

Les résultats de ces essais sont présentés dans la Figure 5.10.



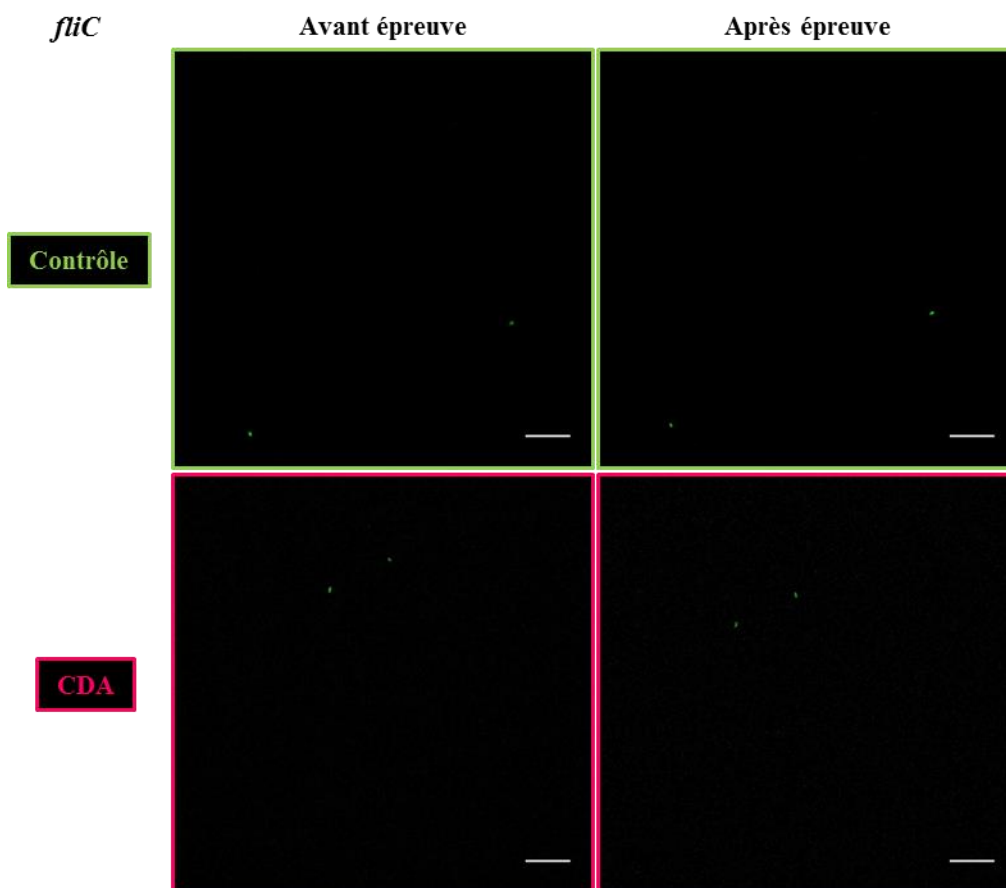


Figure 5.10. Dispersion des biofilms d'*E. coli* souches BW25113 pKK *bdcA* et pKK *fliC* formés en bioréacteur microfluidique par la molécule CDA. Les images ont été acquises en CLSM (microscope confocal SP8) et correspondent à la couche initiale des biofilms (au substrat). Les barres d'échelle représentent 20 μm .

Aucune différence n'est observée entre avant et après dispersion pour les rapporteurs *bdcA* et *fliC* (Figure 5.10). En effet, pour les deux rapporteurs, autant de cellules exprimant la GFP à travers les biofilms sont présentes avant et après épreuve de dispersion, que ce soit pour la condition CDA ou pour la condition contrôle.

En ce qui concerne le promoteur *bdcA*, on observe quelques regroupements de cellules ainsi que des cellules isolées exprimant la GFP. Les petits groupes de cellules étaient déjà observés avec la souche BW25113 *bdcA* où le rapporteur est inséré sur le chromosome bactérien (chapitre 4). Cependant les cellules isolées n'étaient pas détectées avec cette souche. En ce qui concerne le promoteur *fliC*, on observe quelques cellules exprimant la GFP au sein des biofilms. Ceci n'était pas observé avec la souche BW25113 *fliC* où le rapporteur est inséré sur le chromosome bactérien (chapitre 4).

Ainsi, le fait d'avoir les rapporteurs *bdcA* et *fliC* sur le plasmide pKK permet d'augmenter l'intensité de fluorescence par cellule et donc de détecter les bactéries isolées, en plus des regroupements bactériens, exprimant effectivement la protéine BdcA ou la flagelline au sein des biofilms.

Finalement, les épreuves de dispersion avec les rapporteurs *bdcA* et *fliC* n'étant pas concluantes, le rapporteur P1 reste à étudier afin d'observer ou non une adaptation bactérienne à la dispersion des biofilms d'*E. coli* par la molécule CDA.

5.2.2.2 Le rapporteur P1

Des épreuves de dispersion ont été réalisées avec la molécule CDA sur des biofilms d'*E. coli* souche BW25113 P1 développés en microfluidique à 72 h de croissance. Les résultats sont présentés sous forme d'article, rédigé en anglais, soumis au Journal of Microbiological Methods et inséré ci-dessous.

Les travaux présentés dans cet article ont été réalisés en collaboration avec Bertrand Cinquin du LBPA et ont permis l'élaboration d'un outil de quantification des intensités de fluorescence au sein des biofilms au regard de leur architecture. L'outil s'appelle BIAM : Biofilm Intensity and Architecture Measurement.

Understanding the fundamental mechanisms of biofilms development and dispersal: BIAM (Biofilm Intensity and Architecture Measurement), a new tool for studying biofilms as a function of their architecture and fluorescence intensity

Marine Baudin^{a,b,c}, Bertrand Cinquin^a, Bianca Sclavi^a, Dominique Pareau^b, Filipa Lopes^b

^aLaboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée (LBPA, CNRS, UMR 8113)

^bLaboratoire de Génie des Procédés et Matériaux (LGPM, CentraleSupélec, EA 4038)

^cPhotophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (PPSM, CNRS, UMR 8531)

Abstract

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) is one of the most relevant technologies for studying biofilms *in situ*. Several tools have been developed to investigate and quantify the architecture of biofilms. However, an approach to quantify correctly the evolution of intensity of a fluorescent signal as a function of the structural parameters of a live biofilm is still lacking. Here we present a tool developed in the ImageJ open source software that can be used to extract both structural and fluorescence intensity from CLSM data: BIAM (Biofilm Intensity and Architecture Measurement). This is of utmost significance when studying the fundamental mechanisms of biofilm growth, differentiation and development or when aiming to understand the effect of external molecules on biofilm phenotypes. In order to provide an example of the potential of such a tool in this study we focused on biofilm dispersion. *Cis*-2-decenoic acid (CDA) is a molecule known to induce biofilm dispersion of multiple bacterial species. The mechanisms by which CDA induces dispersion are still poorly understood. To investigate the effects of CDA on biofilms, we used a reporter strain of *Escherichia coli* (*E. coli*) that expresses the GFPmut2 protein under control of the *rrnBP1* promoter. Experiments were done in flow cells and image acquisition was made with CLSM. Analysis carried out using the new tool, BIAM, indicates that CDA affects the fluorescence intensity of the biofilm structures as well as biofilm architectures. Indeed, our results demonstrate that CDA removes more than 35 % of biofilm biovolume and suggest that it results in an increase of the biofilm's mean fluorescence intensity (MFI) by more than 26 % compared to the control biofilm in the absence of CDA.

Keywords: biofilm, confocal laser scanning microscopy (CLSM), dispersion, *cis*-2-decenoic acid (CDA), microcolony segmentation, fluorescence intensity.

1. Introduction

It is now well known that most of microorganisms in nature frequently grow as complex communities called biofilms. Biofilms are defined as sessile microorganism communities adhered to a surface and embedded in a self-produced matrix, the polymeric extra substances (Costerton et al., 1995). Biofilms represent a major concern in industry and hospital healthcare settings where they cause severe structural and health problems (Costerton et al., 1999; Hall-Stoodley et al., 2006; Percival et al., 2015; Shi and Zhu, 2009).

Biofilms have been intensely studied over the past decades and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) has been a standard tool for characterizing biofilms *in situ* (Tolker-Nielsen and Sternberg, 2014). Indeed, images acquired by CLSM have been used to evaluate biofilm architectures and to quantify structural parameters such as biomass, area and thickness (Yang et al., 2000). Thus, imaging software packages have been developed by the scientific community to extract quantitative biofilm features from the CLSM images. Among these, the COMSTAT ImageJ plugin (Heydorn et al., 2000; Vorregaard, 2008; <http://www.comstat.dk>), the *daim* computer program (Daims et al., 2006) or the PHLIP Matlab toolbox (Mueller et al., 2006) represent a set of reference tools. Indeed, these tools are efficient and reliable to characterize biofilms in terms of biomass, surface coverage, surface area, thickness distribution, roughness coefficient, diffusion distance, fractal dimension or porosity. However, the relationship between biofilm structures and the fundamental mechanisms at the cellular level involved in biofilm development remains a challenge, as already pointed out by Beyenal and Lewandowski in 2004 (Beyenal et al., 2004). Indeed, several studies have been limited mainly to a qualitative or a relative description of genetic reporters inside biofilms by the use of CLSM (Christensen et al., 2002; Franks et al., 2012; Møller et al., 1998; Serra et al., 2013; Sternberg et al., 1999; Teal et al., 2006). Thus, to our knowledge, there is no commonly used method to quantify both the *in situ* intensity of a fluorescent probe in a live biofilm and the biofilm structural features.

To bridge this gap, in this work, we describe a new tool – called BIAM for Biofilm Intensity and Architecture Measurement – developed in the open, free access ImageJ analysis software. BIAM is able to extract both the structural and the fluorescent parameters of a biofilm. Therefore, the parameters given by our tool are intensities, areas and perimeters of the segmented biofilm from which we can further obtain parameters such as the biofilm biovolume and mean fluorescence intensity as a function of biofilm thickness or distance from the perimeter. Moreover, the studied biofilm can be segmented and analyzed as a unique entity or as a pool of microcolonies. In addition, the script can be used by the scientific community in a semi-automated way.

The potential of the proposed tool is exemplified with data of biofilm dispersion following the addition of a dispersal molecule. Due to the ubiquity of biofilms and their industrial and health consequences, it is of utmost importance to study innovative methods to eliminate them. Dispersion is one of the available strategies to destabilize and remove biofilms. Several cues can trigger a biofilm to disperse. Among these, the fatty acid *cis*-2-decenoic acid (CDA) seems to be promising by the extent of its action on different species (Davies and Marques, 2009). However, the mechanisms behind biofilm dispersal by CDA are not fully understood: does CDA destabilize the biofilm structure and/or does it induce a change in bacterial physiology and gene expression? To answer these questions, the dispersal with CDA of biofilms of an *Escherichia coli* (*E. coli*) reporter strain was studied in a microfluidic system using CLSM. The reporter strain used in this work contains in its chromosome a copy of a shortened version of the *rrnBP1* promoter in front of the gene encoding for a fast-folding variant of the green fluorescent protein (GFPmut2). The *rrnB* operon encodes for the ribosomal ribonucleic acids (rRNA) and constitutes a marker of the metabolic state of the cell. The results

presented here are obtained from a BIAM analysis, and with this specific example we demonstrate that our method is suitable for studying gene expression within biofilms and tracking gene expression changes during the biofilm life cycle.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial strain and culture conditions

Experiments were performed using a genetically modified strain of the bacterial *E. coli* K-12 BW25113 strain (Baba et al., 2006). This strain results from a chromosomal insertion of the in frame fusion of the *rrnBPI* promoter with the *gfpmut2* gene. The construction protocol followed the one of Datsenko and Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). Overnight cultures in LB medium were grown supplemented with 50 µg/mL of kanamycin at 37°C with shaking at 180 rpm. The flow chambers (see section 2.2) were fed with the M9 minimal medium (7.1 g/L Na₂HPO₄, 3 g/L KH₂PO₄, 1 g/L NH₄Cl, 0.5 g/L NaCl, 2 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂, 4 mg/L tryptophane and 5 mg/L thymidine) supplemented with 2 g/L of glucose and 5 g/L of casamino acids.

2.2 Flow chamber experiments

Biofilms were cultivated at 22°C in six-channel flow cells with individual channel dimensions of 0.4 x 3.8 x 17 mm (ibidi® uncoated µ-Slide VI^{0.4}). The flow system was assembled as described previously (Christensen et al., 1998). Briefly, the system consists of a set of serial devices connected by silicone tubes, in the following order: a bottle with fresh growth medium, a peristaltic pump (ISMATEC®, High Precision Multichannel Dispenser), bubble traps (Tolker-Nielsen and Sternberg, 2011), a flow cell (ibidi® uncoated µ-Slide VI^{0.4}) and a waste bottle. The flow system was sterilized by autoclaving all components for 20 min at 121°C, by assembling autoclaved pieces under a laminar flow hood and by feeding the system with a 0.5 % (v/v) sodium hypochlorite solution for at least 2 h. The flow system was then washed overnight with sterile water and each channel was supplied with the M9 medium described above. Once the system has been completely filled with medium, the flow was stopped and the flow cells were inoculated with 200 µL of an overnight bacterial culture by careful injection into each flow chamber through the silicone tubes with a syringe. The inoculum was prepared as follows: an overnight culture was diluted 100 times in LB, cultured for further 45 min and finally diluted in LB to an OD_{600nm} of 0.01 before injection. The flow was resumed 1 h after inoculation. Biofilms were then allowed to grow over 3 days at 22°C with a medium flow rate of 50 µL/min.

2.3 Staining biofilm with nucleic acid dyes

3-days old biofilms were stained with either the SYTO9 or SYTO61 nucleic acid dyes at 7.5 µM and 5 µM, respectively. The staining process consists of the following steps: injection of the dyes into the flow chambers, incubation at 22°C during 30 min and washing with the culture medium for 15 min. Acquisition of images by CLSM was carried out after staining.

2.4 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) image acquisition

Each channel position was bidirectionally scanned using the inverted Leica SP8 confocal laser-scanning microscope (LEICA Microsystems, Germany) at 400 Hz with a 100X/1.40 oil immersion objective lens Leica HCX APO. The GFPmut2 and the SYTO9 fluorophores were excited at 488 nm (respective maximum emission wavelengths of 507 and 498 nm) with the argon laser while the SYTO61 dye was excited at 633 nm (maximum emission wavelength of 645 nm). The channel position scanning provided a stack of horizontal planar images with a z-step of 0.5 µm. The pixel size

of the images was 90.1 nm. The images had 2048 x 2048 pixels, representing a total scanned area of 184.52 x 184.52 μm .

2.5 Image Analysis

The stacks obtained from the CLSM acquisitions were processed using either COMSTAT 2.1 image analysis software or the BIAM ImageJ script presented here.

2.6 Dispersion challenge

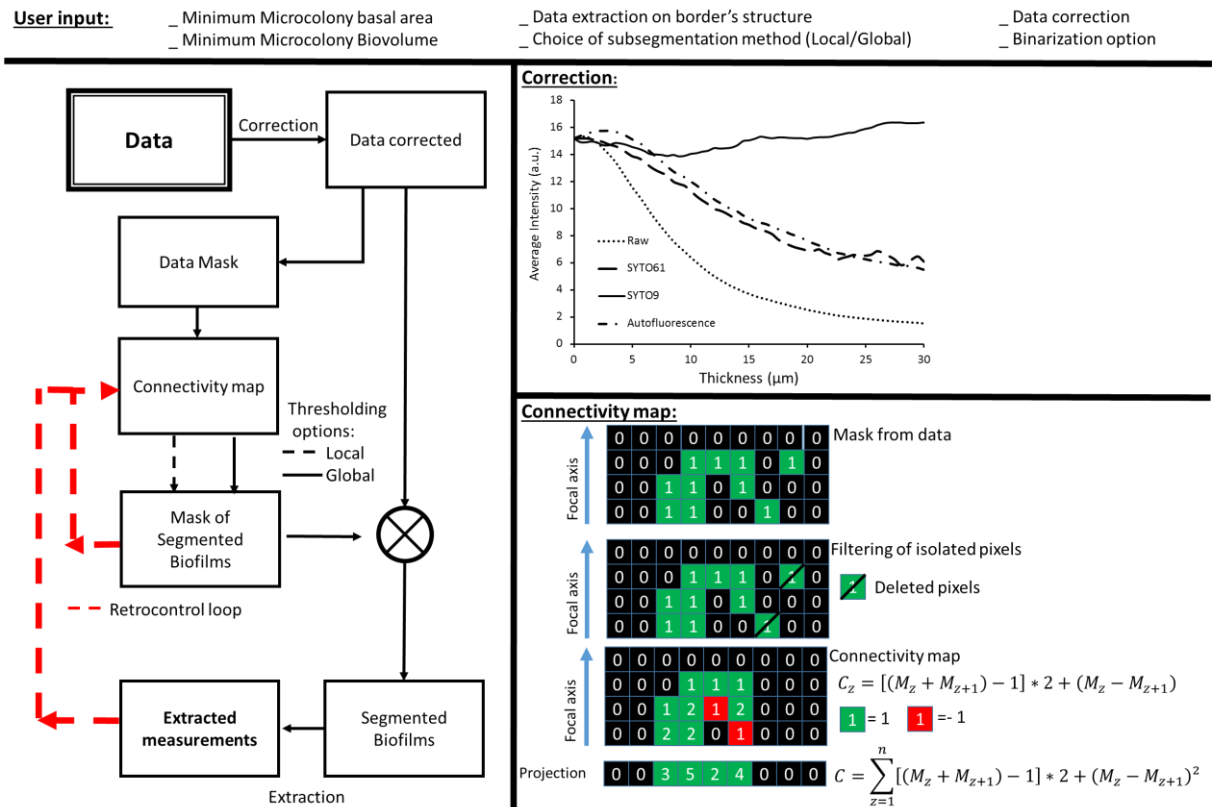
The flow was interrupted and the silicone tubes were clamped upstream of the flow cell just before the dispersion event. Biofilms were then imaged with CLSM at four defined positions in each channel. These image acquisitions are referred as images “before challenge”. 400 μL of either the CDA solution or the control solution were then injected through a micro-septum upstream the flow channel. The injected solutions were incubated in the channels for 1 h. Afterwards, the flow was reestablished at the same flow rate as before dispersion for 15 min in order to wash the system. Stacks of the same four positions were acquired after washing and referred to as images “after challenge”. The CDA solution contains 110 μM of CDA solubilized in 0.7 % (v/v) ethanol in the culture medium whereas the control solution consists of 0.7 % (v/v) ethanol in the culture medium.

3. Results

3.1 Biofilm Intensity and Architecture Measurement (BIAM)

The Biofilm Intensity and Architecture Measurement (BIAM) macro written for the ImageJ software is described hereafter. The approach and its critical steps are detailed in Figure 1. The overall process of BIAM is explained in the next sections.

In the particular case of this work, we aim at quantifying the *in situ* fluorescence intensity of the GFPmut2 associated to the *rrnBP1* promoter, which constitutes a marker of the metabolic state of the cell.



3.1.1. Fluorescence intensity correction on CLSM data

Considering the three dimensional dataset obtained by CLSM and our goal of quantifying *in situ* fluorescence intensity within the biofilm structure, we establish first a process to insure the quality of the data extracted (Figure 1 left upper panel).

CLSM is a standard technique used to obtain data on thick specimens minimizing the point spread function (PSF) compared to full field microscopy where no focal plane selectivity is achieved. However, within a biofilm, signal degradation due to diffusion, absorption and scattering by interaction of the light with the local environment can become problematic. Commercial confocal software packages usually propose an alteration of the detector gain or an alteration of the laser power to insure a homogeneous intensity along the z-axis. However, since we are interested in the *in situ* intensity of the signal, which means relative to its position within the biofilm, this solution is not possible. The measurement of the PSF of calibrated fluorescent beads deposited on a coverslip (Diaspro et al., 2002) can be conducted to give relevant information on fluorescence degradation effects, as the deeper beads will have a more deformed PSF. However, the effect of biofilm structure on signal attenuation is not taken into account with this approach. In addition, beads and bacteria must have approximately the same size and their fluorescence emission must be similar to the one used in the experiment (GFPmut2 here).

Here, to perform the fluorescence intensity correction, two assumptions were considered: (i) biofilms grown with the same conditions will have comparable structures and (ii) the fluorescence intensity of bacteria labeled with nucleic acid markers is independent of their position within the biofilm. (It should be pointed out that microscopic observations confirmed that the lower biofilm layers were correctly stained with the nucleic acid dyes).

For each biofilm stack, we consider that the intensity measured is lower than the real one due to some attenuation factors influencing the excitation, the emission and various scattering effects. Deciphering each factor independently cannot be achieved without using models that mimic a biofilm structure and fluorescent beads. However, the overall coefficient of correction can be obtained by measuring the fluorescence intensity of a dye known to be homogeneous in intensity independently of its position within the biofilm.

We define the mean fluorescence intensity at a depth z by the total intensity of the slice z divided by the biomass area of that slice.

For a biofilm homogeneously labeled with a nucleic acid dye (ext), the correction factor dependent on the biofilm thickness $Correction_{ext}(z)$ is given by the ratio of the mean fluorescence intensity at a certain depth $I_{ext\ measured}(z)$ and the mean fluorescence intensity at the substratum $I_{ext\ measured}(0)$ where the attenuation factors are null.

$$Correction_{ext}(z) = I_{ext\ measured}(z) / I_{ext\ measured}(0)$$

Indeed, for a biofilm homogeneously labeled with an external marker, we expect a mean fluorescence intensity independent of the biofilm depth (assumption ii), that is:

$$I_{ext\ corrected}(z) = I_{ext\ measured}(0)$$

For the biofilm expressing the GFPmut2 (simplified as GFP in the following equations), the mean GFP intensity of each layer z as a function of biofilm depth corrected of the various scattering effects is given by the following equation:

$$I_{GFP\ corrected}(z) = I_{GFP\ measured}(z) / Correction_{GFP}(z)$$

In accordance with the first assumption and assuming that the nucleic acid dye and the GFP have similar spectral properties, the following expression can be obtained:

$$Correction_{ext}(z) = Correction_{GFP}(z)$$

We then apply this correction to the biofilm as a single multiplication:

$$I_{GFP\ corrected}(z) = I_{GFP\ measured}(z) / Correction_{ext}(z)$$

To measure the dependence of the excitation and emission wavelengths on the correction factor, we consider different conditions. Biofilms were stained with the nucleic acid markers SYTO61 ($\lambda_{ex} = 628$ nm, $\lambda_{em} = 645$ nm) and SYTO9 ($\lambda_{ex} = 485$ nm, $\lambda_{em} = 498$ nm). The autofluorescence intensity was also determined. We assume that the bacteria have the same autofluorescence independently of their position within the biofilm.

The raw and corrected fluorescence intensities of GFPmut2 over biofilm depth for the different conditions are presented in Figure 1. The supplementary Figure S1 shows the impact of a SYTO9 correction on the CLSM images of an *E. coli rrnBP1-gfpmut2* biofilm.

Poor results were obtained by measuring autofluorescence to obtain the correction, as the signal to noise ratio for autofluorescence becomes very low above a dozen micrometers from the bottom of the biofilm. An increase of the laser power would be required to obtain accurate data but this procedure might damage the biofilm.

The resulting mean fluorescence intensity trends are clearly dependent on the correction factor used (Figure 1). As expected, spectral properties of the markers do affect the intensity profile obtained. The GFPmut2 protein used in our ribosomal promoter reporter strain has a maximum emission wavelength at 507 nm. The maximum emission wavelengths of SYTO61 and SYTO9 are 645 and 498 nm respectively. The closer the excitation and emission wavelengths are to the studied fluorophores, the better the correction is expected. SYTO9 would then be the best choice. Indeed, compared to the other markers, SYTO9 gives a correction resulting in a trend of intensities which is more similar to what is commonly expected regarding bacterial growth in biofilms (Figure 1), where ribosomal promoter activity is expected to be higher in the highest parts of the biofilm where there is a greater access to nutrients (Teal et al., 2006).

Similar trends of average fluorescence intensity of SYTO9 and SYTO61 over biofilm depth were observed in biofilms presenting different structures (data not shown).

3.1.2 Segmentation strategies

Segmenting a biofilm is defining what is a part of the biofilm from what is a part of the surrounding environment. The biofilm can be described as a tri-phase system composed by bacteria, the extracellular matrix and voids. In this work, only the bacteria are imaged (detected by nucleic acid markers or GFP) and no distinction is made between the extracellular matrix and biofilm voids. Moreover, the biofilm upper limit, i.e in contact with the bulk medium, is identified by detecting the fluorescence of bacteria from the upmost layers.

In the process of image analysis, distinguishing the biofilm from the surrounding bulk environment is a first step carried out by performing a connectivity map as illustrated on the right panel of Figure 1. To go further, we can apply a threshold of the projection of this connectivity map to segment the subsets of the biofilm that may represent different microcolonies. The user can input different values to drive the segmentation: the choice of segmentation itself (that will be described in the next section), the minimal area at the substratum that can be considered as a microcolony and the minimal biovolume.

3.1.3 Connectivity map: from one slice to another

To carry the information of how bacteria are connected with each other along the focal axis, we are computing a connectivity stack representing the image stack in which each pixel will carry the information of connection and direction of this connection. Since we do not want to use the intensity of the fluorescence measured as a factor for the identification of the connection, nor make hypotheses on the shape/volume that the biofilm can take, we only consider whether a positive pixel (above the background noise) is connected to one above itself or not. The background value is subtracted and binary images for each z are created. A simple filtering is realized to eliminate isolated positive pixels.

Each plane of the connectivity stack C_z is computed from a mask (M_z) realized on the corrected dataset (see section 3.1.1) with the following equation:

$$C_z = [(M_z + M_{z+1}) - 1] * 2 + (M_z - M_{z+1})$$

The first term gives the value 2 for any pixels connected with one above itself. The second term will give the value 1 or -1 to any pixel not connected with one above or below itself. The sign is informative of which direction this connection is done: +1 toward an upper slice of the biofilm that contain no information, -1 toward a lower slice that contain no information (cavity). The pixels with no connections have the value 0.

We compute a two dimensional map, C. As the pixels with the value -1 carry some important information that we want to keep, we take the square of the second term.

$$C = \sum_{z=1}^n [(M_z + M_{z+1}) - 1] * 2 + (M_z - M_{z+1})^2$$

The projection of the 3D connectivity stack as a sum gives a direct information that is used to segment the biofilm without *a priori* on the different intensities given by each plane (Figure 1, right panel).

3.1.4 From global to local thresholding

From this 2D connectivity map, two different segmentation strategies are possible. A choice is given to the user: a global or a local thresholding can be used. Here, using the connectivity map, we obtain a better segmentation than a simple projection of the raw data since the above background pixels are weighted considering their connection.

Depending of the biofilm complexity, a single global value of thresholding cannot be found as it rarely gives a satisfying segmentation of all the different structures. More importantly, this connectivity factor rarely works to segment all the microcolonies with the same accuracy and several segmentations are needed to satisfy the inputs given by the user (Figure 1). A retro control loop allows the user to alter the global threshold on the connectivity map to carry out an improved segmentation. After each new input, the good candidates are kept for further consideration by the user. Without any insight by the user, several solutions may be found, as a single best solution rarely exists.

It is not possible to obtain a convergence factor in this analysis as it is under the definition of what is a well-defined microcolony. In addition, as nearby microcolonies grow, they will eventually merge together. Giving the example of two microcolonies, an orthogonal slice in such a structure will show two peaks more or less near each other. The microbiologist user may want to decipher the two different structures and analyze them independently.

From the previous considerations, we developed an alternative approach, as it could be easier in terms of calculations to use a local thresholding that may lift certain constraints. We chose the derivatives of Sobel filters as they are selective to edges and borders and are not isotropic. We convolve the connectivity map by two 3X3 Scharr operators (horizontal and vertical) to have a sensitivity in both directions of the image as they minimize the angular error in the Fourier domain (Jähne et al., 1999; Scharr, 2000).

We are using:

$$\begin{bmatrix} -10 & -3 & -10 \\ 0 & 0 & 0 \\ 10 & 3 & 10 \end{bmatrix} \text{ and } \begin{bmatrix} -10 & 0 & 10 \\ -3 & 0 & 3 \\ -10 & 0 & 10 \end{bmatrix}$$

to extract the edges in an improved manner. Each convolved image is multiplied by itself. We compute the sum and weight again by the connectivity map to give an improved contour of the

microcolonies. Binarization and filling holes operations give a satisfying segmentation without any prior knowledge of what a microcolony is.

Given the microcolonies, a first extraction of data is obtained by removing the signal of single isolated bacteria within the selected volume. The perimeter and the volume of each microcolony are then assessed. Another mask is then conceived to remove the non-fluorescent parts included in the segmented microcolony, giving access to the overall biomass and its percentage of bacteria and extracellular matrix or voids.

From our experience, global thresholding in BIAM is suitable for segmenting the whole biofilm whereas local thresholding is more suitable for segmenting the biofilm into microcolonies. The users can make their choice depending on the sample and the experiment.

3.1.5 Output measurements

From the segmented biofilm or microcolonies, two kinds of information are given by BIAM: architectural and *in situ* fluorescence. The structural parameters can be retrieved by BIAM or by other software packages like COMSTAT. However as far as we know, BIAM is the only tool able to retrieve both the *in situ* fluorescence intensity and biofilm structural parameters in a semi-automated way. Figure 2 shows a panel of what one can obtain from a BIAM analysis.

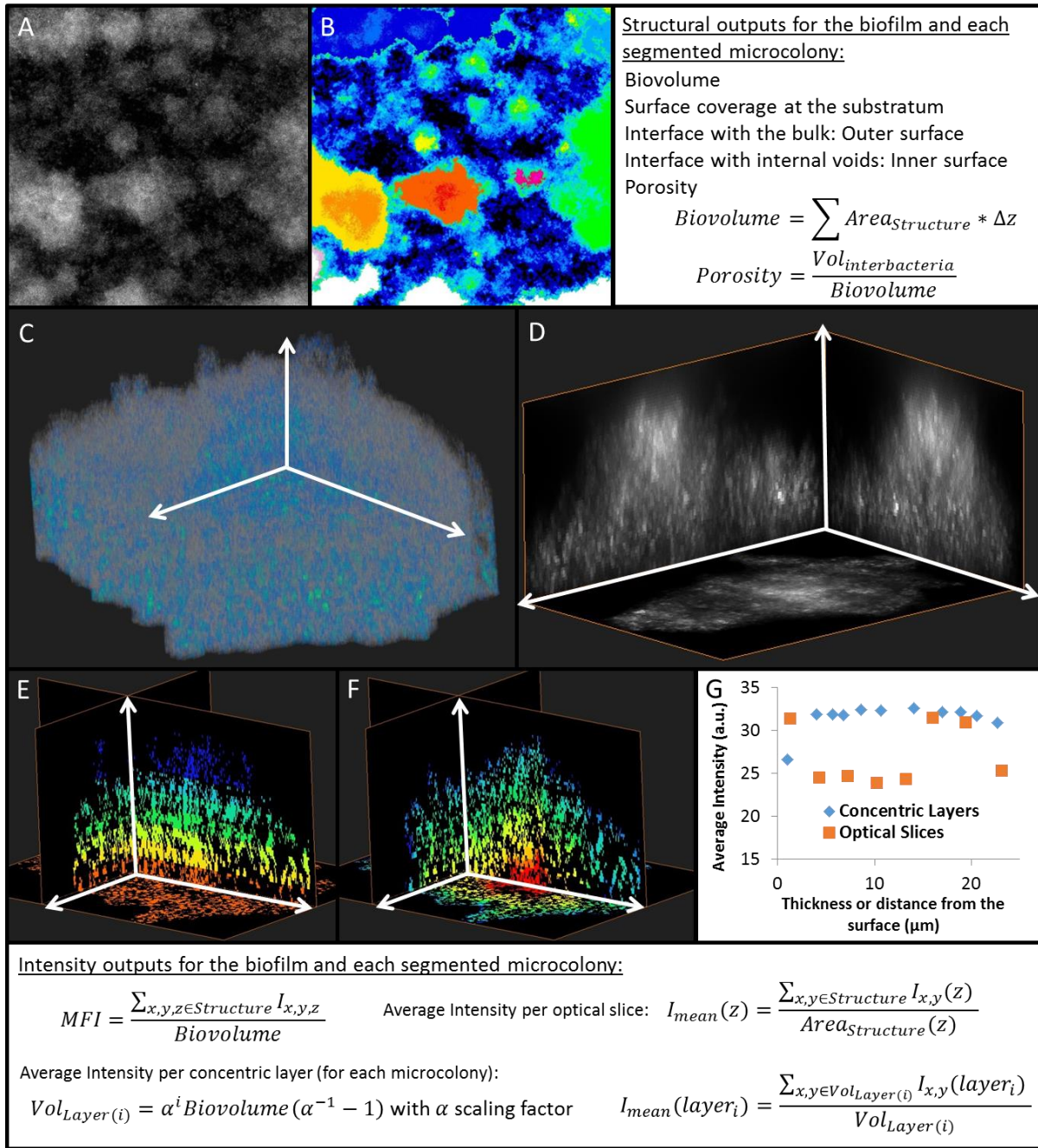


Figure 2. Output imaging and measurements. (A) The sum projection of a dataset. (B) The result of segmentation by BIAM using the global thresholding method (colonies are color-coded). (C) A 3D representation of “the orange microcolony” segmented in B with subsequent segmentation of the bacterial part (blue) and the non-bacterial part (grey). (D) A representation of the three orthogonal projections of the maximum of intensity weighted by the depth of the pixel. (E) An extraction of the intensity by optical slices (in this specific representation, one color stands for 5 optical slices). (F) Results of a complementary approach by computing concentric layers (concentric layers are color-coded). Here the scaling factor alpha has been chosen to obtain a thickness of around 2 μm per concentric layer. Alpha is calculated depending on the maximum height of the biofilm and the desired number of layers. (G) Two curves extracted from “the orange microcolony” in panel B using E (optical slices) or F (concentric layers approach). Images A and B come from BIAM in ImageJ and images C-F are obtained using AVIZO imaging software for further visualization of the results obtained by BIAM. Output measurements are shown in the white inserts/sidebars. MFI stands for Mean Fluorescence Intensity.

For the segmented biomass of each slice we then obtain the total intensity, the average intensity, the area, and two types of perimeters: (i) the outer border delimiting the biomass from the bulk and (ii) the inner border considering the relative porosity of the biofilm (see equation in Figure 2).

From these parameters we can thus evaluate: the biofilm volume (biovolume); the outer surface, which is the interface area between the biofilm and the bulk; the inner surface, which is the interface area within the biofilm (interface between cells and internal voids, which are voids + extracellular matrix in the case of this work); the porosity and the mean fluorescence intensity (MFI) of the actual biofilm or segmented microcolonies.

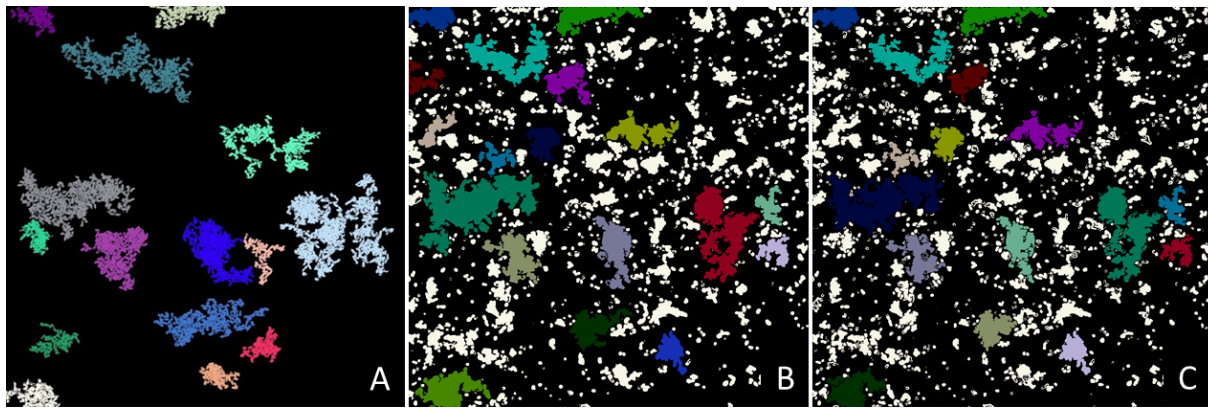
The biovolume (μm^3) corresponds to the sum of the areas occupied by the segmented biomass in each plane times to the confocal z-step. The inner and outer interfaces (μm^2) are computed using one or the other defined perimeters multiplied by the confocal z-step. With these two surfaces, the relative porosity of the segmented biofilm or microcolony is calculated (see Figure 2). The MFI corresponds to the sum of the total intensity of the segmented biomass in each plane divided by the biovolume and is in arbitrary units.

In this work, besides characterizing the biofilm architecture in detail, we also aim at understanding the relationship between biofilm structure and bacterial activity within the community. This can be done by comparing the intensity of the GFPmut2 fluorescent protein of cells within biofilms under different conditions and can be obtained by comparing the MFI of these biofilms. However, one can be interested in looking at the bacterial activity at a finer resolution, as a function of the biofilm layer. Two types of biofilm layers can be therefore considered: (i) layers which are parallel to the substratum i.e. parallel to the confocal plane (representing biofilm depth) and called “optical slices” and (ii) layers which are following the biofilm architecture/shape and called “concentric layers”. Therefore, two types of three dimensional masks are generated and the bacterial activity is thereafter evaluated by comparing the average intensity of the biofilm layers. The first one is the simple superposition of masks in the horizontal plane from which we can easily trace the *in situ* average intensity of the biofilm layer as a function of depth (Figure 2E). The second one is the superposition of three dimensional concentric masks from which we can trace the average intensity of the layer as a function of the distance from the surface of the biofilm (Figure 2F). Both of these masks can be considered in our tool.

In the present case of study, when presenting results regarding the biofilm layers, we considered the first option and show the *in situ* average fluorescence intensity (I mean) of the optical slice i.e. as a function of biofilm thickness.

3.2 Validation of BIAM

Considering some structural descriptors retrieved by COMSTAT, we were able to compare the two software packages. As COMSTAT is a reference tool to determine structural biofilm parameters, we wanted to insure that the segmentation proposed by our approach is similar to the one obtained by COMSTAT (Figure 3).



	Number of colony	Total Segmented Area (μm^2)	Deviation from COMSTAT common segmented microcolony area	Biovolume (μm^3)	Deviation from COMSTAT common segmented microcolony volume
COMSTAT	15	4539	1	22870	1
Global Thresholding	16	4787	$1,01 \pm 0,18$	21510	$1,05 \pm 0,32$
Local Thresholding	18	4842	$0,98 \pm 0,08$	22400	$1,02 \pm 0,15$

Figure 3. Comparison of segmentation strategies between BIAM and COMSTAT for a given biofilm. The segmentations have been obtained from the connectivity stack. (A) Image segmented by COMSTAT. (B) Image segmented with local thresholding in BIAM. (C) Image segmented with global thresholding in BIAM. For each method, the same filter (minimum microcolony area) has been used ($100 \mu\text{m}^2$). No other parameters were needed to achieve these segmentations. The table shows the comparison between the methods for these images. Considering the microcolonies equally segmented by COMSTAT and by BIAM, we measure the ratio of two measurements, the area at the substratum (which is the area of the first layer of the biofilm) and the biovolume. The average of these ratios is the deviation from COMSTAT that we established as our comparative point.

Figure 3 shows that the results obtained with BIAM and COMSTAT are similar. Indeed, on one hand, the microcolony segmentation carried out by both tools is very similar, with microcolonies of similar shapes being at similar locations in the biofilm. On the other hand, the biofilm characteristics commonly specified for defining biofilms (area at the substratum and biovolume) given by our approach are of the same order of magnitude of those given by COMSTAT. Of course, these results cannot be exactly the same, as the segmentation strategies used are not the same in both tools. Besides, when looking at a finer level considering each similar microcolonies (either with global or local thresholding applied), we also see that the deviation from COMSTAT is quite low (less than 5 %). These findings are reassuring for further applications of our script to analyze biofilm images obtained by CLSM.

3.3 A case study: *E. coli* biofilm dispersion by CDA

Dispersion challenges with CDA were carried out on 3-days old biofilms, developed in flow cells, of the *E. coli rrnBPI-gfpmut2* strain. The CLSM image datasets were analyzed with BIAM in terms of biofilms structure and fluorescence intensities. The MFI of the biofilms comes from the GFPmut2 fluorescent protein.

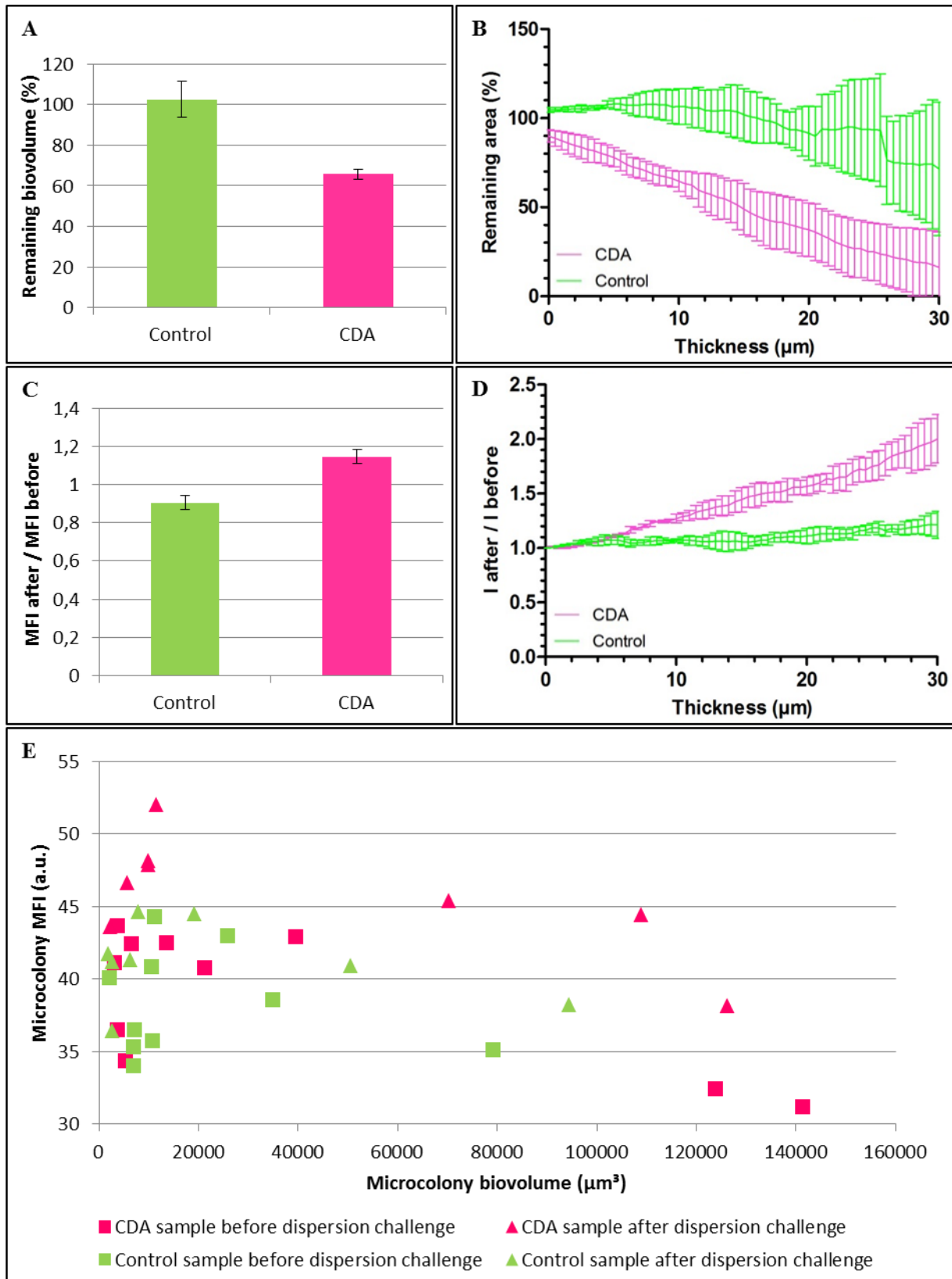


Figure 4. Effects of CDA on 3-days old *E. coli rrnBP1-gfpmut2* biofilms developed in flow cell chambers. (A) Percentage of remaining biofilm volume after a dispersion challenge with CDA. (B) Percentage of remaining biofilm's area as a function of biofilm thickness after the dispersion challenge. Zero thickness corresponds to the substratum. (C) Ratio of the biofilm MFI after and before the dispersion challenge with CDA. (D) Ratio of the average intensity for each layer (optical slice) after and before the dispersion challenge as a function of biofilm thickness. (E) MFI of the segmented microcolonies of a biofilm as a function of microcolony biovolume for the

CDA and the control conditions. Each symbol represents one microcolony. The intensities were corrected as explained in the text (section 3.1.1). The same factor was used to correct the data of all the datasets. Means and associated error bars are obtained from two different biofilm positions of one dispersion challenge assay.

The data show that CDA has an impact on *E. coli* biofilms (strain *rrnBP1-gfpmut2*) in both its structure and fluorescence properties (Figure 4). First, biofilm removal is observed: a decrease in biofilm volume by more than 35 % compared to the control (Figure 4A) as well as a reduction in biofilm area as a function of thickness are clearly shown (Figure 4B).

In addition, an increase in the biofilm MFI by more than 26 % compared to the control (Figure 4C) as well as in the average intensity as a function of the thickness (Figure 4D) is observed. Nevertheless, on the first few layers of the biofilm, close to the substratum, no difference is observed between the CDA and the control, differences appear only from around 6 μm of thickness upwards. Finally, the analysis at the level of the microcolonies also supports an increase in MFI after dispersion challenge, independently of the colony size (Figure 4E).

4. Discussion

The use of CLSM together with image analysis processing for biofilm characterization has been intensively used for the last decades. Although several open source software packages can be used to determine multiple structural biofilm characteristics, to our knowledge none is able to assess the *in situ* fluorescence intensity of a specific marker like GFP in a biofilm as a function of its architecture parameters. Our work presents an innovative tool that allows determining both structural properties and *in situ* fluorescence intensities in the biofilm.

4.1 Fluorescence intensity correction

Quantifying *in situ* fluorescence intensity in a biofilm using CLSM is not an easy task. This is mainly due to optical phenomena such as light-scattering effects that strongly affect the fluorescence signal and thus quantification. Several strategies have been developed to address the correction of fluorescence intensity within a thick sample (Irinopoulou et al., 1997; Kervrann et al., 2004; Liljeborg et al., 1995; Roerdink and Bakker, 1993; Visser et al., 1991). They all include a major bias, the intensity is modified in a way that prevents any further investigation except for determining structural parameters.

Here we propose a method for determining such a correction by measuring the *in situ* fluorescence intensity along the z-axis (biofilm depth, optical sectioning) after staining the biofilms with different nucleic acid dyes. Attention however should be given to the choice of the marker, as its spectral characteristics highly affect the intensity profile along biofilm depth, as demonstrated in this work. From our results, the correction factor seems to be improved when the marker presents excitation and emission wavelengths similar to the ones of the fluorophore of interest, as expected.

When aiming at quantifying and comparing data of *in situ* fluorescence intensity along biofilm depth, the application of a correction factor to the measured data is of paramount importance. Our method offers an easy way to extract a fluorescence intensity correction by labeling the biofilm. Trends of the raw and corrected GFP average intensity (Figure 1) are significantly different, demonstrating that a misleading interpretation of the data can result from the absence of data correction. In this context, our software includes a correction step of the user's measurements allowing the user to correct data properly before further treatments.

Other methods using external markers exist: fluorescent beads monitored at different depths (Diaspro et al., 2002) or even fluorescent beads inside a biofilm (Sekar et al., 2002). These methods may show unsatisfying results as they may present sampling issues like sample size or fluorescence inhomogeneity. In addition, it is not possible to obtain an appropriate correction without taking into account the complexity of the biofilm architecture.

A correction performed with the intensity of a GFP whose expression is under control of a constitutively expressed promoter inserted in the bacterial chromosome could give an improved correction than the one measured by an external nucleic acid dye. However, one should verify that the GFP is homogeneously produced along the biofilm. For example, for biofilms thicker than the ones studied here, oxygen availability might limit the maturation of this family of fluorescent proteins.

4.2 Connectivity map and segmentation strategies

To our knowledge, there are so far no perfect strategies to segment a biofilm into its subcomponents such as cells and the extracellular matrix. We know how to describe a bacterium as being part of the biofilm or not, thanks to a strong biological knowledge. This could be achieved by manual sorting, but it is labor intensive. In addition, using only a threshold on intensity to carry out a segmentation will give a result that has no consideration relative to the structure of the biofilm itself.

To help the segmentation, we therefore compute a connectivity map that renders a certain degree of connection along the focal axis. Indeed, on this map thresholding is performed (global or local) to segment the biofilm and/or its microcolonies. A global threshold on a projection of the dataset may sometimes fail to separate different microcolonies as they may be relative to a certain order, complexity or size. An approach considering local thresholding can therefore be applied to the map. It is important that this connectivity map is made without any measurement of the fluorescence intensity. We thus insure that the segmentation is purely structural.

Despite the different segmentation strategies applied by COMSTAT and BIAM (global and local thresholding), similar results were obtained by our approach (Figure 3). Differences occur on some edges and some parts of the biofilm that are seen as connected by COMSTAT and not by BIAM, or the other way around. It is difficult to assess which strategy is the best, as a deeper look on the data (Figure 3 A, B and C) shows that COMSTAT segments out microcolonies that BIAM, with either local or global thresholding, is not able to detect. The reverse is also true. Nevertheless, overall, the analysis of the biofilm parameters is satisfying with both solutions, since regardless the strategy used to segment the biofilm (COMSTAT or BIAM global/local), similar results are observed.

The second strategy in BIAM (local thresholding) looks at the gradient between two pixels and reinforces the differences between microcolony edges. A better segmentation is therefore given on biofilms that are more complex. For instance, two original microcolonies may have merged and, despite their obvious separate origins, they will be counted as one single microcolony with global thresholding, where the biologist expects measuring information relative to the two different ones. The approach of local thresholding considering gradient images gives therefore stronger differences between such structures that become more easily differentiable.

4.3 *E. coli* biofilm dispersion by CDA

Biofilm dispersal of different species – including a strain of *E. coli* – by CDA has been previously demonstrated (Davies and Marques, 2009). Indeed, the effects of the molecule on biofilms have been observed either qualitatively on microscopic images or quantitatively by determining the proportion of

released cells as well as the biomass, the average thickness and the surface area coverage of the biofilms (Davies and Marques, 2009; Hibbing and Fuqua, 2012; Sepehr et al., 2014).

The results presented here confirm the dispersal effect of CDA on the biofilm biomass as observed on the biofilm volume (Figure 4A). However, no previous work had shown the impact of CDA as a function of biofilm depth. Here, we demonstrate that CDA decreases the area occupied by the biomass along the biofilm thickness, with the upper layers being more affected by CDA than the lower ones. For the control, the biofilm's area is relatively stable in the deepest layers of the biofilm and the decrease appears to occur only in the uppermost layers, probably due to the increased flow rate and turbulence during the injection. In contrast, after addition of CDA, the biofilm is partially dispersed even at the substratum, suggesting that CDA diffuses into the biofilm up to its lowest layers (Figure 4B). These results are interesting with regard to CDA diffusion inside the biofilm and its architecture within the timescale of the experiment (incubation time of 1 h).

CDA is a fatty acid that can destabilize biofilms by two different pathways: chemical and biological. Due to its surfactant properties, it could have a chemical action interfering with the interactions between cells and between cells and the substratum and with the extracellular matrix scaffold. These changes can result, in the longer term, in an induction of bacterial metabolism. However, CDA could also disperse biofilms by more directly triggering a genetic adaptation from the bacteria, inducing the beginning of the dispersion stage of the biofilm life cycle. This is supported by the recent transcriptomic work on the bacterial species *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) showing that clusters of genes are upregulated and others are downregulated after a dispersion challenge with CDA (Rahmani-Badi et al., 2015). Marques and al. (2014) have also shown that CDA awakes the persister cells of the bacterial species *P. aeruginosa* and *E. coli* from a dormant to a metabolically active state (Marques et al., 2014).

Here we found that the MFI of *E. coli rrnBP1-gfpmut2* biofilms is higher after dispersion with CDA than before (Figure 4C). This result is also verified when looking at the microcolony level where the increase in MFI is observed independently of microcolony size (Figure 4E). Moreover, regardless of the condition, smaller microcolonies in general seem to be more fluorescent than larger ones. This could be explained by the fact that the cells within the former have a better access to nutrients than the ones within the latter. In addition, an increase of the average fluorescence intensity of the biofilm treated with CDA is observed at each layer of the biofilm thickness after the first few layers. This increase is more important in the highest layers of the biofilm (Figure 4D), in agreement with the idea that these layers have an increased availability to nutrients that can support the increased metabolic activity caused by the CDA.

These findings suggest that CDA could trigger an awakening of cells that become more metabolically active and as a result activate the *rrnBP1* ribosomal RNA promoter. In order to better distinguish between the direct or indirect effects of CDA, time-resolved measurements of the evolution of both structure and fluorescence intensity will be necessary.

5. Conclusions

We have developed BIAM, a chain of tools that allows the quantification of biofilm fluorescence intensities as well as the determination of biofilm structural features. This is a powerful aspect of image analysis when investigating fundamental mechanisms in biofilms physiology. The fact that our script has been developed in ImageJ makes it attractive and easy to access and to use for the scientific community. BIAM is quite flexible and permits the user to monitor the different steps of the analysis at any moment, having a control on what he/she is currently analyzing. The user can control for

instance the following parameters: the initial threshold to remove background noise; the binning of the images; the correction of fluorescence intensity to be applied; the segmentation strategy (global or local); the minimal area of a microcolony at the substratum in case of microcolony segmentation or the minimal size of the studied object (the minimal area of a bacterium for example).

The applications of such a tool are many and could be as diverse as studying the evolution over time of the expression of genes inside biofilms or the intensity of a specific probe as a function of its position within the biofilms. One can be interested by the intensity of a fluorescent object inside the biofilm at a global scale – considering the whole biofilm as a unit – or at a finer scale – segmenting the biofilm into microcolonies – and investigating the fluorescence of that object as a function of the size of the microcolonies or of its position inside a microcolony (central versus peripheral for example). This could be of utmost interest when looking at the effects of a drug on biofilms and the relation existing between its position inside the biofilm, the architecture of the biofilm and the expression of target genes *in situ*. Finally, the applications of this tool could be easily extended to other three-dimensional samples, such as the formation of intracellular bacterial colonies during the infection of eukaryotic cells.

Authors' contribution

All authors conceived and designed the study. MB performed the experimental work. BC fully wrote the BIAM script. MB and BC did the data analysis and prepared the manuscript. BS, DP and FL contributed to the final manuscript.

Acknowledgments

We thank Elisa Brambilla for supplying the bacterial strain and Gilles Clavier for providing the CDA. We thank Jeff Audibert for his precious experimental help. We thank Rachel Méallet-Renault and Gilles Clavier for their interesting advices and remarks on the overall project. We thank Neubias (Network of EUropean BIomage AnalystS) for the interesting discussions. The work was financially supported by the NanoGenoBiofilm project from the D'Alembert Institute (IDA) of Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay and a doctoral grant from CentraleSupélec (Doctoral School INTERFACES of Université Paris-Saclay).

Ecole Normale Supérieure Paris-Saclay, 61 Avenue du Président Wilson, 94230 Cachan, France
CentraleSupélec, Grande Voie des Vignes, 92290 Châtenay-Malabry, France

Supplementary data

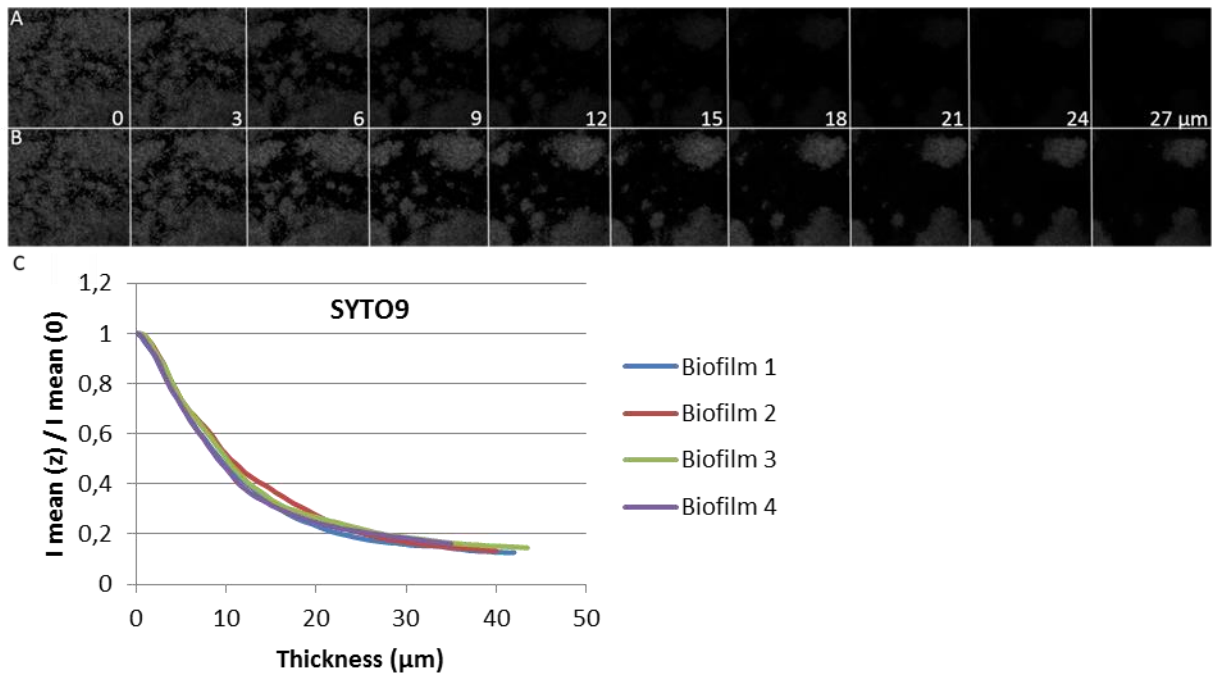


Figure S1. Importance of fluorescence intensity correction. Biofilm CLSM slices of the *E. coli rrnBP1-gfpmut2* strain at different thicknesses without (A) and with (B) fluorescence intensity correction (obtained from SYTO9). (C) Average intensity of SYTO9 normalized as a function of thickness for four different regions of a biofilm stained with SYTO9 (referred as biofilm 1, 2, 3 and 4).

References

- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008. doi:10.1038/msb4100050
- Beyenal, H., Lewandowski, Z., Harkin, G., 2004. Quantifying Biofilm Structure: Facts and Fiction. *Biofouling* 20, 1–23. doi:10.1080/0892701042000191628
- Christensen, B.B., Haagensen, J.A.J., Heydorn, A., Molin, S., 2002. Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2495–2502.
- Christensen, B.B., Sternberg, C., Andersen, J.B., Eberl, L., Moller, S., Givskov, M., Molin, S., 1998. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2247–2255.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Daims, H., Lückner, S., Wagner, M., 2006. *daime*, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environ. Microbiol.* 8, 200–213. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00880.x
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6640–6645.
- Davies, D.G., Marques, C.N.H., 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 191, 1393–1403. doi:10.1128/JB.01214-08

- Diaspro, A., Federici, F., Robello, M., 2002. Influence of refractive-index mismatch in high-resolution three-dimensional confocal microscopy. *Appl. Opt.* 41, 685–690.
- Franks, A.E., Glaven, R.H., Lovley, D.R., 2012. Real-time spatial gene expression analysis within current-producing biofilms. *ChemSusChem* 5, 1092–1098. doi:10.1002/cssc.201100714
- Hall-Stoodley, L., Hu, F.Z., Gieseke, A., Nistico, L., Nguyen, D., Hayes, J., Forbes, M., Greenberg, D.P., Dice, B., Burrows, A., Wackym, P.A., Stoodley, P., Post, J.C., Ehrlich, G.D., Kerschner, J.E., 2006. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 296, 202–211. doi:10.1001/jama.296.2.202
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S., 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiol. Read. Engl.* 146 (Pt 10), 2395–2407.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., 2012. Inhibition and dispersal of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms by a small diffusible *Pseudomonas aeruginosa* exoproduct(s). *Arch. Microbiol.* 194, 391–403. doi:10.1007/s00203-011-0767-9
- Irinopoulou, T., Vassy, J., Beil, M., Nicolopoulou, P., Encaoua, D., Rigaut, J.P., 1997. Three-dimensional DNA image cytometry by confocal scanning laser microscopy in thick tissue blocks of prostatic lesions. *Cytometry* 27, 99–105.
- Jähne, B., Haussecker, H., Geissler, P. (Eds.), 1999. Handbook of computer vision and applications. Academic Press, San Diego.
- Kervrann, C., Legland, D., Pardini, L., 2004. Robust incremental compensation of the light attenuation with depth in 3D fluorescence microscopy. *J. Microsc.* 214, 297–314.
- Liljeborg, A., Czader, M., Porwit, A., 1995. A method to compensate for light attenuation with depth in three-dimensional DNA image cytometry using a confocal scanning laser microscope. *J. Microsc.* 177, 108–114. doi:10.1111/j.1365-2818.1995.tb03540.x
- Marques, C.N.H., Morozov, A., Planzos, P., Zelaya, H.M., 2014. The fatty acid signaling molecule *cis*-2-decenoic acid increases metabolic activity and reverts persister cells to an antimicrobial-susceptible state. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 6976–6991. doi:10.1128/AEM.01576-14
- Møller, S., Sternberg, C., Andersen, J.B., Christensen, B.B., Ramos, J.L., Givskov, M., Molin, S., 1998. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 721–732.
- Mueller, L.N., de Brouwer, J.F.C., Almeida, J.S., Stal, L.J., Xavier, J.B., 2006. Analysis of a marine phototrophic biofilm by confocal laser scanning microscopy using the new image quantification software PHLIP. *BMC Ecol.* 6, 1. doi:10.1186/1472-6785-6-1
- Percival, S.L., McCarty, S.M., Lipsky, B., 2015. Biofilms and Wounds: An Overview of the Evidence. *Adv. Wound Care* 4, 373–381. doi:10.1089/wound.2014.0557
- Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Fallahi, H., Heidari-Keshel, S., 2015. Dissection of the *cis*-2-decenoic acid signaling network in *Pseudomonas aeruginosa* using microarray technique. *Front. Microbiol.* 6, 383. doi:10.3389/fmicb.2015.00383
- Roerdink, J.B.T.M., Bakker, M., 1993. An FFT-based method for attenuation correction in fluorescence confocal microscopy. *J. Microsc.* 169, 3–14. doi:10.1111/j.1365-2818.1993.tb03273.x
- Scharr, H., 2000. Optimale Operatoren in der Digitalen Bildverarbeitung [WWW Document]. URL <http://archiv.ub.uni-heidelberg.de/volltextserver/962/> (accessed 12.15.16).
- Sekar, R., Griebe, T., Flemming, H.-C., 2002. Influence of Image Acquisition Parameters on Quantitative Measurements of Biofilms using Confocal Laser Scanning Microscopy. *Biofouling* 18, 47–56. doi:10.1080/08927010290017725
- Sepehr, S., Rahmani-Badi, A., Babaie-Naeij, H., Soudi, M.R., 2014. Unsaturated Fatty Acid, *cis*-2-decenoic Acid, in Combination with Disinfectants or Antibiotics Removes Pre-Established

- Biofilms Formed by Food-Related Bacteria. PloS One 9, e101677. doi:10.1371/journal.pone.0101677
- Serra, D.O., Richter, A.M., Klauck, G., Mika, F., Hengge, R., 2013. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. mBio 4, e00103-00113. doi:10.1128/mBio.00103-13
- Shi, X., Zhu, X., 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends Food Sci. Technol. 20, 407–413. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.054
- Sternberg, C., Christensen, B.B., Johansen, T., Nielsen, A.T., Andersen, J.B., Givskov, M., Molin, S., 1999. Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4108–4117.
- Teal, T.K., Lies, D.P., Wold, B.J., Newman, D.K., 2006. Spatiometabolic Stratification of *Shewanella oneidensis* Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 72, 7324–7330. doi:10.1128/AEM.01163-06
- Tolker-Nielsen, T., Sternberg, C., 2014. Methods for studying biofilm formation: flow cells and confocal laser scanning microscopy. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 1149, 615–629. doi:10.1007/978-1-4939-0473-0_47
- Tolker-Nielsen, T., Sternberg, C., 2011. Growing and analyzing biofilms in flow chambers. Curr. Protoc. Microbiol. Chapter 1, Unit 1B.2. doi:10.1002/9780471729259.mc01b02s21
- Visser, T.D., Groen, F.C.A., Brakenhoff, G.J., 1991. Absorption and scattering correction in fluorescence confocal microscopy. J. Microsc. 163, 189–200. doi:10.1111/j.1365-2818.1991.tb03171.x
- Vorregaard, M., 2008. Comstat2-a modern 3D image analysis environment for biofilms. Technical University of Denmark, DTU, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark.
- Yang, X., Beyenal, H., Harkin, G., Lewandowski, Z., 2000. Quantifying biofilm structure using image analysis. J. Microbiol. Methods 39, 109–119.

5.3 Discussion et perspectives du chapitre 5

L'étude menée concernant les effets du CDA sur les bactéries en mode de vie planctonique a démontré la non-cytotoxicité du CDA. En effet, la molécule n'induit ni arrêt, ni ralentissement et n'empêche pas non plus la croissance planctonique des souches. Cependant, l'étude a révélé une prolongation de la phase exponentielle de croissance des souches en présence de CDA. Une hypothèse est que le CDA pourrait constituer une source de carbone supplémentaire : les bactéries métaboliseraient alors cet acide gras, une fois le glucose du milieu épuisé. De précédents travaux n'ont cependant pas observé le même effet du CDA sur la croissance planctonique d'*E. coli* à des concentrations de 100, 300 et 1000 nM (Marques et al, 2014), mais il faut noter que nous utilisons ici une concentration 100 à 1000 fois supérieure (110 μ M). Afin de confirmer l'effet de cette concentration sur la croissance, des essais additionnels doivent être réalisés : des concentrations de CDA de l'ordre de 0,1 à 1000 μ M pourraient par exemple être testées. Une autre expérience possible serait de répéter les essais en microplaque en remplaçant le CDA par un autre acide gras tel que le DSF (diffusible signal factor, acide *cis*-11-méthyl-2-dodécénoïque) à la même concentration molaire et observer le comportement des bactéries face à cette nouvelle molécule.

En revanche, même si le CDA semble légèrement retarder l'entrée en phase stationnaire, la vitesse spécifique de croissance n'est pas augmentée par la molécule. En effet, les profils de vitesse avec et sans CDA se superposent bien, indiquant également que les bactéries consomment de préférence le glucose.

L'étude de l'effet du CDA sur les bactéries en mode de vie planctonique a également montré que la molécule n'a pas d'impact significatif sur l'expression des rapporteurs. En effet, les légères diminutions d'activité des promoteurs et du contenu cellulaire de GFP observées en fin de phase exponentielle de croissance sont corrélées à la phase de prolongation de croissance décrite plus haut.

La présence de CDA lors de la croissance bactérienne résulte donc en un changement de métabolisme en fin de phase exponentielle, ce qui permet aux cellules de continuer à croître sans pour autant que cette croissance induise l'expression des rapporteurs qui était peut-être favorisée en croissance avec le glucose.

Ainsi, d'une part, le CDA n'a pas d'impact sur la vitesse spécifique de croissance des souches en culture planctonique : il ne s'agit en effet ni d'une molécule cytotoxique qui empêche ou ralentit la croissance planctonique ni d'une molécule qui l'accélère. D'autre part, le CDA n'induit pas d'augmentation de l'activité des promoteurs ni de la concentration en GFP cellulaire des rapporteurs étudiés. Les résultats de l'effet du CDA observés lors des essais sur biofilms ne sont donc pas des conséquences de l'effet du CDA sur les bactéries planctoniques, mais sont bien spécifiques aux biofilms.

Par ailleurs, les essais réalisés en microplaque sur les bactéries planctoniques ont été effectués à 37°C. Les épreuves de dispersion en microfluidique sur les biofilms ont quant à elles été menées à température ambiante (entre 22 et 25°C). Il serait donc intéressant de réaliser des essais additionnels pour évaluer l'effet du CDA sur les bactéries planctoniques à 25°C, de façon à être plus proche de la température des essais en microfluidique et à vérifier l'absence d'effet aussi à cette température.

L'étude menée concernant les effets du CDA sur les bactéries en mode de vie communautaire a démontré un impact dispersant de la molécule. Un effet de dispersion en profondeur du biofilm a également été mis en évidence, ce qui est un résultat original.

La forte hétérogénéité des biofilms, et donc des régions de ceux-ci à analyser afin de quantifier l'effet dispersant, nous a amené à concevoir et développer un masque adapté aux cellules de flux pour un repositionnement des échantillons par la stratégie de recouvrement des ROI. Une augmentation notable de l'effet dispersant observé sur la biomasse fixée a été mise en évidence, montrant que la technique sans repositionnement sous-estimait la dispersion.

Dans un but de caractériser la formation et le développement des biofilms au sein du bioréacteur qu'est la cellule de flux ibidi[®], il serait intéressant d'étudier l'hétérogénéité structurale des biofilms le long du canal fluide. On pourrait mesurer la biomasse à différents endroits grâce à un nouveau masque comportant plus de positions et ainsi relier l'hétérogénéité locale avec les caractéristiques structurales du biofilm.

Des essais additionnels en utilisant la méthodologie de repositionnement des chambres pourraient aussi être réalisés dans le but de quantifier l'impact des processus d'injection et de lavage lors des épreuves de dispersion.

Afin d'évaluer l'impact de la molécule CDA sur l'expression du promoteur *PI* au sein des biofilms, un outil novateur a été développé et validé (article). Celui-ci permet à la fois de déterminer des paramètres structuraux des biofilms étudiés ainsi que de quantifier *in situ* l'intensité de fluorescence d'un rapporteur ou fluorophore cible.

Dans ce contexte, une augmentation de l'intensité de fluorescence semble avoir lieu à la suite de l'injection de la molécule CDA par rapport à celle du contrôle. Ceci pourrait indiquer que le promoteur *PI* est plus actif en présence de CDA qu'en son absence et donc que les bactéries retrouvent une activité métabolique plus importante suite à l'application du dispersant. *A fortiori*, ceci suggérerait une réponse génétique et une adaptation bactérienne des cellules du biofilm face au CDA.

Ces observations vont dans le sens des recherches scientifiques actuelles autour du CDA, où les bactéries issues de biofilms ayant subi le CDA modifient leur pool d'expression génique et démontrent une augmentation de l'expression des gènes du cluster métabolique (Rahmani-Badi et al, 2015) et où le CDA réveille l'état métabolique des cellules persistantes des biofilms d'*E. coli* (Marques et al, 2014). Cependant, les effets observés ici ne sont peut-être pas directs. En effet, le CDA est une molécule tensioactive, pouvant déstabiliser les interactions moléculaires au sein du biofilm. Ainsi, il est possible que les effets observés sur les structures des biofilms soient uniquement liés à l'effet surfactant de la molécule qui interfère avec les interactions des cellules entre elles, des cellules avec la matrice extracellulaire ou des cellules avec le support, rendant l'architecture du biofilm plus fragile et libérant ainsi une partie de la biomasse bactérienne. La structure étant déstabilisée et réorganisée, l'accessibilité des bactéries anciennement enfouies dans le biofilm au milieu environnant et donc aux nutriments peut être augmentée. Dans ce cas, les bactéries pourraient sentir ce changement d'environnement et induire une reprise d'activité métabolique en déclenchant l'expression génique de certains opérons, dont *rrnB*. Néanmoins, les expériences de marquage des biofilms (chapitre 3) et de dispersion avec le CDA montrent que de petites molécules arrivent à diffuser dans tout le biofilm et ce jusqu'au substrat ; les nutriments seraient donc capables eux aussi de pénétrer efficacement dans le biofilm.

Par ailleurs, il serait intéressant de faire des acquisitions d'images CLSM pendant la période d'incubation de 1 h de la molécule et d'observer ainsi l'évolution de l'intensité de fluorescence associée au promoteur *PI* au cours du temps. Cette résolution temporelle permettrait d'avoir accès à la dynamique d'intensité du rapporteur suite à l'application du dispersant.

Ceci est un avantage majeur de notre approche *in situ*, qui permet de mesurer les variations d'intensité de fluorescence des rapporteurs au sein du biofilm en même temps que les variations de l'architecture du biofilm lors de la dispersion. D'autre part, un contrôle négatif interne d'expression génique serait le bienvenu pour évaluer les différences relatives des changements d'intensité de fluorescence. Pour ceci, il est possible d'imaginer une souche génétiquement et doublement marquée : (i) le promoteur *P1* en fusion transcriptionnelle avec le gène de la *gfpmut2* et (ii) un promoteur constitutif en fusion transcriptionnelle avec un gène codant pour une protéine fluorescente émettant à une longueur d'onde différente de celle de la *GFPmut2*, par exemple dans le rouge. Le LBPA dispose d'un plasmide contenant le gène codant pour la protéine fluorescente rouge appelée Strawberry et des mises au point techniques y sont actuellement menées pour pouvoir cloner ce gène en phase avec un promoteur. Le promoteur constitutif contrôle pourrait être le promoteur *P5* qui est celui du phage T5. Le promoteur *P5* n'étant pas régulé, on s'attendrait à ce que l'intensité de fluorescence de la Strawberry ne change pas au cours du temps lors de l'épreuve de dispersion.

Aucun effet de la molécule CDA n'a pu être observé sur les rapporteurs *bdcA* et *fliC* lors de la dispersion. Comme déjà évoqué au chapitre 4 section discussion, il pourrait être préférable de remplacer la *GFPmut2* de ces constructions par une protéine fluorescente verte plus intense telle que la sfGFP (superfolder GFP). En effet, l'intensité de fluorescence – et par conséquent la concentration en GFP cellulaire – de *bdcA* et de *fliC* étant 10 fois plus petite que celle de *P1* en croissance planctonique, changer pour une protéine plus fluorescente permettrait probablement de réduire cet écart et peut-être d'observer des différences de fluorescence entre avant et après épreuve de dispersion pour ces rapporteurs. D'autre part, il faudrait répéter les expériences de dispersion avec les souches BW25113 *bdcA* et *fliC* en laissant une période d'incubation de la molécule plus longue. En effet à 22-25°C les bactéries poussent moins vite qu'à 30 ou 37°C, les adaptations physiologiques sont donc plus lentes à ces températures. Ainsi le temps d'incubation de 1 h est-il peut-être trop court pour effectivement observer l'activation de ces promoteurs, d'autant plus que le gène *fliC* est un gène de classe 3, c'est-à-dire un gène activé en fin de cascade de biosynthèse du flagelle. Concernant le rapporteur *fliC* en particulier, il pourrait également être intéressant de tester la dispersion avec d'autres souches exprimant le promoteur *fliC* de manière plus importante que la souche BW25113 en culture planctonique, telle que la souche K-12 ATTC 25404 (Wood et al, 2006). Enfin, une étude complémentaire serait de récupérer les cellules dispersées en fin d'épreuve et de mesurer leur intensité de fluorescence intrinsèque par cytométrie en flux.

Les effets du CDA sur la matrice extracellulaire des biofilms d'*E. coli* n'ont pas été évalués pendant ces travaux. Il serait intéressant d'étudier l'impact de la molécule sur les structures exopolymériques en réalisant des épreuves de dispersion avec le CDA en marquant la matrice extracellulaire avec les lectines WGA et ConA décrites au chapitre 3. Ceci permettrait notamment d'identifier la part de l'effet tensioactif de la molécule lors des épreuves de dispersion. L'efficacité de dispersion avec et sans marquage de la matrice extracellulaire constituerait également un indicateur de diffusion de la molécule au sein du biofilm et/ou d'interaction de cette dernière avec certains types de polymères.

Finalement, le CDA a un impact sur la structure des biofilms et l'intensité de fluorescence du rapporteur *P1* au sein des biofilms semble également être affectée ; par contre il n'a pas d'effet sur les cultures en suspension. Les effets observés du CDA seraient donc biofilm-dépendants. Toutefois, des travaux précédents ont démontré que les bactéries dispersées avaient un phénotype différent des bactéries planctoniques en phase exponentielle et stationnaire de croissance et des bactéries sessiles (Chua et al, 2014 ; Guilhen et al, 2016). Il serait intéressant d'évaluer l'effet du CDA sur la biomasse dispersée, en réalisant des essais en microplaque et en comparant le comportement des bactéries ayant déjà été en contact avec la molécule à celui de celles ne l'ayant encore jamais rencontrée.

5.4 Conclusion du chapitre 5

Ce dernier chapitre de résultats a permis l'étude de la dispersion des biofilms d'*E. coli* formés en bioréacteur microfluidique par la molécule dispersante modèle CDA. L'étude a montré que le dispersant induit un effet structurel sur le biofilm. Un effet sur la fluorescence du rapporteur P1 semble également avoir lieu.

D'une part, les effets de la molécule ont été observés sur les structures des biofilms *in situ* et les résultats ont montré une réduction de plus de 50 % de la biomasse bactérienne, d'environ 40 % de l'épaisseur moyenne et d'environ 24 % de l'épaisseur maximale des biofilms. D'autre part, la dispersion du biofilm en profondeur a été observée : toutes les couches de celui-ci jusqu'au support sont affectées par le dispersant.

Une méthodologie expérimentale pour l'acquisition des images des biofilms par CLSM a été développée et mise en place : un masque adapté aux cellules de flux ibidi® qui permet de positionner et de repositionner l'échantillon à un endroit défini du biofilm, par la stratégie de recouvrement des ROI *via* la fenêtre de prévisualisation du logiciel de microscopie Micro-Manager, a été conçu. Une augmentation significative de l'effet dispersant du CDA sur la biomasse des biofilms par rapport aux épreuves réalisées sans repositionnement a été observée. Cette méthodologie permet donc de s'affranchir de la problématique de la forte hétérogénéité des régions observées des biofilms pouvant conduire à des erreurs d'estimation de la dispersion.

D'autre part, les effets de la molécule ont été investigués sur l'expression des rapporteurs au sein des biofilms. Concernant les rapporteurs *bdcA* et *fliC*, les résultats ne permettent pas de conclure une adaptation bactérienne à la dispersion des biofilms par le CDA. Concernant le rapporteur P1, une augmentation de l'intensité moyenne de fluorescence a été constatée au sein des biofilms ayant reçu le dispersant au niveau global des biofilms (plus de 26 % par rapport au contrôle), au niveau local des microcolonies du biofilm ainsi qu'à chaque couche de biofilm à partir de 6 µm d'épaisseur. Ces observations suggèrent que le rapporteur P1 pourrait être plus exprimé en présence de CDA qu'en son absence et que la molécule induirait une reprise d'activité métabolique des bactéries au sein du biofilm.

En outre, la non-cytotoxicité du CDA a été démontrée sur les bactéries d'*E. coli* en croissance planctonique. De plus, la molécule n'a pas d'effet majeur sur la croissance des souches malgré qu'une légère augmentation de la durée de la phase exponentielle semble exister. Enfin, la molécule n'induit pas l'expression des rapporteurs lorsque les bactéries sont en mode de vie planctonique. Tout ceci suggère que les effets du CDA sont biofilm-dépendants.

Un outil innovant nommé BIAM (Biofilm Intensity and Architecture Measurement) a finalement été développé afin de déterminer les intensités de fluorescence de l'objet étudié au sein du biofilm en fonction des paramètres structuraux de ce dernier. Au cours de ces travaux, BIAM a ainsi permis d'accéder aux intensités de fluorescence associées à la GFPmut2 au sein des biofilms d'*E. coli* souche BW25113 P1 et a démontré par la même occasion que l'outil est performant pour l'étude de rapporteurs génétiques pendant le cycle de vie des biofilms. BIAM est développé en tant que script dans le logiciel *open source* d'analyse d'images ImageJ, ce qui en fait un outil facile d'accès pour toute la communauté scientifique.

Conclusion générale et perspectives de recherche

Depuis leur découverte au XXe siècle, les biofilms ont révolutionné l'approche de la recherche en microbiologie. De nombreux procédés industriels ont également utilisé les propriétés des biofilms pour diverses applications. La reconnaissance grandissante des biofilms dans les problématiques liées aux secteurs industriels (*biofouling*, contamination de produits alimentaires et de l'eau) et médicaux (infections nosocomiales et chroniques) ces dernières années a mené les scientifiques à élaborer des stratégies de lutte anti-biofilms.

Pour lutter par exemple contre le *biofouling*, des procédures de désinfection sont généralement mises en place ; cependant le nettoyage des surfaces impliquant la dispersion des biofilms est une étape clef souvent sous-estimée. En effet, l'activité des agents antimicrobiens dans le biofilm est notamment limitée par le transport à travers la matrice extracellulaire. Ainsi, l'application de molécules dispersantes conduisant à la désagrégation de la matrice, combinée avec un traitement désinfectant, permettra une amélioration accrue de l'action antimicrobienne aussi bien dans un environnement industriel que médical.

Dans ce cadre, une meilleure compréhension des interactions d'une molécule dispersante modèle avec le biofilm (matrice polymérique et cellules) et du processus d'adaptation *in situ* des bactéries à l'action d'un tel agent (par des changements de l'expression génique) est essentielle pour le développement de nouvelles stratégies de contrôle innovantes et plus efficaces.

C'est dans ce contexte que mon travail de thèse a été réalisé, dont l'objectif était de comprendre et quantifier l'impact de la molécule CDA sur les biofilms d'*E. coli* (structure et régulation *in situ* de l'expression génique). Après une étude bibliographique des stratégies de lutte existantes contre les biofilms (chapitre 1), une molécule dispersante modèle, le CDA, a été sélectionnée dans le but de caractériser la dispersion des biofilms d'*E. coli* (chapitre 5). Pour ce faire, des souches spécifiques génétiquement modifiées ont été élaborées (chapitre 4) et un système microfluidique a été mis en place et optimisé pour le développement des biofilms de l'espèce (chapitre 3), biofilms caractérisés en termes de biomasse bactérienne, de composition de la matrice et de viabilité (chapitre 3). Le promoteur *rrnBPI* – dont l'opéron code pour les acides ribonucléiques ribosomiaux – a été étudié en particulier.

Les résultats des essais de dispersion (chapitre 5) montrent un effet dispersant associé à la molécule CDA. En effet, une réduction significative de la biomasse fixée (3 fois plus que le contrôle) et de l'épaisseur moyenne du biofilm (approximativement 2 fois plus que le contrôle) a été observée. Par ailleurs, une dispersion en profondeur du biofilm et jusque dans les couches proches du support a été démontrée, ce qui est un résultat original. Un masque adapté à la cellule de flux ibidi® majoritairement utilisée dans ces travaux a également été conçu et développé pour le repositionnement des échantillons au sein des chambres fluidiques. La caractérisation plus fine de la dispersion observée avec ce dispositif a validé l'approche de repositionnement (chapitre 5).

Un des paramètres qui change en fonction de la présence du CDA est l'épaisseur du biofilm. Une perte de volume – notamment dans les couches les plus hautes – est observée. La question qui peut se poser est la suivante : cette différence résulte-t-elle d'une réponse biologique des bactéries ou d'une action directe du CDA sur la stabilité et la structure du biofilm ? Dans le premier cas, on peut par exemple imaginer qu'un changement métabolique pourrait conduire à une diminution de la synthèse des molécules extracellulaires de la matrice. Dans le deuxième cas, la déstabilisation directe de la matrice

pourrait augmenter le taux de diffusion des nutriments aux bactéries, tout comme celui du CDA, résultant en un *feedback* positif qui mènerait à une diminution progressive de l'épaisseur du biofilm.

Les résultats de fluorescence lors des épreuves de dispersion suggèrent une réactivation métabolique des bactéries ayant subi le CDA. En effet, une augmentation de l'intensité moyenne de fluorescence associée à l'expression du promoteur *rrnBPI* semble avoir lieu dans le biofilm ainsi qu'en profondeur du biofilm en présence de CDA par rapport au contrôle (chapitre 5). Ces résultats sont originaux car, sauf erreur de notre part, c'est la première fois qu'une étude présente des profils d'intensité de fluorescence d'un gène d'intérêt dans le biofilm suite à l'ajout d'une molécule dispersante et en particulier l'agent CDA.

La molécule aurait donc un rôle double dans la dispersion : (i) rôle physicochimique, déstabilisant la structure du biofilm (dispersion passive ou détachement) et (ii) rôle physiologique, induisant une réponse génétique des bactéries (dispersion active). Par ailleurs, l'action de la molécule semble être biofilm-dépendante car les cellules planctoniques n'apparaissent pas affectées par celle-ci (chapitre 5).

Cependant, des essais complémentaires sont nécessaires pour confirmer la dispersion active suggérée par nos travaux. En effet, la structure du biofilm étant déstabilisée, l'accessibilité des bactéries aux nutriments pourrait être augmentée et déclencher l'expression de *PI*.

La diffusion de molécules au sein d'un biofilm dépend de plusieurs facteurs comme la taille et la charge de la molécule, l'âge et l'épaisseur du biofilm, la composition de la matrice extracellulaire et l'éventuelle présence de canaux à eau (Stewart, 2003). Parmi les essais à réaliser, le couplage de l'intensité de fluorescence avec la localisation *in situ* de la molécule CDA pourrait apporter de précieuses informations sur l'action de dispersion de cet agent.

Une manière de déterminer la diffusion du CDA à travers le biofilm, et donc d'estimer sa concentration locale, serait de conjuguer la molécule à une nanoparticule fluorescente (NPF). Une collaboration avec les chimistes du PPSM de l'ENS Paris-Saclay serait en ce sens très intéressante. En effet, lors de sa thèse, Chloé Grazon a synthétisé des NPFs et en a étudié les propriétés ; elle a également greffé des molécules à fonctions amine sur ces NPFs par chimie de couplage peptidique (Grazon, 2012). Il serait alors possible d'utiliser la fonction acide carboxylique du CDA pour le coupler à une NPF *via* cette même chimie. Ceci permettrait ainsi de suivre la diffusion en temps réel du CDA au sein des biofilms et de la corrélérer au gradient de fluorescence observé lors des épreuves de dispersion. Il faudrait cependant s'assurer que le couplage aux NPFs n'enlève pas les propriétés dispersantes du CDA.

Lors de la caractérisation des souches étudiées et notamment de la souche BW25113 P1, l'essai de marquage externe des biofilms avec le SYTO61 a révélé une tendance du marqueur à sous-estimer la biomasse bactérienne (Chapitre 4). Ceci est un résultat intéressant qui nécessiterait une étude plus approfondie, au vu de l'universalité d'utilisation de ce type de marqueurs pour étudier les biofilms.

Avec l'arrivée de nouvelles technologies, les biologistes ont aussi besoin de nouvelles méthodes d'analyse, afin d'exploiter tout le potentiel des données générées par ces dispositifs technologiques. Mais plus les questions scientifiques sont spécifiques, moins les outils existent. C'est dans ce contexte qu'a été développé BIAM (Biofilm Intensity and Architecture Measurement), et que bon nombre d'applications en accès libre sont également publiées chaque année. « In 2014 alone, we published about 50 papers in which an algorithmic development or software tool is central to the work » (Reviewing computational methods, Nature Methods Editorial, décembre 2015). La disponibilité du logiciel, le caractère intuitif de l'interface d'utilisation, la pertinence de la méthode analytique, la

robustesse de l'outil ou encore l'aptitude du groupe de recherche à supporter de nouveaux utilisateurs sont autant de critères souhaités par la communauté scientifique et définissent aussi si la méthode proposée rencontrera son public.

Dans le cadre de l'étude des biofilms, des logiciels *open source* tels que COMSTAT (Heydorn et al, 2000 ; Vorregaard, 2008 ; <http://www.comstat.dk>), *daime* (Daims et al, 2006) ou PHLIP (Mueller et al, 2006) ont été développés pour caractériser les biofilms en déterminant leurs paramètres structuraux à partir d'images CLSM. Cependant, des logiciels capables d'extraire des données d'intensité de fluorescence en fonction de l'architecture des biofilms manquent aujourd'hui.

Avec BIAM, la jonction semi-quantitative et automatisée entre les structures tridimensionnelles des biofilms et les intensités de fluorescence d'un (ou de plusieurs) fluorochrome(s) au sein de ces structures est rendue possible. La méthode permet ainsi de connecter l'évolution dans le temps de l'architecture d'un biofilm en fonction de l'expression de certains gènes, de la présence/position de polymères spécifiques dans la matrice extracellulaire ou encore de la diffusion de types moléculaires à travers le biofilm. Le potentiel d'application de l'outil est donc multiple et nous espérons que BIAM saura trouver sa place au sein de la communauté scientifique des biofilms.

Pendant ma thèse, le potentiel dispersant de la molécule CDA a connu un certain engouement et des laboratoires de recherche à travers le monde (notamment américains et iraniens) se sont intéressés à des aspects particuliers du CDA (Marques et al, 2014 ; Rahmani-Badi et al, 2014 ; Sepehr et al, 2014 ; Marques et al, 2015 ; Rahmani-Badi 2015). L'induction de la dispersion par le CDA représente une stratégie alternative dans l'arsenal disponible pour lutter contre les biofilms, arsenal souvent limité par l'apparition de mécanismes de résistance développés par les microorganismes face aux agents antimicrobiens utilisés. La dispersion étant une étape fondamentale du cycle de vie des biofilms nécessaire à la survie de l'espèce, l'apparition de mécanismes de résistance par rapport à celle-ci semble cependant peu probable.

Il y a urgence à développer de nouvelles stratégies pour contrôler les biofilms en secteur médical et industriel. De nombreuses approches ont déjà fait leurs preuves sur différents systèmes modèles de biofilms en laboratoire. Cependant, les biofilms formés en milieu naturel, industriel et médical sont beaucoup plus complexes – en termes d'espèces impliquées et d'hétérogénéité notamment – que les biofilms développés dans les laboratoires de recherche, souvent mono-espèces. Une approche mettant en jeu des molécules à large spectre d'action présenterait donc une application élargie et une efficacité augmentée. Grâce à son action dispersante sur différentes espèces microbiennes, le CDA trouverait tout son potentiel dans la mise au point de procédés de dispersion. En découvrant les mécanismes d'action du CDA, il serait alors possible de combiner ses effets à ceux d'autres molécules actives.

L'application conjuguée du CDA avec certains antibiotiques a notamment démontré un effet synergique dans l'éradication de biofilms associés aux cathéters (Rahmani-Badi et al, 2014) et l'utilisation de la molécule avec des désinfectants résulte en l'élimination de biofilms formés par des bactéries problématiques de l'industrie agroalimentaire (Sepehr et al, 2014). Ces deux études démontrent le potentiel d'application du CDA aussi bien en milieu industriel que médical. Le CDA serait donc un adjuvant efficace dans les cocktails de dispersion. La mise au point fine de tels procédés requiert encore une fois la compréhension des mécanismes de dispersion par le CDA, afin d'identifier la réponse bactérienne à ce signal et de mieux cibler les inhibiteurs ou agents antimicrobiens subséquents.

La mise en place de projets de collaboration interdisciplinaires est nécessaire pour l'avancée des recherches et applications. Le rapprochement des ingénieurs de procédés et des microbiologistes est

fondamental pour le développement de nouvelles stratégies de lutte anti-biofilms. En effet, là où l'ingénieur conceptualise une boîte noire avec des rendements de production et une efficacité d'application, le microbiologiste affine la compréhension des processus biologiques ayant lieu dans la boîte. Une tâche importante qui lui est confiée est d'étudier ces biofilms, de déterminer les microorganismes présents et surtout de décrypter leurs activités *in situ*.

Le terme *in situ* est d'une importance capitale. En effet, ces deux dernières décennies ont connu une révolution technologique sans précédent avec notamment le développement de l'informatique, l'explosion d'internet et l'apparition du *big data*. Les données disponibles en ligne sont d'une quantité impressionnante et le développement d'outils de simulation a vu le jour dans de nombreux domaines. La microbiologie n'a pas échappé à cette révolution. La tendance des recherches dans ce secteur semble aussi aller vers une informatisation des expériences et une modélisation des processus biologiques. Cependant, l'étude de la vie – étymologie même du mot biologie – doit nécessairement passer par des expériences *in vivo* et *in situ*.

A l'instar de Bill Costerton – le « Père des biofilms » (Shirliff et al, 2012) – j'ai l'intime conviction que la caractérisation des biofilms et de leurs processus physiologiques ne peut se passer d'une observation microscopique directe. Costerton réalisa bien assez tôt la puissance de l'imagerie en tant qu'outil de découverte scientifique : « Because of my ingrained tendency to place my trust in direct *in situ* observations of bacteria by light and electron microscopy [...] » (Costerton, 1989). Il utilisera cette approche tout au long de sa carrière, carrière dénombrant plus de 700 publications scientifiques, couvrant des domaines aussi variés que la médecine humaine et vétérinaire, la microbiologie, l'ingénierie, l'industrie ou l'environnement, et s'étendant sur plus d'un demi-siècle (Lappin-Scott et al, 2014). L'histoire de sa vie aura été d'une grande inspiration pendant mon doctorat.

Références bibliographiques

- Abubakar, A.A., Pukuma, M.S., Abdulazeez, F.B., 2013. Frequency of biofilm formation in toothbrushes and wash basin junks. *Annals of Tropical Medicine and Public Health* 6, 55. doi:10.4103/1755-6783.115198
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2006. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol. Microbiol.* 59, 1114–1128. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x
- Allwood, A.C., Walter, M.R., Burch, I.W., Kamber, B.S., 2007. 3.43 billion-year-old stromatolite reef from the Pilbara Craton of Western Australia: Ecosystem-scale insights to early life on Earth. *Precambrian Research* 158, 198–227. doi:10.1016/j.precamres.2007.04.013
- Amari, D.T., Marques, C.N.H., Davies, D.G., 2013. The putative enoyl-coenzyme A hydratase DspI is required for production of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion autoinducer *cis*-2-decenoic acid. *J. Bacteriol.* 195, 4600–4610. doi:10.1128/JB.00707-13
- An, Y.H., Friedman, R.J., 1997. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods* 30, 141–152. doi:10.1016/S0167-7012(97)00058-4
- Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M., Molin, S., 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2240–2246.
- Andrews, B.T., Schoenfish, A.R., Roy, M., Waldo, G., Jennings, P.A., 2007. The rough energy landscape of superfolder GFP is linked to the chromophore. *J. Mol. Biol.* 373, 476–490. doi:10.1016/j.jmb.2007.07.071
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M., Lindberg, M., 2001. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 163–167.
- Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Bonaventura, G.D., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C., 2016. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* 0, 1–39. doi:10.1080/1040841X.2016.1208146
- Azeredo, J., Sutherland, I.W., 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* 9, 261–266.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol. Syst. Biol.* 2, 2006.0008. doi:10.1038/msb4100050
- Bachmann, B.J., 1996. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC 2460–2488.
- Baker, C.S., Eöry, L.A., Yakhnin, H., Mercante, J., Romeo, T., Babitzke, P., 2007. CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* hfq by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J. Bacteriol.* 189, 5472–5481. doi:10.1128/JB.00529-07
- Barraud, N., Hasset, D.J., Hwang, S.-H., Rice, S.A., Kjelleberg, S., Webb, J.S., 2006. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 7344–7353. doi:10.1128/JB.00779-06
- Barraud, N., Kjelleberg, S., Rice, S.A., 2015. Dispersal from Microbial Biofilms. *Microbiol Spectr* 3.

doi:10.1128/microbiolspec.MB-0015-2014

- Barraud, N., Schleheck, D., Klebensberger, J., Webb, J.S., Hassett, D.J., Rice, S.A., Kjelleberg, S., 2009. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. *J. Bacteriol.* 191, 7333–7342. doi:10.1128/JB.00975-09
- Bassler, B.L., 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 582–587.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Denis Newbold, J., Hansen, C.M.E., 2003. Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426, 439–442. doi:10.1038/nature02152
- Bayles, K.W., 2007. The biological role of death and lysis in biofilm development. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 721–726. doi:10.1038/nrmicro1743
- Beech, I.B., Sunner, J., 2004. Biocorrosion: towards understanding interactions between biofilms and metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 181–186. doi:10.1016/j.copbio.2004.05.001
- Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J.-M., 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322, 249–289.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J.A.J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., Ghigo, J.-M., 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 51, 659–674.
- Bispo, P.J.M., Haas, W., Gilmore, M.S., 2015. Biofilms in Infections of the Eye. *Pathogens* 4, 111–136. doi:10.3390/pathogens4010111
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y., 1997. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453–1462. doi:10.1126/science.277.5331.1453
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M., Kaefer, V., Sourjik, V., Roth, V., Jenal, U., 2010. Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. *Cell* 141, 107–116. doi:10.1016/j.cell.2010.01.018
- Boks, N.P., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., Norde, W., 2008. Bond-strengthening in staphylococcal adhesion to hydrophilic and hydrophobic surfaces using atomic force microscopy. *Langmuir* 24, 12990–12994. doi:10.1021/la801824c
- Bond, D.R., Holmes, D.E., Tender, L.M., Lovley, D.R., 2002. Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science* 295, 483–485. doi:10.1126/science.1066771
- Brading, M.G., Jass, J., Lappin-Scott, H.M., 2003. Dynamics of bacterial biofilm. *Microb Biof* 5, 46.
- Brady, R.A., Leid, J.G., Calhoun, J.H., Costerton, J.W., Shirtliff, M.E., 2008. Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 52, 13–22. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x
- Breyers, J., n.d. (1988) Modeling biofilm accumulation. In: Bazin MJ, Prosser JI (eds) *Physiology models in microbiology*, vol 2. Boca Raton, FL, pp 109–144.
- Briandet, R., Fechner, L., Naïtali, M., Dreanno, C., 2012. *Biofilms, quand les microbes s'organisent*. Editions Quae.
- Bryers, J.D., 2008. Medical Biofilms. *Biotechnol Bioeng* 100, 1–18. doi:10.1002/bit.21838
- Busscher, H.J., van der Mei, H.C., 2006. Microbial Adhesion in Flow Displacement Systems. *Clin Microbiol Rev* 19, 127–141. doi:10.1128/CMR.19.1.127-141.2006
- Cai, P.-J., Xiao, X., He, Y.-R., Li, W.-W., Yu, L., Yu, H.-Q., 2013. Disintegration of aerobic granules induced by *trans*-2-decenoic acid. *Bioresour. Technol.* 128, 823–826. doi:10.1016/j.biortech.2012.10.071
- Callen, B.P., Shearwin, K.E., Egan, J.B., 2004. Transcriptional interference between convergent

- promoters caused by elongation over the promoter. *Mol. Cell* 14, 647–656. doi:10.1016/j.molcel.2004.05.010
- Cambray, G., Guimaraes, J.C., Mutalik, V.K., Lam, C., Mai, Q.-A., Thimmaiah, T., Carothers, J.M., Arkin, A.P., Endy, D., 2013. Measurement and modeling of intrinsic transcription terminators. *Nucleic Acids Res.* 41, 5139–5148. doi:10.1093/nar/gkt163
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802–805.
- Chambers, L.D., Stokes, K.R., Walsh, F.C., Wood, R.J.K., 2006. Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology* 201, 3642–3652. doi:10.1016/j.surfcoat.2006.08.129
- Chao, Y., Zhang, T., 2011. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology* 92, 381–392. doi:10.1007/s00253-011-3551-5
- Characklis, W.G., 1990. Biofilm processes. *Biofilms* 195–231.
- Chen, X., Stewart, P.S., 2000. Biofilm removal caused by chemical treatments. *Water Research* 34, 4229–4233. doi:10.1016/S0043-1354(00)00187-1
- Chevance, F.F.V., Hughes, K.T., 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Micro* 6, 455–465. doi:10.1038/nrmicro1887
- Chmielewski, R.A.N., Frank, J.F., 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 22–32. doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x
- Christensen, B.B., Haagenen, J.A.J., Heydorn, A., Molin, S., 2002. Metabolic commensalism and competition in a two-species microbial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2495–2502.
- Christensen, B.B., Sternberg, C., Andersen, J.B., Eberl, L., Moller, S., Givskov, M., Molin, S., 1998. Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2247–2255.
- Chua, S.L., Liu, Y., Yam, J.K.H., Chen, Y., Vejborg, R.M., Tan, B.G.C., Kjelleberg, S., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Yang, L., 2014. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nat Commun* 5, 4462. doi:10.1038/ncomms5462
- Cloete, T.E., Jacobs, L., Brözel, V.S., 1998. The chemical control of biofouling in industrial water systems. *Biodegradation* 9, 23–37. doi:10.1023/A:1008216209206
- Cobrado, L., Azevedo, M.M., Silva-Dias, A., Ramos, J.P., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., 2012. Cerium, chitosan and hamamelitannin as novel biofilm inhibitors? *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1159–1162. doi:10.1093/jac/dks007
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H., Falkow, S., 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33–38. doi:10.1016/0378-1119(95)00685-0
- Costerton, J., 1989. HOW BACTERIA STICK-A CITATION CLASSIC COMMENTARY ON HOW BACTERIA STICK BY COSTERTON, JW, GEESEY, GG, AND CHENG, KJ. *CURRENT CONTENTS/AGRICULTURE BIOLOGY & ENVIRONMENTAL SCIENCES* 18–18.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J., 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95.
- Costerton, J.W., Irvin, R.T., Cheng, K.J., 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 299–324. doi:10.1146/annurev.mi.35.100181.001503
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M., 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.003431
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., De Beer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G., 1994. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176, 2137–2142.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of

- persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- Cotter, P.A., Stibitz, S., 2007. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 17–23. doi:10.1016/j.mib.2006.12.006
- Cox, M.M., 1983. The FLP protein of the yeast 2-microns plasmid: expression of a eukaryotic genetic recombination system in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 4223–4227.
- Crusz, S.A., Popat, R., Rybtke, M.T., Cámara, M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., Diggle, S.P., Williams, P., 2012. Bursting the bubble on bacterial biofilms: a flow cell methodology. *Biofouling* 28, 835–842. doi:10.1080/08927014.2012.716044
- Curtin, J.J., Donlan, R.M., 2006. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1268–1275. doi:10.1128/AAC.50.4.1268-1275.2006
- Da Re, S., Ghigo, J.-M., 2006. A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 3073–3087. doi:10.1128/JB.188.8.3073-3087.2006
- Daims, H., Lückner, S., Wagner, M., 2006. *daime*, a novel image analysis program for microbial ecology and biofilm research. *Environmental Microbiology* 8, 200–213. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00880.x
- Danese, P.N., Pratt, L.A., Kolter, R., 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J. Bacteriol.* 182, 3593–3596.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 6640–6645.
- Davies, D.G., 2011. Biofilm Dispersion, in: Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U. (Eds.), *Biofilm Highlights*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 1–28.
- Davies, D.G., Chakrabarty, A.M., Geesey, G.G., 1993. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 59, 1181–1186.
- Davies, D.G., Marques, C.N.H., 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 191, 1393–1403. doi:10.1128/JB.01214-08
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295–298.
- De Beer, D., Stoodley, P., 2006. Microbial biofilms, in: *The Prokaryotes*. Springer, pp. 904–937.
- De Beer, D., Stoodley, P., Lewandowski, Z., 1994. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 636–641. doi:10.1002/bit.260440510
- Decho, A.W., 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 28: 73-153. ResearchGate 28, 73–154.
- Delort, A.-M., Väitilingom, M., Amato, P., Sancelme, M., Parazols, M., Mailhot, G., Laj, P., Deguillaume, L., 2010. A short overview of the microbial population in clouds: Potential roles in atmospheric chemistry and nucleation processes. *Atmospheric Research* 98, 249–260. doi:10.1016/j.atmosres.2010.07.004
- Dennis, P.P., Ehrenberg, M., Bremer, H., 2004. Control of rRNA Synthesis in *Escherichia coli*: a Systems Biology Approach. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 639–668. doi:10.1128/MMBR.68.4.639-668.2004
- Desbois, A.P., Lebl, T., Yan, L., Smith, V.J., 2008. Isolation and structural characterisation of two antibacterial free fatty acids from the marine diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 755–764. doi:10.1007/s00253-008-1714-9
- Desbois, A.P., Smith, V.J., 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and

- biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 1629–1642. doi:10.1007/s00253-009-2355-3
- Dobretsov, S., Teplitski, M., Paul, V., 2009. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling* 25, 413–427. doi:10.1080/08927010902853516
- Domka, J., Lee, J., Bansal, T., Wood, T.K., 2007. Temporal gene-expression in *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Environ. Microbiol.* 9, 332–346. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01143.x
- Dong, C., Beis, K., Nesper, J., Brunkan-Lamontagne, A.L., Clarke, B.R., Whitfield, C., Naismith, J.H., 2006. Wza the translocon for *E. coli* capsular polysaccharides defines a new class of membrane protein. *Nature* 444, 226–229. doi:10.1038/nature05267
- Dong, Y.-H., Wang, L.-H., Zhang, L.-H., 2007. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362, 1201–1211. doi:10.1098/rstb.2007.2045
- Donlan, R.M., 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends in Microbiology* 17, 66–72. doi:10.1016/j.tim.2008.11.002
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Dow, J.M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.-Q., Feng, J.-X., Tang, J.-L., 2003. Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 10995–11000. doi:10.1073/pnas.1833360100
- Dow, J.M., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Ryan, R.P., 2006. The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 1378–1384. doi:10.1094/MPMI-19-1378
- Ebel, W., Trempey, J.E., 1999. *Escherichia coli* RcsA, a positive activator of colanic acid capsular polysaccharide synthesis, functions To activate its own expression. *J. Bacteriol.* 181, 577–584.
- Ehrlich, G.D., Ahmed, A., Earl, J., Hiller, N.L., Costerton, J.W., Stoodley, P., Post, J.C., DeMeo, P., Hu, F.Z., 2010. The Distributed Genome Hypothesis as a Rubric for Understanding Evolution in situ During Chronic Bacterial Biofilm Infectious Processes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59, 269–279. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00704.x
- Ehrlich, G.D., Veeh, R., Wang, X., Costerton, J.W., Hayes, J.D., Hu, F.Z., Daigle, B.J., Ehrlich, M.D., Post, J.C., 2002. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA* 287, 1710–1715.
- Else, T.A., Pantle, C.R., Amy, P.S., 2003. Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Appl Environ Microbiol* 69, 5006–5010. doi:10.1128/AEM.69.8.5006-5010.2003
- Fisher, A.C., DeLisa, M.P., 2008. Laboratory Evolution of Fast-Folding Green Fluorescent Protein Using Secretory Pathway Quality Control. *PLOS ONE* 3, e2351. doi:10.1371/journal.pone.0002351
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 623–633. doi:10.1038/nrmicro2415
- Foxman, B., 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.* 113 Suppl 1A, 5S–13S.
- Fu, P., 2006. A perspective of synthetic biology: assembling building blocks for novel functions. *Biotechnol J* 1, 690–699. doi:10.1002/biot.200600019
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13, 34–40. doi:10.1016/j.tim.2004.11.010
- Garrett, T.R., Bhakoo, M., Zhang, Z., 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science* 18, 1049–1056. doi:10.1016/j.pnsc.2008.04.001
- Geesey, G.G., Mutch, R., Costerton, J.W., Green, R.B., 1978. Sessile bacteria: An important

- component of the microbial population in small mountain streams 1. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1214–1223. doi:10.4319/lo.1978.23.6.1214
- Geier, G.E., Modrich, P., 1979. Recognition sequence of the dam methylase of *Escherichia coli* K12 and mode of cleavage of Dpn I endonuclease. *J. Biol. Chem.* 254, 1408–1413.
- Ghigo, J.M., 2003. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Res. Microbiol.* 154, 1–8. doi:10.1016/S0923-2508(02)00012-8
- Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, A.J., Rickard, A.H., Whyte, F.W., 2002. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Adv. Microb. Physiol.* 46, 202–256.
- Gilbert, S.F., de Boer, H.A., Nomura, M., 1979. Identification of initiation sites for the in vitro transcription of rRNA operons *rrnE* and *rrnA* in *E. coli*. *Cell* 17, 211–224.
- Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L., Tolker-Nielsen, T., 2010. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Mol. Microbiol.* 75, 815–826. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06793.x
- Glitz, F., Peters, G., 2000. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci.
- Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., Lory, S., 2004. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev. Cell* 7, 745–754. doi:10.1016/j.devcel.2004.08.020
- Gopalkrishnan, S., Nicoloff, H., Ades, S.E., 2014. Co-ordinated regulation of the extracytoplasmic stress factor, sigmaE, with other *Escherichia coli* sigma factors by (p)ppGpp and DksA may be achieved by specific regulation of individual holoenzymes. *Mol Microbiol* 93, 479–493. doi:10.1111/mmi.12674
- Götz, F., 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microbiol.* 43, 1367–1378.
- Govan, J.R., Deretic, V., 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60, 539–574.
- Grazon, C., 2012. Élaboration de nanoparticules fluorescentes à base de BODIPY par polymérisation RAFT en miniémulsion : synthèse, caractérisation et fonctionnalisation de surface (phdthesis). École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan.
- Grenier, F., Matteau, D., Baby, V., Rodrigue, S., 2014. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announc* 2. doi:10.1128/genomeA.01038-14
- Guilhen, C., Charbonnel, N., Parisot, N., Gueguen, N., Iltis, A., Forestier, C., Balestrino, D., 2016. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics* 17. doi:10.1186/s12864-016-2557-x
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108. doi:10.1038/nrmicro821
- Hall-Stoodley, L., Hu, F.Z., Gieseke, A., Nistico, L., Nguyen, D., Hayes, J., Forbes, M., Greenberg, D.P., Dice, B., Burrows, A., Wackym, P.A., Stoodley, P., Post, J.C., Ehrlich, G.D., Kerschner, J.E., 2006. Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* 296, 202–211. doi:10.1001/jama.296.2.202
- Hall-Stoodley, L., Nistico, L., Sambanthamoorthy, K., Dice, B., Nguyen, D., Mershon, W.J., Johnson, C., Ze Hu, F., Stoodley, P., Ehrlich, G.D., Post, J.C., 2008. Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiology* 8, 173. doi:10.1186/1471-2180-8-173
- Harmsen, M., Lappann, M., Knöchel, S., Molin, S., 2010. Role of Extracellular DNA during Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2271–2279. doi:10.1128/AEM.02361-09
- Harrison, J.J., Ceri, H., Yerly, J., Stremick, C.A., Hu, Y., Martinuzzi, R., Turner, R.J., 2006. The use of microscopy and three-dimensional visualization to evaluate the structure of microbial biofilms cultivated in the Calgary Biofilm Device. *Biol Proced Online* 8, 194–215.

doi:10.1251/bpo127

- Hasman, H., Schembri, M.A., Klemm, P., 2000. Antigen 43 and type 1 fimbriae determine colony morphology of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 182, 1089–1095.
- Hazan, Z., Zumeris, J., Jacob, H., Raskin, H., Kratysh, G., Vishnia, M., Dror, N., Barliya, T., Mandel, M., Lavie, G., 2006. Effective Prevention of Microbial Biofilm Formation on Medical Devices by Low-Energy Surface Acoustic Waves. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 4144–4152. doi:10.1128/AAC.00418-06
- Hengge, R., 2009. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 263–273. doi:10.1038/nrmicro2109
- Heydorn, A., Nielsen, A.T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B.K., Molin, S., 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology (Reading, Engl.)* 146 (Pt 10), 2395–2407.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., 2012. Inhibition and dispersal of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms by a small diffusible *Pseudomonas aeruginosa* exoproduct(s). *Arch. Microbiol.* 194, 391–403. doi:10.1007/s00203-011-0767-9
- Hobbs, M., Reeves, P.R., 1994. The JUMPstart sequence: a 39 bp element common to several polysaccharide gene clusters. *Mol. Microbiol.* 12, 855–856.
- Hofmann, H.J., Grey, K., Hickman, A.H., Thorpe, R.I., 1999. Origin of 3.45 Ga coniform stromatolites in Warrawoona Group, Western Australia. *Geol. Soc. Am. Bull.* 111, 1256–1262. ResearchGate 111, 1256–1262. doi:10.1130/0016-7606(1999)111<1256:OOGCSI>2.3.CO;2
- Hong, S.H., Hegde, M., Kim, J., Wang, X., Jayaraman, A., Wood, T.K., 2012. Synthetic quorum-sensing circuit to control consortial biofilm formation and dispersal in a microfluidic device. *Nat Commun* 3, 613. doi:10.1038/ncomms1616
- 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. *PNAS* 109, 13088–13093. doi:10.1073/pnas.1200791109
- Hughes, K.T., Gillen, K.L., Semon, M.J., Karlinsey, J.E., 1993. Sensing structural intermediates in bacterial flagellar assembly by export of a negative regulator. *Science* 262, 1277–1280.
- Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J.S., Dodson, K.W., Crowley, J.R., Heuser, J., Chapman, M.R., Hadjifrangiskou, M., Henderson, J.P., Hultgren, S.J., 2013. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *MBio* 4, e00645-613. doi:10.1128/mBio.00645-13
- Hunt, S.M., Werner, E.M., Huang, B., Hamilton, M.A., Stewart, P.S., 2004. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment. *Applied and environmental microbiology* 70, 7418–7425.
- Itoh, Y., Rice, J.D., Goller, C., Pannuri, A., Taylor, J., Meisner, J., Beveridge, T.J., Preston, J.F., Romeo, T., 2008. Roles of *pgaABCD* genes in synthesis, modification, and export of the *Escherichia coli* biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *J. Bacteriol.* 190, 3670–3680. doi:10.1128/JB.01920-07
- Itoh, Y., Wang, X., Hinnebusch, B.J., Preston, J.F., Romeo, T., 2005. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J. Bacteriol.* 187, 382–387. doi:10.1128/JB.187.1.382-387.2005
- Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E., Romeo, T., 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184, 290–301.
- James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., deLancey, Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W., Stewart, P.S., 2008. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 16, 37–44. doi:10.1111/j.1524-475X.2007.00321.x

- Jayaraman, A., Mansfeld, F.B., Wood, T.K., 1999. Inhibiting sulfate-reducing bacteria in biofilms by expressing the antimicrobial peptides indolicidin and bactenecin. *J Ind Microbiol Biotech* 22, 167–175. doi:10.1038/sj.jim.2900627
- Jenal, U., 2004. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria? *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 185–191. doi:10.1016/j.mib.2004.02.007
- Jennings, J.A., Courtney, H.S., Haggard, W.O., 2012. *Cis*-2-decenoic acid inhibits *S. aureus* growth and biofilm in vitro: a pilot study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 470, 2663–2670. doi:10.1007/s11999-012-2388-2
- Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M., Römling, U., 2006. Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 60, 602–616. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05123.x
- 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. doi:10.1126/science.1058758
- Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R.R., Smith, D.C., D'Hondt, S., 2012. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *PNAS* 109, 16213–16216. doi:10.1073/pnas.1203849109
- Kaplan, J.B., 2010. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* 89, 205–218. doi:10.1177/0022034509359403
- Kaplan, J.B., Rangunath, C., Ramasubbu, N., Fine, D.H., 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Biofilm Cells by an Endogenous β -Hexosaminidase Activity. *J Bacteriol* 185, 4693–4698. doi:10.1128/JB.185.16.4693-4698.2003
- Karaolis, D.K.R., Rashid, M.H., Chythanya, R., Luo, W., Hyodo, M., Hayakawa, Y., 2005. c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1029–1038. doi:10.1128/AAC.49.3.1029-1038.2005
- Karatan, E., Watnick, P., 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 310–347. doi:10.1128/MMBR.00041-08
- Katsikogianni, M., Missirlis, Y.F., 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater* 8, 37–57.
- Kelsey, I., Nakayama, S., Sintim, H.O., 2012. Diamidinium and iminium aromatics as new aggregators of the bacterial signaling molecule, c-di-GMP. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 881–885. doi:10.1016/j.bmcl.2011.12.039
- Kim, B.H., Ikeda, T., Park, H.S., Kim, H.J., Hyun, M.S., Kano, K., Takagi, K., Tatsumi, H., 1999. Electrochemical activity of an Fe(III)-reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens* IR-1, in the presence of alternative electron acceptors. *Biotechnology Techniques* 13, 475–478. doi:10.1023/A:1008993029309
- Kim, J.-H., Choi, D.-C., Yeon, K.-M., Kim, S.-R., Lee, C.-H., 2011. Enzyme-immobilized nanofiltration membrane to mitigate biofouling based on quorum quenching. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1601–1607. doi:10.1021/es103483j
- Kim, M.K., Park, S.R., Cho, S.J., Lim, W.J., Ryu, S.K., An, C.L., Hong, S.Y., Park, Y.W., Kahng, G.G., Kim, J.H., Kim, H., Yun, H.D., 2002. The effect of a disrupted yhjQ gene on cellular morphology and cell growth in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 134–138. doi:10.1007/s00253-002-1102-9
- Kiss, A., Sain, B., Venetianer, P., 1977. The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 79, 77–79. doi:10.1016/0014-5793(77)80354-2

- Kjærsgaard, K., Schembri, M.A., Ramos, C., Molin, S., Klemm, P., 2000. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environ. Microbiol.* 2, 695–702.
- Kjellerup, B.V., Kjeldsen, K.U., Lopes, F., Abildgaard, L., Ingvorsen, K., Frølund, B., Sowers, K.R., Nielsen, P.H., 2009. Biocorrosion and biofilm formation in a nutrient limited heating system subjected to alternating microaerophilic conditions. *Biofouling* 25, 727–737. doi:10.1080/08927010903114611
- Koch, C., Høiby, N., 1993. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341, 1065–1069.
- Koch, G.H., Michiel, P.H., Virmani, Y.P., Payer, J.H., n.d. Cost of Corrosion Study Unveiled.
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., Losick, R., 2010. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 328, 627–629. doi:10.1126/science.1188628
- Komeda, Y., 1986. Transcriptional control of flagellar genes in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 168, 1315–1318.
- Komeda, Y., Iino, T., 1979. Regulation of expression of the flagellin gene (*hag*) in *Escherichia coli* K-12: analysis of *hag-lac* gene fusions. *J. Bacteriol.* 139, 721–729.
- Kopel, M., Degtyar, E., Banin, E., 2011. Surface acoustic waves increase the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antibiotic treatment. *Biofouling* 27, 701–711. doi:10.1080/08927014.2011.597051
- Körstgens, V., Flemming, H.C., Wingender, J., Borchard, W., 2001. Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *J. Microbiol. Methods* 46, 9–17.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S.J., 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a010306. doi:10.1101/cshperspect.a010306
- Kuchma, S.L., O’Toole, G.A., 2000. Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 429–433.
- Kulasekara, H.D., Ventre, I., Kulasekara, B.R., Lazdunski, A., Filloux, A., Lory, S., 2005. A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol. Microbiol.* 55, 368–380. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04402.x
- Kumada, Y., Benson, D.R., Hillemann, D., Hosted, T.J., Rochefort, D.A., Thompson, C.J., Wohlleben, W., Tateno, Y., 1993. Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3009–3013.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., Iino, T., 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 172, 741–747.
- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2004. Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 186, 692–698. doi:10.1128/JB.186.3.692-698.2004
- Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J.G., Nijland, R., 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 813–823. doi:10.1007/s00253-010-2468-8
- Lappin-Scott, H., Burton, S., Stoodley, P., 2014. Revealing a world of biofilms — the pioneering research of Bill Costerton. *Nat Rev Micro* 12, 781–787. doi:10.1038/nrmicro3343
- Larrainzar, E., O’Gara, F., Morrissey, J.P., 2005. Applications of autofluorescent proteins for in situ studies in microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 257–277.
- Lavery, G., Gorman, S.P., Gilmore, B.F., 2014. Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens* 3, 596–632. doi:10.3390/pathogens3030596
- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Kuhlicke, U., Neu, T.R., 2007. In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Can. J. Microbiol.* 53, 450–458.

doi:10.1139/W06-146

- Le Quéré, B., Ghigo, J.-M., 2009. BcsQ is an essential component of the *Escherichia coli* cellulose biosynthesis apparatus that localizes at the bacterial cell pole. *Mol. Microbiol.* 72, 724–740. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06678.x
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2014. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78, 510–543. doi:10.1128/MMBR.00013-14
- Lee, J., Attila, C., Cirillo, S.L.G., Cirillo, J.D., Wood, T.K., 2009. Indole and 7-hydroxyindole diminish *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb Biotechnol* 2, 75–90. doi:10.1111/j.1751-7915.2008.00061.x
- Lee, J., Bansal, T., Jayaraman, A., Bentley, W.E., Wood, T.K., 2007a. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* biofilms are inhibited by 7-hydroxyindole and stimulated by isatin. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4100–4109. doi:10.1128/AEM.00360-07
- Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Lory, S., 2007b. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 65, 1474–1484. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05879.x
- Lehti, T.A., Bauchart, P., Dobrindt, U., Korhonen, T.K., Westerlund-Wikström, B., 2012. The fimbriae activator MatA switches off motility in *Escherichia coli* by repression of the flagellar master operon flhDC. *Microbiology (Reading, Engl.)* 158, 1444–1455. doi:10.1099/mic.0.056499-0
- Lembre, P., Lorentz, C., Di, P., 2012. Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World, in: Karunaratne, D.N. (Ed.), *The Complex World of Polysaccharides*. InTech.
- Leriche, V., Sibille, P., Carpentier, B., 2000. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Applied and environmental microbiology* 66, 1851–1856.
- Lewis, K., 2010. Persister Cells. *Annual Review of Microbiology* 64, 357–372. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134306
- Liu, L.F., Wang, J.C., 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 7024–7027.
- Liu, X., Matsumura, P., 1994. The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the *Escherichia coli* flagellar class II operons. *J. Bacteriol.* 176, 7345–7351.
- Livornese, L., Korzeniowski, O., 1992. Pathogenesis of infective endocarditis. *Infective endocarditis*, 2nd ed. Raven Press, New York, NY 19–35.
- Lopes, F.A., Morin, P., Oliveira, R., Melo, L.F., 2006. Interaction of *Desulfovibrio desulfuricans* biofilms with stainless steel surface and its impact on bacterial metabolism. *Journal of Applied Microbiology* 101, 1087–1095. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03001.x
- Lopes, F.A., Morin, P., Oliveira, R., Melo, L.F., 2005. The influence of nickel on the adhesion ability of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Colloids Surf B Biointerfaces* 46, 127–133. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.07.020
- Lopes, F.A., Perrin, S., Féron, D., 2007. A dual-electrochemical cell to study the biocorrosion of stainless steel. *Water Science and Technology* 55, 499–504. doi:10.2166/wst.2007.296
- Lord, D.M., Baran, A.U., Wood, T.K., Peti, W., Page, R., 2014. BdcA, a Protein Important for *Escherichia coli* Biofilm Dispersal, Is a Short-Chain Dehydrogenase/Reductase that Binds Specifically to NADPH. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0105751
- Lovley, D.R., 2006a. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. *Nat Rev Micro* 4, 497–508. doi:10.1038/nrmicro1442
- Lovley, D.R., 2006b. Microbial energizers: fuel cells that keep on going. *Microbe-American Society*

- for Microbiology 1, 323.
- Lu, T.K., Collins, J.J., 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104, 11197–11202. doi:10.1073/pnas.0704624104
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., Pier, G.B., 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin. Microbiol. Rev. 15, 194–222.
- Ma, Q., Wood, T.K., 2009. OmpA influences *Escherichia coli* biofilm formation by repressing cellulose production through the CpxRA two-component system. Environ. Microbiol. 11, 2735–2746. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02000.x
- Ma, Q., Yang, Z., Pu, M., Peti, W., Wood, T.K., 2011a. Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. Environ. Microbiol. 13, 631–642. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02368.x
- Ma, Q., Zhang, G., Wood, T.K., 2011b. *Escherichia coli* BdcA controls biofilm dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* and *Rhizobium meliloti*. BMC research notes, 4(1), 447.
- Macfarlane, S., Furrie, E., Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., 2004. Chemotaxonomic analysis of bacterial populations colonizing the rectal mucosa in patients with ulcerative colitis. Clinical Infectious Diseases 38, 1690–1699.
- Macfarlane, S., Furrie, E., Macfarlane, G.T., Dillon, J.F., 2007. Microbial Colonization of the Upper Gastrointestinal Tract in Patients with Barrett’s Esophagus. Clinical Infectious Diseases 45, 29–38. doi:10.1086/518578
- Mah, T.F., O’Toole, G.A., 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 9, 34–39.
- Mai-Prochnow, A., Lucas-Elio, P., Egan, S., Thomas, T., Webb, J.S., Sanchez-Amat, A., Kjelleberg, S., 2008. Hydrogen Peroxide Linked to Lysine Oxidase Activity Facilitates Biofilm Differentiation and Dispersal in Several Gram-Negative Bacteria. J Bacteriol 190, 5493–5501. doi:10.1128/JB.00549-08
- Mann, S., Chen, Y.-P.P., 2010. Bacterial genomic G+C composition-eliciting environmental adaptation. Genomics 95, 7–15. doi:10.1016/j.ygeno.2009.09.002
- Marcato-Romain, C.E., Pechaud, Y., Paul, E., Girbal-Neuhauser, E., Dossat-Létisse, V., 2012. Removal of microbial multi-species biofilms from the paper industry by enzymatic treatments. Biofouling 28, 305–314. doi:10.1080/08927014.2012.673122
- Marinus, M.G., Morris, N.R., 1973. Isolation of deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 114, 1143–1150.
- Marques, C.N.H., Davies, D.G., Sauer, K., 2015. Control of Biofilms with the Fatty Acid Signaling Molecule *cis*-2-decenoic Acid. Pharmaceuticals (Basel) 8, 816–835. doi:10.3390/ph8040816
- Marques, C.N.H., Morozov, A., Planzos, P., Zelaya, H.M., 2014. The fatty acid signaling molecule *cis*-2-decenoic acid increases metabolic activity and reverts persister cells to an antimicrobial-susceptible state. Appl. Environ. Microbiol. 80, 6976–6991. doi:10.1128/AEM.01576-14
- Marrie, T.J., Nelligan, J., Costerton, J.W., 1982. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. Circulation 66, 1339–1341.
- Matthysse, A.G., Deora, R., Mishra, M., Torres, A.G., 2008. Polysaccharides Cellulose, Poly-Beta-1,6-N-Acetyl-D-Glucosamine, and Colanic Acid Are Required for Optimal Binding of *Escherichia coli* O157:H7 Strains to Alfalfa Sprouts and K-12 Strains to Plastic but Not for Binding to Epithelial Cells. Applied and Environmental Microbiology 74, 2384–2390. doi:10.1128/AEM.01854-07
- Mayberry-Carson, K.J., Tober-Meyer, B., Lambe, D.W., Costerton, J.W., 1986. An electron microscopic study of the effect of clindamycin therapy on bacterial adherence and glycocalyx formation in experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. Microbios 48, 189–206.
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 2012. Should we stay or

- should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 39–50. doi:10.1038/nrmicro2695
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5, 607–625.
- Mlouka, M.A.B., Cousseau, T., Martino, P.D., 2016. Application of fluorescently labelled lectins for the study of polysaccharides in biofilms with a focus on biofouling of nanofiltration membranes. *ResearchGate* 3, 338–356. doi:10.3934/molsci.2016.3.338
- Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Ravaioli, S., Campoccia, D., Speziale, P., Arciola, C.R., 2011. Extracellular DNA in biofilms. *Int J Artif Organs* 34, 824–831. doi:10.5301/ijao.5000051
- Morgan, R., Kohn, S., Hwang, S.-H., Hassett, D.J., Sauer, K., 2006. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 7335–7343. doi:10.1128/JB.00599-06
- Mueller, L.N., de Brouwer, J.F.C., Almeida, J.S., Stal, L.J., Xavier, J.B., 2006. Analysis of a marine phototrophic biofilm by confocal laser scanning microscopy using the new image quantification software PHLIP. *BMC Ecol.* 6, 1. doi:10.1186/1472-6785-6-1
- Mutalik, V.K., Guimaraes, J.C., Cambray, G., Lam, C., Christoffersen, M.J., Mai, Q.-A., Tran, A.B., Paull, M., Keasling, J.D., Arkin, A.P., Endy, D., 2013a. Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. *Nat. Methods* 10, 354–360. doi:10.1038/nmeth.2404
- Mutalik, V.K., Guimaraes, J.C., Cambray, G., Mai, Q.-A., Christoffersen, M.J., Martin, L., Yu, A., Lam, C., Rodriguez, C., Bennett, G., Keasling, J.D., Endy, D., Arkin, A.P., 2013b. Quantitative estimation of activity and quality for collections of functional genetic elements. *Nat. Methods* 10, 347–353. doi:10.1038/nmeth.2403
- Nait Chabane, Y., Mlouka, M.B., Alexandre, S., Nicol, M., Marti, S., Pestel-Caron, M., Vila, J., Jouenne, T., Dé, E., 2014. Virstatin inhibits biofilm formation and motility of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiology* 14, 62. doi:10.1186/1471-2180-14-62
- Nancharaiyah, Y., Venugopalan, V., Wuertz, S., Wilderer, P., Hausner, M., 2005. Compatibility of the green fluorescent protein and a general nucleic acid stain for quantitative description of a *Pseudomonas putida* biofilm. *Journal of microbiological methods* 60, 179–187.
- Neidhardt, F.C. (Ed.), 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2 edition. ed. ASM Press, Washington, D.C.
- Netuschil, L., Auschill, T.M., Sculean, A., Arweiler, N.B., 2014. Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms--which stain is suitable? *BMC Oral Health* 14, 2. doi:10.1186/1472-6831-14-2
- Newell, P.D., Boyd, C.D., Sondermann, H., O'Toole, G.A., 2011. A c-di-GMP Effector System Controls Cell Adhesion by Inside-Out Signaling and Surface Protein Cleavage. *PLoS Biology* 9, e1000587. doi:10.1371/journal.pbio.1000587
- Ng, F.S.W., Wright, D.M., Seah, S.Y.K., 2011. Characterization of a phosphotriesterase-like lactonase from *Sulfolobus solfataricus* and its immobilization for disruption of quorum sensing. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1181–1186. doi:10.1128/AEM.01642-10
- Nguyen, M.H., Ojima, Y., Sakka, M., Sakka, K., Taya, M., 2014. Probing of exopolysaccharides with green fluorescence protein-labeled carbohydrate-binding module in *Escherichia coli* biofilms and flocs induced by *bcsB* overexpression. *J. Biosci. Bioeng.* 118, 400–405. doi:10.1016/j.jbiosc.2014.03.005
- Nichols, R.J., Sen, S., Choo, Y.J., Beltrao, P., Zietek, M., Chaba, R., Lee, S., Kazmierczak, K.M., Lee, K.J., Wong, A., Shales, M., Lovett, S., Winkler, M.E., Krogan, N.J., Typas, A., Gross, C.A., 2011. Phenotypic landscape of a bacterial cell. *Cell* 144, 143–156. doi:10.1016/j.cell.2010.11.052

- Nickel, J.C., Costerton, J.W., 1993. Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis. *Prostate* 23, 107–114.
- Nickel, J.C., Costerton, J.W., McLean, R.J., Olson, M., 1994. Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 33 Suppl A, 31–41.
- Nickel, J.C., Ruseska, I., Wright, J.B., Costerton, J.W., 1985. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* 27, 619–624.
- Nickerson, N.N., Mainprize, I.L., Hampton, L., Jones, M.L., Naismith, J.H., Whitfield, C., 2014. Trapped translocation intermediates establish the route for export of capsular polysaccharides across *Escherichia coli* outer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 8203–8208. doi:10.1073/pnas.1400341111
- Nielsen, P.H., Dueholm, M.S., Thomsen, T.R., Nielsen, J.L., Otzen, D., 2011. Functional Bacterial Amyloids in Biofilms, in: Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U. (Eds.), *Biofilm Highlights*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 41–62.
- Nieto, J.M., Bailey, M.J., Hughes, C., Koronakis, V., 1996. Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* haemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. *Mol. Microbiol.* 19, 705–713.
- Nijland, R., Hall, M.J., Burgess, J.G., 2010. Dispersal of Biofilms by Secreted, Matrix Degrading, Bacterial DNase. *PLOS ONE* 5, e15668. doi:10.1371/journal.pone.0015668
- Nutman, A.P., Bennett, V.C., Friend, C.R.L., Van Kranendonk, M.J., Chivas, A.R., 2016. Rapid emergence of life shown by discovery of 3,700-million-year-old microbial structures. *Nature* 537, 535–538. doi:10.1038/nature19355
- Ohnishi, K., Kutsukake, K., Suzuki, H., Iino, T., 1990. Gene *fliA* encodes an alternative sigma factor specific for flagellar operons in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* 221, 139–147.
- Okshevsky, M., Meyer, R.L., 2015. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 341–352. doi:10.3109/1040841X.2013.841639
- Olliver, A., Saggiaro, C., Herrick, J., Sclavi, B., 2010. DnaA-ATP acts as a molecular switch to control levels of ribonucleotide reductase expression in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 76, 1555–1571. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07185.x
- Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Mérida, H., Mazur, O., Bulone, V., Zimmer, J., 2013. BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 17856–17861. doi:10.1073/pnas.1314063110
- O’Toole, G.A., Kolter, R., 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295–304.
- O’Toole, G.A., Wong, G.C., 2016. Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 30, 139–146. doi:10.1016/j.mib.2016.02.004
- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F., Harshey, R.M., 2010. The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a “backstop brake” mechanism. *Mol. Cell* 38, 128–139. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.001
- Paulsen, I.T., Beness, A.M., Saier, M.H., 1997. Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology (Reading, Engl.)* 143 (Pt 8), 2685–2699. doi:10.1099/00221287-143-8-2685
- Pédelacq, J.-D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T.C., Waldo, G.S., 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24, 79–88. doi:10.1038/nbt1172

- Pratt, L.A., Kolter, R., 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 30, 285–293.
- Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T.T., Vidal, O., Lejeune, P., Dorel, C., 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ. Microbiol.* 2, 450–464.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., Lejeune, P., 1999. Abiotic Surface Sensing and Biofilm-Dependent Regulation of Gene Expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181, 5993–6002.
- Prüß, B.M., Besemann, C., Denton, A., Wolfe, A.J., 2006. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 3731–3739. doi:10.1128/JB.01780-05
- Purevdorj-Gage, B., Costerton, W.J., Stoodley, P., 2005. Phenotypic differentiation and seeding dispersal in non-mucoid and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 1569–1576. doi:10.1099/mic.0.27536-0
- Purnick, P.E.M., Weiss, R., 2009. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 410–422. doi:10.1038/nrm2698
- Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Fallahi, H., Heidari-Keshel, S., 2015. Dissection of the *cis*-2-decenoic acid signaling network in *Pseudomonas aeruginosa* using microarray technique. *Front Microbiol* 6, 383. doi:10.3389/fmicb.2015.00383
- Rahmani-Badi, A., Sepehr, S., Mohammadi, P., Soudi, M.R., Babaie-Naiej, H., Fallahi, H., 2014. A combination of *cis*-2-decenoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms. *J. Med. Microbiol.* doi:10.1099/jmm.0.075374-0
- Raina, S., Missiakas, D., Georgopoulos, C., 1995. The *rpoE* gene encoding the sigma E (sigma 24) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14, 1043–1055.
- Reid, A.N., Whitfield, C., 2005. Functional analysis of conserved gene products involved in assembly of *Escherichia coli* capsules and exopolysaccharides: evidence for molecular recognition between Wza and Wzc for colanic acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 187, 5470–5481. doi:10.1128/JB.187.15.5470-5481.2005
- Reid, G., Howard, J., Gan, B.S., 2001. Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol.* 9, 424–428.
- Ren, D., Bedzyk, L.A., Thomas, S.M., Ye, R.W., Wood, T.K., 2004. Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 515–524. doi:10.1007/s00253-003-1517-y
- Ren, D., Sims, J.J., Wood, T.K., 2001. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ. Microbiol.* 3, 731–736.
- Renner, L.D., Weibel, D.B., 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull* 36, 347–355. doi:10.1557/mrs.2011.65
- Reviewing computational methods, 2015. *Nat Meth* 12, 1099–1099. doi:10.1038/nmeth.3686
- Rex, D.K., Cummings, O.W., Shaw, M., Cumings, M.D., Wong, R.K.H., Vasudeva, R.S., Dunne, D., Rahmani, E.Y., Helper, D.J., 2003. Screening for Barrett’s esophagus in colonoscopy patients with and without heartburn. *Gastroenterology* 125, 1670–1677.
- Rhodijs, V.A., Suh, W.C., Nonaka, G., West, J., Gross, C.A., 2006. Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS Biol.* 4, e2. doi:10.1371/journal.pbio.0040002
- Rice, S.A., Koh, K.S., Queck, S.Y., Labbate, M., Lam, K.W., Kjelleberg, S., 2005. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J. Bacteriol.* 187, 3477–3485. doi:10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005
- Rice, S.A., Tan, C.H., Mikkelsen, P.J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J.S., Kjelleberg, S., 2009. The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas*

- aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. ISME J 3, 271–282. doi:10.1038/ismej.2008.109
- Roberts, T., 2007. WTP Estimates of the Societal Costs of U.S. Food-Borne Illness. American Journal of Agricultural Economics 89, 1183–1188. doi:10.1111/j.1467-8276.2007.01081.x
- Romero, R., Schaudinn, C., Kusanovic, J.P., Gorur, A., Gotsch, F., Webster, P., Nhan-Chang, C.-L., Erez, O., Kim, C.J., Espinoza, J., Gonçalves, L.F., Vaisbuch, E., Mazaki-Tovi, S., Hassan, S.S., Costerton, J.W., 2008. Detection of a microbial biofilm in intraamniotic infection. Am. J. Obstet. Gynecol. 198, 135.e1-5. doi:10.1016/j.ajog.2007.11.026
- Römling, U., 2002. Molecular biology of cellulose production in bacteria. Res. Microbiol. 153, 205–212.
- Römling, U., Amikam, D., 2006. Cyclic di-GMP as a second messenger. Curr. Opin. Microbiol. 9, 218–228. doi:10.1016/j.mib.2006.02.010
- Römling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M., 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 77, 1–52. doi:10.1128/MMBR.00043-12
- Römling, U., Gomelsky, M., Galperin, M.Y., 2005. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. Mol. Microbiol. 57, 629–639. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04697.x
- Ronkainen, J., Aro, P., Storskrubb, T., Johansson, S.-E., Lind, T., Bolling-Sternevald, E., Vieth, M., Stolte, M., Talley, N.J., Agréus, L., 2005. Prevalence of Barrett’s esophagus in the general population: an endoscopic study. Gastroenterology 129, 1825–1831. doi:10.1053/j.gastro.2005.08.053
- Rosenberg, A., Sinai, L., Smith, Y., Ben-Yehuda, S., 2012. Dynamic Expression of the Translational Machinery during *Bacillus subtilis* Life Cycle at a Single Cell Level. PLOS ONE 7, e41921. doi:10.1371/journal.pone.0041921
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Benziman, M., 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. Nature 325, 279–281.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.-W., Zhang, L.-H., Heeb, S., Cámara, M., Williams, P., Dow, J.M., 2006. Cell–cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. PNAS 103, 6712–6717. doi:10.1073/pnas.0600345103
- Ryjenkov, D.A., Simm, R., Römling, U., Gomelsky, M., 2006. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. J. Biol. Chem. 281, 30310–30314. doi:10.1074/jbc.C600179200
- Ryjenkov, D.A., Tarutina, M., Moskvina, O.V., Gomelsky, M., 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. J. Bacteriol. 187, 1792–1798. doi:10.1128/JB.187.5.1792-1798.2005
- Sambanthamoorthy, K., Sloup, R.E., Parashar, V., Smith, J.M., Kim, E.E., Semmelhack, M.F., Neiditch, M.B., Waters, C.M., 2012. Identification of small molecules that antagonize diguanylate cyclase enzymes to inhibit biofilm formation. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 5202–5211. doi:10.1128/AAC.01396-12
- Sammons, R.L., Kaur, D., Neal, P., 2004. Bacterial survival and biofilm formation on conventional and antibacterial toothbrushes. Biofilms 1, 123–130. doi:10.1017/S1479050504001334
- Sarmientos, P., Cashel, M., 1983. Carbon starvation and growth rate-dependent regulation of the *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters: differential control of dual promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 7010–7013.
- Sato, K., Obinata, K., Sugawara, T., Urabe, I., Yomo, T., 2006. A high-throughput method to quantify the structural properties of individual cell-sized liposomes by flow cytometry, in: International

- Workshop on Biologically Inspired Approaches to Advanced Information Technology. Springer, pp. 330–337.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140–1154.
- Sauer, K., Cullen, M., Rickard, A., Zeef, L., Davies, D., Gilbert, P., 2004. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *Journal of bacteriology* 186, 7312–7326.
- Sauer, K., Rickard, A.H., Davies, D.G., 2007. Biofilms and biocomplexity. *Microbe* 2, 347–353.
- Schaak, D.L., 2003. USA patent, 2006/0140911.
- Schembri, M.A., Kjærgaard, K., Klemm, P., 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 48, 253–267.
- Schidlowski, M., 1988. A 3,800-million-year isotopic record of life from carbon in sedimentary rocks. *Nature* 333, 313–318. doi:10.1038/333313a0
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M., 2005. The Ubiquitous Protein Domain EAL Is a Cyclic Diguanylate-Specific Phosphodiesterase: Enzymatically Active and Inactive EAL Domains. *J Bacteriol* 187, 4774–4781. doi:10.1128/JB.187.14.4774-4781.2005
- Schopf, J.W., Packer, B.M., 1987. Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. *Science* 237, 70–73.
- Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R., Hertel, W.M., 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* 27, 87–98. doi:10.1080/08927014.2010.542809
- Sepehr, S., Rahmani-Badi, A., Babaie-Naiej, H., Soudi, M.R., 2014. Unsaturated Fatty Acid, *cis*-2-decenoic Acid, in Combination with Disinfectants or Antibiotics Removes Pre-Established Biofilms Formed by Food-Related Bacteria. *PLoS ONE* 9, e101677. doi:10.1371/journal.pone.0101677
- Serra, D.O., Richter, A.M., Hengge, R., 2013. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J. Bacteriol.* 195, 5540–5554. doi:10.1128/JB.00946-13
- Shields, R.C., Mokhtar, N., Ford, M., Hall, M.J., Burgess, J.G., ElBadawey, M.R., Jakubovics, N.S., 2013. Efficacy of a marine bacterial nuclease against biofilm forming microorganisms isolated from chronic rhinosinusitis. *PLoS ONE* 8, e55339. doi:10.1371/journal.pone.0055339
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y., 1962. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223–239. doi:10.1002/jcp.1030590302
- Shirliff, M.E., Post, J.C., Ehrlich, G.D., 2012. Bill Costerton: leader as servant. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 66, 269–272. doi:10.1111/1574-695X.12011
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., Römling, U., 2004. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol. Microbiol.* 53, 1123–1134. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04206.x
- Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J., Greenberg, E.P., 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407, 762–764. doi:10.1038/35037627
- Singh, R., Paul, D., Jain, R.K., 2006. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology* 14, 389–397. doi:10.1016/j.tim.2006.07.001
- Sintim, H.O., Smith, J.A.I., Wang, J., Nakayama, S., Yan, L., 2010. Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules. *Future Med Chem* 2, 1005–1035. doi:10.4155/fmc.10.185
- Sneppen, K., Dodd, I.B., Shearwin, K.E., Palmer, A.C., Schubert, R.A., Callen, B.P., Egan, J.B., 2005.

- A mathematical model for transcriptional interference by RNA polymerase traffic in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 346, 399–409. doi:10.1016/j.jmb.2004.11.075
- Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I., 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* 18, 96–104. doi:10.1016/j.mib.2014.02.008
- Solano, C., García, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., Casals, J., Pedroso, E., Lasa, I., 2009. Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *PNAS* 106, 7997–8002. doi:10.1073/pnas.0812573106
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Gamazo, C., Lasa, I., 2002. Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.* 43, 793–808.
- Song, F., Koo, H., Ren, D., 2015. Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *J DENT RES* 22034515587690. doi:10.1177/0022034515587690
- Southey-Pillig, C.J., Davies, D.G., Sauer, K., 2005. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* 187, 8114–8126. doi:10.1128/JB.187.23.8114-8126.2005
- Staley, J.T., Lory, S., 2007. *Microbial life*. Sinauer Sunderland, MA.
- Sternberg, C., Christensen, B.B., Johansen, T., Nielsen, A.T., Andersen, J.B., Givskov, M., Molin, S., 1999. Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4108–4117.
- Steunou, A.S., Liotenberg, S., Soler, M.-N., Briandet, R., Barbe, V., Astier, C., Ouchane, S., 2013. EmbRS a new two-component system that inhibits biofilm formation and saves *Rubrivivax gelatinosus* from sinking. *Microbiologyopen* 2, 431–446. doi:10.1002/mbo3.82
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., Reeves, P.R., 1996. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J. Bacteriol.* 178, 4885–4893.
- Stewart, P.S., 2003. Diffusion in Biofilms. *J. Bacteriol.* 185, 1485–1491. doi:10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 199–210. doi:10.1038/nrmicro1838
- 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. *Environ. Microbiol.* 1, 447–455.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J.D., Lappin-Scott, H.M., Costerton, J.W., 2001. Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67, 5608–5613. doi:10.1128/AEM.67.12.5608-5613.2001
- Sutherland, I.W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading, Engl.)* 147, 3–9. doi:10.1099/00221287-147-1-3
- Sutherland, I.W., 1982. Microbial exopolysaccharides-their role in microbial adhesion in aqueous systems. *CRC Critical reviews in microbiology* 10, 173–201.
- Sutherland, I.W., 1994. Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. *Biotechnology Advances* 12, 393–448. doi:10.1016/0734-9750(94)90018-3
- Tahmourespour, A., Kermanshahi, R.K., 2011. The effect of a probiotic strain (*Lactobacillus acidophilus*) on the plaque formation of oral *Streptococci*. *Bosn J Basic Med Sci* 11, 37–40.
- Tait, K., Skillman, L., Sutherland, I.W., 2002. The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm

- eradication. *Biofouling* 18, 305–311.
- Teal, T.K., Lies, D.P., Wold, B.J., Newman, D.K., 2006. Spatiometabolic Stratification of *Shewanella oneidensis* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7324–7330. doi:10.1128/AEM.01163-06
- Teiber, J.F., Horke, S., Haines, D.C., Chowdhary, P.K., Xiao, J., Kramer, G.L., Haley, R.W., Draganov, D.I., 2008. Dominant role of paraoxonases in inactivation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone. *Infect. Immun.* 76, 2512–2519. doi:10.1128/IAI.01606-07
- 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. *J. Bacteriol.* 188, 2681–2691. doi:10.1128/JB.188.7.2681-2691.2006
- Tijhuis, L., Pluym, L.P.M. van der, Loosdrecht, M.C.M. van, Heijnen, J.J., 1992. Formation of Biofilms on Small Suspended Particles in Airlift Reactors. *Water Science and Technology* 26, 2015–2019.
- Tischler, A.D., Camilli, A., 2004. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 53, 857–869. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04155.x
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., Andersen, J.B., Jacobsen, C.S., Molin, S., 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J. Bacteriol.* 182, 6482–6489.
- Tolker-Nielsen, T., Sternberg, C., 2011. Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr Protoc Microbiol* Chapter 1, Unit 1B.2. doi:10.1002/9780471729259.mc01b02s21
- Tuson, H.H., Weibel, D.B., 2013. Bacteria-surface interactions. *Soft Matter* 9, 4368–4380. doi:10.1039/C3SM27705D
- Uhlich, G.A., Cooke, P.H., Solomon, E.B., 2006. Analyses of the Red-Dry-Rough Phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 Strain and Its Role in Biofilm Formation and Resistance to Antibacterial Agents. *Appl Environ Microbiol* 72, 2564–2572. doi:10.1128/AEM.72.4.2564-2572.2006
- Vaïtilingom, M., Deguillaume, L., Vinatier, V., Sancelme, M., Amato, P., Chaumerliac, N., Delort, A.M., 2013. Potential impact of microbial activity on the oxidant capacity and organic carbon budget in clouds. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 559–564.
- Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 156, 626–633. doi:10.1016/j.resmic.2005.02.005
- Van Kranendonk, M.J., Philippot, P., Lepot, K., Bodorkos, S., Pirajno, F., 2008. Geological setting of Earth's oldest fossils in the ca. 3.5 Ga Dresser Formation, Pilbara Craton, Western Australia. *Precambrian Res* 167: 93-124. *ResearchGate* 167, 93–124. doi:10.1016/j.precamres.2008.07.003
- Veiga, M.C., Jain, M.K., Wu, W., Hollingsworth, R.I., Zeikus, J.G., 1997. Composition and Role of Extracellular Polymers in Methanogenic Granules. *Appl Environ Microbiol* 63, 403–407.
- Vorregaard, M., 2008. Comstat2-a modern 3D image analysis environment for biofilms. Technical University of Denmark, DTU, DK-2800 Kgs. Lyngby, Denmark.
- Walter, M.R., Buick, R., Dunlop, J.S.R., 1980. Stromatolites 3,400–3,500 Myr old from the North Pole area, Western Australia.
- Wang, R., Khan, B.A., Cheung, G.Y.C., Bach, T.-H.L., Jameson-Lee, M., Kong, K.-F., Queck, S.Y., Otto, M., 2011. *Staphylococcus epidermidis* surfactant peptides promote biofilm maturation and dissemination of biofilm-associated infection in mice. *J Clin Invest* 121, 238–248. doi:10.1172/JCI42520
- Wang, X., Dubey, A.K., Suzuki, K., Baker, C.S., Babitzke, P., Romeo, T., 2005. CsrA post-transcriptionally represses *pgaABCD*, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 56, 1648–1663. doi:10.1111/j.1365-

2958.2005.04648.x

- Wang, X., Preston, J.F., Romeo, T., 2004. The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J. Bacteriol.* 186, 2724–2734.
- Wang, Y., Andole Pannuri, A., Ni, D., Zhou, H., Cao, X., Lu, X., Romeo, T., Huang, Y., 2016. Structural Basis for Translocation of a Biofilm-supporting Exopolysaccharide across the Bacterial Outer Membrane. *J. Biol. Chem.* 291, 10046–10057. doi:10.1074/jbc.M115.711762
- Webb, J.S., Thompson, L.S., James, S., Charlton, T., Tolker-Nielsen, T., Koch, B., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2003. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 185, 4585–4592.
- Wehland, M., Bernhard, F., 2000. The RcsAB box. Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *J. Biol. Chem.* 275, 7013–7020.
- Wei, B.L., Brun-Zinkernagel, A.M., Simecka, J.W., Prüß, B.M., Babitzke, P., Romeo, T., 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 40, 245–256.
- Wenzel, R.P., 2007. Health care-associated infections: major issues in the early years of the 21st century. *Clin. Infect. Dis.* 45 Suppl 1, S85–88. doi:10.1086/518136
- Whitfield, C., 2006. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annual Review of Biochemistry* 75, 39–68. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545
- Whitfield, C., Paiment, A., 2003. Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr. Res.* 338, 2491–2502.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6578–6583.
- Wolcott, R.D., Rhoads, D.D., Bennett, M.E., Wolcott, B.M., Gogokhia, L., Costerton, J.W., Dowd, S.E., 2010. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J Wound Care* 19, 45–46, 48–50, 52–53. doi:10.12968/jowc.2010.19.2.46966
- Wood, T.K., 2009. Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environ. Microbiol.* 11, 1–15. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01768.x
- Wood, T.K., González Barrios, A.F., Herzberg, M., Lee, J., 2006. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 361–367. doi:10.1007/s00253-005-0263-8
- Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Molin, S., Givskov, M., Høiby, N., 2004. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 1054–1061. doi:10.1093/jac/dkh223
- Wuertz, S., Bishop, P.L., Wilderer, P.A. (Eds.), 2003. *Biofilms in wastewater treatment: an interdisciplinary approach.* IWA Publ, London.
- Yamamoto, N., Nakahigashi, K., Nakamichi, T., Yoshino, M., Takai, Y., Touda, Y., Furubayashi, A., Kinjyo, S., Dose, H., Hasegawa, M., Datsenko, K.A., Nakayashiki, T., Tomita, M., Wanner, B.L., Mori, H., 2009. Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants. *Mol. Syst. Biol.* 5, 335. doi:10.1038/msb.2009.92
- Yamamoto, T., Izumi, S., Gekko, K., 2006. Mass spectrometry of hydrogen/deuterium exchange in 70S ribosomal proteins from *E. coli*. *FEBS Lett.* 580, 3638–3642. doi:10.1016/j.febslet.2006.05.049
- Yang, L., Rybtke, M.T., Jakobsen, T.H., Hentzer, M., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2009. Computer-Aided Identification of Recognized Drugs as *Pseudomonas aeruginosa*

- Quorum-Sensing Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2432–2443. doi:10.1128/AAC.01283-08
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. doi:10.1186/1471-2105-13-134
- Yee, D.C., Maynard, J.A., Wood, T.K., 1998. Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene ortho-monooxygenase constitutively. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 112–118.
- Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M.G., Alon, U., 2006. A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat. Methods* 3, 623–628. doi:10.1038/nmeth895
- Zhang, X., Bishop, P.L., Kupferle, M.J., 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology* 37, 345–348. doi:10.1016/S0273-1223(98)00127-9
- Zhang, X., Bremer, H., 1996. Effects of Fis on ribosome synthesis and activity and on rRNA promoter activities in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 259, 27–40. doi:10.1006/jmbi.1996.0299

Annexes

Annexe 1. Caractéristiques des amorces utilisées dans ces travaux	180
Annexe 2. Régions promotrices des gènes <i>wza</i> , <i>bdcA</i> et <i>fliC</i>	181
Annexe 3. Protocole de préparation des cellules chimio-compétentes	182
Annexe 4. Protocole de préparation des cellules électro-compétentes portant le plasmide pKD46 ...	183
Annexe 5. Composition du milieu de culture SOC.....	184
Annexe 6. Caractéristiques hydrodynamiques de la cellule de flux ibidi®	185
Annexe 7. Propriétés spectrales des fluorophores utilisés dans ces travaux	186

Annexe 1. Caractéristiques des amorces

Nom	Séquence 5'→3'	Taille (pb)	GC (%)	T _m th (°C)	T _m ^{obs} (°C)	Utilisation
For_bdcA_XmaI	ATA CCCGGG GCGGCGTGATAATATTGAAC	29	52	58	56	Amplification du promoteur par PCR
Rev_bdcA_XbaI	ACT TCTAG AGATGAGAACTGTCTTACCTG	29	41	54	53/56	Amplification du promoteur et vérifications par PCR
For_fliC_XmaI	ATA CCCGGG GATCGGCTTTAGACAATGCAG	30	53	59	56	Amplification du promoteur par PCR
Rev_fliC_XbaI	ACT TCTAG AGATTCGTTATCCTATATTGCAAGTC	34	35	55	53/56	Amplification du promoteur et vérifications par PCR
For2_fliC_XmaI	ATA CCCGGG ATCCAGACCTGACCCGACTCCC	31	65	65	56	Amplification du promoteur par PCR
Rev2_fliC_XbaI	ACT TCTAG ACGACAGCGCAGACTGGTT	27	52	56	53/56	Amplification du promoteur et vérifications par PCR
Rev3_fliC_XbaI	AC TCTAG AACTCGACAGCGCAGACTGGTT	31	52	59	53/56	Amplification du promoteur et vérifications par PCR
For_wza_XmaI	ATT CCCGGG TTTAAGAAATATCGCATGTGGAGAC	34	44	58	56	Amplification du promoteur par PCR
Rev_wza_XbaI	ACT TCTAG ATTGGCAGAGTAATTATCCTGTGC	32	43	53	53/56	Amplification du promoteur et vérifications par PCR
Verify_pKK	CCCCGAAAAGTGCCAC	16	63	54	53	Vérification insertion dans pKK par PCR
GFPmut2R	AGGGTAAGTTTTCCGTATGTTGCA	24	42	59	-	Vérification séquence dans pKK par séquençage
pDOCK_R	TCCAGCCAATTGACCGGTCCTA	22	55	62	56	Vérification insertion dans pDOCK par PCR et séquençage
aidBF	GAATGATTTATTGCTGCGGGCGACGGGGGAGTGTGTGTG TAAGCGTATACCA ACTCAGCTTCCTTTCG	69	52	77	60	Insertion en ori3 par PCR et recombinaison homologue
aidBR	CAATTTTCACATATTTTCATTTAGTTAATCGAAACCAGCGTC GCATCAGTCGAT GAGCTCGAGATATGAATATC	73	37	70	60	Insertion en ori3 par PCR et recombinaison homologue
aidBF3	CGCGGTTTCGTCGTTTACAGC	20	60	60	67	Vérification insertion en ori3 par PCR
aidBR3	ATGAACAATGCCGGATGCCG	20	55	60	67	Vérification insertion en ori3 par PCR
CC1	CTTAAGTTCTACGTGTTCCGC	21	48	55	-	Vérification séquence en ori3 par séquençage

Annexe 1. Caractéristiques des amorces utilisées dans ces travaux. T_mth est la température de fusion de l'amorce et T_m^{obs} celle(s) effectivement utilisée(s) lors des PCR. Les amorces sens conçues au cours de ces travaux ont un nom commençant par « For », les amorces antisens par « Rev ». Les séquences de restriction enzymatique sont indiquées en **rouge** pour XmaI et en **bleu** pour XbaI. Pour les amorces aidBF et aidBR, la séquence en **gras** s'hybride au pDOCK, celle non en gras s'hybride au chromosome bactérien.

Annexe 2. Régions promotrices des gènes *wza*, *bdcA* et *fliC*

<p>A</p> <p>>EG13566 <i>wza</i> Colanic acid export channel lipoprotein</p> <p>5' A TTTAAGAAATATCGCATGTGGAGAC ACTATATTAATATTGTCAACC TAAAGAACTCCTAA AAACCAT ATTGAATGAC ACTTA ATATAATTCTAAAAATAGCCAATTACCGAATTGTTATCTTGCCTGCTATTCCGTAGCTGTAACACTTCCTCTGCA TTATTGGAAAGCCAATATTCAATTACCATAATGTACCTTATATTCGGAAGTAAATTTCCGTAATAACCCTTTCTCATCAACG ACTGCATGCTGAGAGGGTGTGAAAAATTAACATAAATCAGTGTATTGGTAGCTAAAAAGCCAGGGGCGGTAGCGTGTCT GGATGCCTGAAAGACCAGTCTGAATTATTCTGTCAATAGCCTGCGGATGAAATCAATTTTTTAGGACTGATGCCAGTTAA ATTTTTATTCAATTAAGTCAAGGTAAATGTGCATGGCGACATTGCTATTAATAGT GCACAGGATAACTCTGCCAA AGT GATAAATAACAATGATGAAA3'</p> <p align="center"> RcsAB binding site Forward primer binding site Reverse primer binding site </p>
<p>B</p> <p>>EG12528 <i>bdcA</i> c-di-GMP-binding biofilm dispersal mediator protein</p> <p>5' AGTCATAAATGGTCGTTTCT GCGGCGTGATAATATTGAAC GGCAATATCACGCGCTGTGGATCATGACTATGAATACCT TCAAGAACCATACAGCCAGCGCAGCCGCCGTTTTGGCTATATCTGCGCGCCGCTCTTTTAATACCTCAACCAGGCACTCGC CTACCGGACGATCATCACGAAGAATATCGGCAAGCGGAATAGCTTCCGTACCGACGTATTCATTGAGTACACGGCTAAATA ACCCAGCTTTACTGCCAAAAGCCGCGTAGAGGCTCGGGGGTTAATACCAAGATAATCAGTAACTTCAGCAACACTGACA GCATCGAAACCTTTTTGGTAAAAAGCACTTTGCCGAGAGATTGCCTGCTCAGGAGCGAAACGTCTGGGACGACCTGG AACGCGAGATTGTTTTTAGTGACCATTACAAAACCTGTTGACAGAAAGT TAAAA CAGTTTTG TAATGCATGTT ACATAATA AATCAAGGAGTCCTTATG GGGCGCTTTA CAGGTAAGACAGTTCTCATC CTCGGTGGCAGTCGTGGTATCGGTGCC3'</p> <p align="center"> NsrR binding site Forward primer binding site Reverse primer binding site </p>
<p>C</p> <p>>EG10321 <i>fliC</i> Flagellin, structural gene, H-antigen</p> <p>5' TGCTGCTGGTGGTGTGGTGGCGGAAAAA GATCGGCTTAGACAATGCAG TATTGGCGGTCTGGAAAGTCGTCAGCG CGCTTTTCAGCGTACCGTAGGCGCTAAGTTAGCGGTAACGACGATTGCTGATTTGAAATGGGGGTTAGCGTCGCTTTTT GCGCGGCGGTGAGGCTATCAAGGATGGAACCTAAATCCAGACCTGACCCGACTCCAGCGATGAAATACTTGCCATGCGA TTTCTTTTATCTTTCGACACGTAAAACGAATACCGGGGTTATCGGTCTGAATTGCGCAAAGTTACGTTAATTGTTTTTT TAATAGCGGAATAAGG GGCAGAGAAAA GAGTATTCGGCGACTA AAAAAAATGGCTGTTTTGAAAAAATTCTAAAG GTTGTTTTACGACAGACGATAACAGGGTTGACGGCGATTGAGCCGACGGGTGAAACCAATACGTAATCAAC GACTTGC AATATAGGATAACGAATC ATGGCACA3'</p> <p align="center"> FlhDC binding site Forward primer binding site Reverse primer binding site </p>

Annexe 2. Régions promotrices des gènes *wza* (A), *bdcA* (B) et *fliC* (C) pour la conception des amorces d'amplification par PCR. Les +1 de transcription ainsi que les codons initiateurs sont indiqués en gras, les boîtes -10 et -35 sont soulignées. Les sites de fixation des régulateurs sont surlignés en rose, ceux des amorces sens en jaune et ceux des amorces antisens en vert.

Annexe 3. Protocole de préparation des cellules chimio-compétentes

1. Préculture

Lancer une préculture des souches à rendre chimio-compétentes dans du milieu LB à 37°C avec agitation à 180 rpm.

2. Dilution de la préculture

Le lendemain, faire une dilution au 100^{ème} des précultures dans du milieu LB ; le volume choisi sera suffisant pour le nombre d'aliquotes de cellules chimio-compétentes voulu. Aide expérimentale : une culture de 100 mL donnera 8 mL de cellules chimio-compétentes, soit 40 aliquotes de 200 µL.

3. Reprise de la croissance et contrôle de la DO à 600 nm

Incuber les souches diluées à 37°C avec agitation à 180 rpm et mesurer régulièrement la DO à 600 nm jusqu'à atteindre la valeur souhaitée. Celle-ci doit être comprise entre 0,3 et 0,6, avec un optimum entre 0,4 et 0,55.

4. Arrêt de la croissance et incubation dans les tampons actifs

Une fois la DO_{600nm} optimale atteinte, transvaser les cultures dans des tubes de centrifugation (de 15 mL ou de 50 mL selon le volume) préalablement refroidis et incuber 15 min dans la glace. À partir d'ici, il est important que le protocole soit effectué à 4°C. Suivre les étapes suivantes :

- Centrifuger les cellules 15 min à 3000 rpm à 4°C.
- Vider le surnageant.
- Resuspendre délicatement les cellules dans le tampon RF1 préalablement refroidi. Le volume de tampon RF1 ajouté correspond au 1/3 du volume de la culture. NE PAS RESUSPENDRE AU VORTEX.
- Incuber 1 h dans la glace.
- Centrifuger les cellules 15 min à 3000 rpm à 4°C.
- Vider le surnageant.
- Resuspendre délicatement les cellules dans le tampon RF2 préalablement refroidi. Le volume de tampon RF2 ajouté correspond au 1/12,5 du volume de la culture. NE PAS RESUSPENDRE AU VORTEX.
- Incuber 15 min dans la glace.
- Aliquoter les cellules par 200 µL dans des microtubes préalablement refroidis.

Tampon RF1		
Composant	Quantité pour 1 L	Concentration finale
RbCl	12 g	100 mM
MnCl ₂ · 4H ₂ O	9,9 g	50 mM
CH ₃ CO ₂ K	30 mL de stock à 1 M (pH 7,5)	35 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,5 g	10 mM
Glycérol	150 g	15 % (w/v)
Ajuster le pH à 5,8 avec de l'acide acétique à 0,2 M.		

Tampon RF2		
Composant	Quantité pour 1 L	Concentration finale
CaCl ₂ · 2H ₂ O	11 g	75 mM
RbCl	1,2 g	10 mM
MOPS	20 mL de stock à 0,5 M	10 mM
Glycérol	150 g	15 % (w/v)
Ajuster le pH à 6,8 avec NaOH.		

Les tampons RF1 et RF2 sont stérilisés par filtration à 0,2 µm.

5. Congélation et stockage

Congeler les aliquotes dans de l'azote liquide ou dans un bain de glace carbonique avec alcool, et stocker les cellules chimio-compétentes à -80°C.

Annexe 4. Protocole de préparation des cellules électro-compétentes portant le plasmide pKD46

1. Préculture

Lancer une préculture de la souche BW25113 (*araD*⁻) portant le plasmide pKD46 à rendre électro-compétente dans du milieu LB supplémenté en Amp (100 µg/mL) à 30°C avec agitation à 150 rpm.

2. Dilution de la préculture

Le lendemain, faire une dilution au 100^{ème} de la préculture dans 100 mL de milieu LB préchauffé et supplémenté en Amp (100 µg/mL).

3. Reprise de la croissance et contrôle de la DO à 600 nm

Incuber la souche diluée à 30°C avec agitation à 150 rpm et mesurer régulièrement la DO à 600 nm. Celle-ci doit atteindre au minimum 0,4 et ne doit pas dépasser 0,6.

4. Induction de la λ Red recombinaise

Une fois la DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6, ajouter 3 mL de L-arabinose à 10 % préchauffé et fraîchement préparé. Ceci permet d'induire l'expression de l'opéron de la λ Red recombinaise qui est sous le contrôle du promoteur *P_{araB}*. L'incubation est poursuivie 1 h à 37°C avec agitation à 150 rpm.

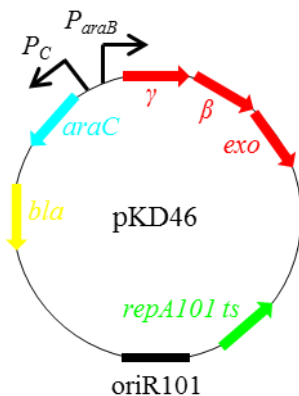
5. Arrêt de la croissance et lavage des cellules

La culture est ensuite transvasée dans des tubes de centrifugation de 50 mL préalablement refroidis et incubée 15 min dans la glace. À partir d'ici, il est important que le protocole soit effectué à 4°C. Suivre les étapes suivantes :

- Centrifuger les cellules 10 min à 3000 rpm à 4°C.
- Laver les cellules deux fois avec 50 mL d'eau distillée et déionisée et une fois avec du glycérol à 10 %.
- Le dernier culot de cellules est repris dans du glycérol à 10 % de façon à ce qu'une dilution au 100^{ème} des cellules donne une DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,6.
- Incuber 1 h dans la glace.
- Aliquoter les cellules par 100 µL dans des microtubes préalablement refroidis.

6. Congélation et stockage

Congeler les aliquotes dans de l'azote liquide et stocker les cellules électro-compétentes à -80°C.



Représentation schématique du plasmide pKD46 (reproduite d'après les travaux de Datsenko et Wanner, 2000). Les caractéristiques du plasmide sont les suivantes : oriR101 est l'origine de répllication température-dépendante, *repA101 ts* est un gène codant pour une protéine de répllication du plasmide, γ , β et *exo* sont les gènes codant pour l'activité de la λ Red recombinaise, *araC* est le gène codant pour un activateur transcriptionnel du régulon *ara* et *bla* est un gène conférant une résistance à l'ampicilline.

Annexe 5. Composition du milieu de culture SOC

Le milieu de culture SOC correspond à 1 L de milieu de culture SOB stérile auquel sont ajoutés 10 mL d'une solution stérile de $MgCl_2$ à 1 M et 20 mL d'une solution stérile de glucose à 1 M. Le tableau suivant détaille la composition du milieu de culture SOB.

Milieu SOB	
Composant	Quantité pour 1 L
Tryptone	20 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	0,5 g
KCl	2,5 mL de stock à 1 M
Ajuster le pH à 7 avec NaOH.	

Le milieu SOB et la solution de $MgCl_2$ sont stérilisés par autoclavage de 30 min à 120°C alors que la solution de glucose est rendue stérile par filtration à 0,2 μm .

Annexe 6. Caractéristiques hydrodynamiques de la cellule de flux ibidi®

Les informations présentées dans cette annexe sont issues du manuel constructeur ibidi® « Shear stress and shear rates for all channel μ -Slides – based on numerical applications ».

Formulas for shear stress and shear rate for the μ -Slide VI^{0.4} channel:

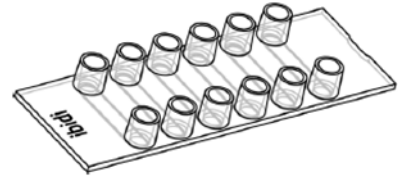
The shear stress is based on the dynamical viscosity η of water at 22 °C ($\eta = 0.01 \text{ dyn}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$). Φ is the flow rate, τ is the shear stress and γ is the shear rate.

Shear stress

$$\tau \left[\frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2} \right] = 1.761 \Phi \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right]$$

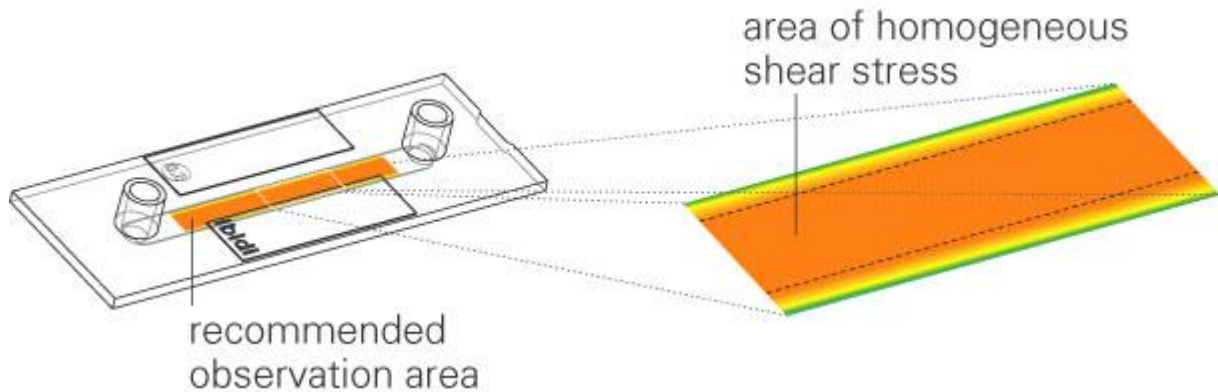
Shear rate

$$\gamma \left[\text{s}^{-1} \right] = 176.1 \Phi \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right]$$



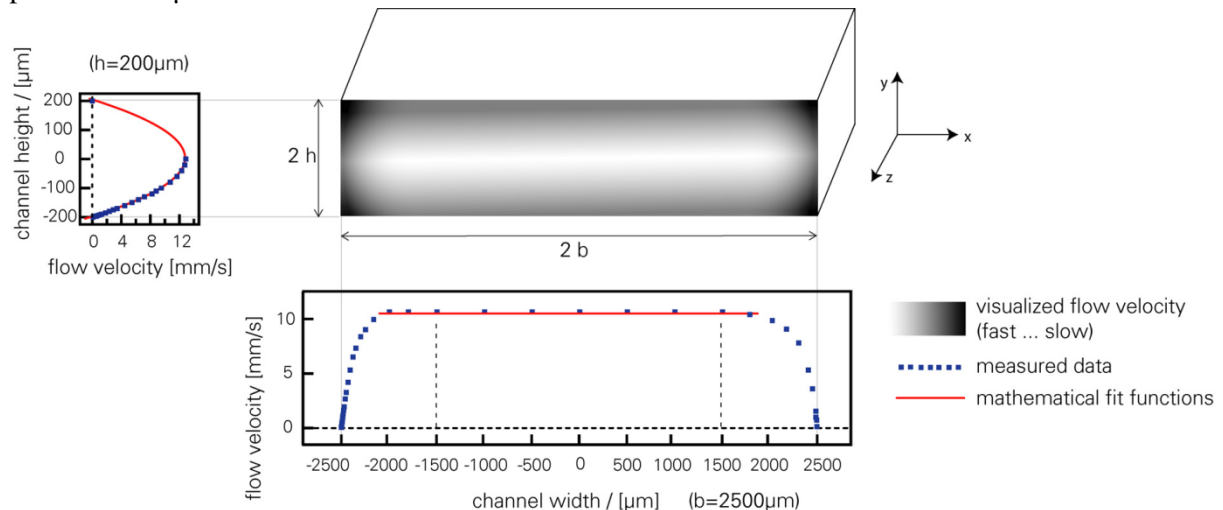
Area of homogeneous shear stress:

All shear stress calculations are valid in the large area of width only. Side effects near the wall are ignored. Observations should be done at least in a distance comparable to the channel height. For example if the channel has a height of 400 μm the observation area showing a homogeneous flow profile will be about 400 μm from the side walls in the center region of the channel (orange area).



Flow profile in y-direction:

All our channel slides are characterized by parabola shaped flow profiles in y-direction. The flow profile inside μ -Slide I^{0.4} Luer is shown below.



Annexe 7. Propriétés spectrales des fluorophores

Les propriétés spectrales des fluorophores utilisés dans ces travaux sont présentées dans le tableau suivant.

Fluorophores	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ (cm ⁻¹ .M ⁻¹)	RQ
SYTO9	485	498	> 50 000	0,58
SYTO61	628	645	ND	0,18
ConA/Alexa Fluor[®] 488	495	519	73 000	0,92
WGA/Alexa Fluor[®] 633	632	647	159 000	ND
IP	535	617	ND	ND
GFPmut2	481	507	31 800*	ND

λ_{abs} est la longueur d'onde maximale d'absorption et λ_{em} celle d'émission. ϵ est le coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde maximale d'absorption. RQ est le rendement quantique. ND indique que la caractéristique est non déterminée. *Le coefficient d'extinction molaire de la GFPmut2 a été déterminé à 280 nm (Sato et al, 2006).

« Le bonheur n'est qu'une question de seuillage : en abaissant notre limite de détection, on y est plus sensible. »

Titre : Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms.

Mots clés : biofilm, dispersion, rapporteurs génétiques, microfluidique, microscopie confocale à balayage laser

Résumé : Les biofilms sont des communautés de microorganismes adhérant à une surface et encastrées dans une substance polymérique produite par les cellules du système, dite matrice extracellulaire. Du fait de leur nature ubiquitaire, les biofilms colonisent de nombreux environnements et causent souvent de sérieux problèmes dans les secteurs de la santé et de l'industrie. La dispersion par ajout d'agent chimique est l'une des stratégies de lutte contre les biofilms. Un acide gras, l'acide *cis*-2-décénoïque (CDA), semble être prometteur pour ce faire, grâce à l'étendue de son action dispersante sur les espèces et règnes du vivant. L'objectif de ce travail de thèse est d'investiguer les mécanismes de dispersion des biofilms de l'espèce bactérienne *Escherichia coli* (*E. coli*) par la molécule modèle CDA. Le CDA modifie-t-il les structures du biofilm ou induit-il une réponse génétique des bactéries lors de la dispersion ? Pour répondre à ces questions, la dispersion des biofilms d'*E. coli* a été étudiée *in situ* dans des chambres microfluidiques par microscopie confocale à balayage laser (CLSM). Des souches bactériennes spécifiques ont été construites par clonage de promoteurs d'intérêt en fusion transcriptionnelle avec un gène codant pour une protéine fluorescente verte. Les résultats confirment l'activité dispersante du CDA avec une réduction significative de la biomasse, de l'épaisseur moyenne et de l'aire de recouvrement par couche du biofilm. Un outil innovant d'analyse d'images CLSM a été développé en collaboration dans le but de déterminer les propriétés structurales du biofilm et l'intensité de fluorescence *in situ* du rapporteur étudié. Les résultats indiquent une augmentation de l'intensité moyenne de fluorescence des biofilms après dispersion avec le CDA, au niveau global en considérant tout le biofilm et au niveau local en considérant une segmentation du biofilm en microcolonies, ainsi qu'en profondeur. Ces résultats évoquent un changement d'expression génique des bactéries en présence de CDA. Par ailleurs, les résultats montrent que le CDA ne semble pas avoir d'effet en culture planctonique, ni sur la croissance bactérienne ni sur l'activité des promoteurs sélectionnés. Ceci suggère que les effets du CDA sont biofilm-dépendants.

Title: Characterization of bacterial adaptation upon biofilm dispersion by the coupling of genetic reporters and the delivery of an active molecule.

Keywords: biofilm, dispersion, genetic reporters, microfluidic, confocal laser scanning microscopy

Abstract: Biofilms are microbial communities adhering to a surface and embedded in a self-produced polymeric substance, called extracellular matrix. By being ubiquitous in nature, biofilms colonize numerous environments, and they often cause serious problems for both health and industry sectors. Dispersion is one of the strategies for fighting biofilms. A fatty acid, *cis*-2-decenoic acid (CDA), seems to be promising for dispersing biofilms by the extent of its action on different species of microbes. The aim of this thesis work is to investigate the mechanisms of biofilm dispersion of the bacterial species *Escherichia coli* (*E. coli*) by the model molecule CDA. Does CDA modify the biofilm structures or does it induce a genetic response from bacteria during dispersion? To answer these questions, *E. coli* biofilm dispersal has been studied *in situ* in microfluidic chambers by confocal laser scanning microscopy (CLSM). Specific bacterial strains have been developed by cloning promoters of interest in transcriptional fusion with a gene encoding for a green fluorescent protein. The results confirm the dispersing activity of CDA with a significant decrease of biomass, biofilm average thickness and area over biofilm depth. A novel tool for analyzing CLSM images has been developed in collaboration in order to measure the biofilm structural properties as a function of *in situ* fluorescence intensity of the studied reporter. The results indicate an increase in the mean fluorescence intensity of the biofilms after dispersion with CDA, at a global level for the whole biofilm and at a local scale by considering a biofilm segmentation into microcolonies. These results evoke a change in gene expression by bacteria in the presence of CDA. Furthermore, the results show that CDA does not seem to have an effect on planktonic bacteria, neither on the bacterial growth nor on the activity of the selected promoters. This suggests that the CDA effects are biofilm-dependent.

