



HAL
open science

Résilience aux antibiotiques de biofilms bactériens : concepts, modélisation et expérimentation

Gabriel Carvalho

► **To cite this version:**

Gabriel Carvalho. Résilience aux antibiotiques de biofilms bactériens : concepts, modélisation et expérimentation. Bio-informatique [q-bio.QM]. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2017. Français. NNT : 2017CLFAC068 . tel-01787183

HAL Id: tel-01787183

<https://theses.hal.science/tel-01787183v1>

Submitted on 7 May 2018

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.



N° D.U. : 817

Université Clermont Auvergne

Ecole Doctorale des Sciences Pour l'Ingénieur de Clermont-Ferrand

Thèse

Présentée par :

Gabriel CARVALHO

Pour obtenir le grade de

Docteur d'Université

Spécialité : informatique

Résilience aux antibiotiques de biofilms bactériens :
concepts, modélisation et expérimentation

Soutenue publiquement le 03/11/2017 devant le jury composé de

Mme Marie-Pierre FONTAINE-AUPART	<i>Présidente</i>
M. Alain RAPAPORT	<i>Rapporteur et examinateur</i>
M. Romain BRIANDET	<i>Rapporteur et examinateur</i>
Mme Christiane FORESTIER	<i>Co-encadrante</i>
M. Jean-Denis MATHIAS	<i>Directeur de thèse</i>

Unités de recherche :

Laboratoire d'Ingénierie pour les Systèmes Complexes – Irstea de Clermont-Ferrand
Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement – UMR6023 CNRS

Avant-propos

Cette thèse a été financée par un Contrat de Plan Etat Région (CPER) de la région Auvergne. Elle a été effectuée en partenariat entre deux laboratoires :

- Le Laboratoire d'Ingénierie pour les Systèmes Complexes (LISC) de l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA).
- Le Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement (LMGE), UMR6023 du Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS).

Je remercie donc grandement la région Auvergne, l'IRSTEA et le CNRS pour avoir permis la réalisation de cette thèse par leur soutien financier et matériel.

La majorité de cette thèse est composée de trois articles scientifiques soumis à des revues scientifiques internationales à comité de lecture.

Résumé

Les systèmes bactériens sont complexes et adaptatifs. Soumis à des perturbations, telles qu'un traitement antibiotique, ils survivent, se régénèrent et évoluent. Ceci est d'autant plus vrai pour les biofilms, capables de surmonter des traitements létaux à des bactéries planctoniques. La capacité des systèmes à retrouver leur équilibre initial, certaines fonctions ou compositions après un choc est appelée résilience. La résilience est souvent considérée comme complémentaire à la résistance en écologie. Pourtant, la résilience aux antibiotiques reçoit peu de considération en comparaison de la résistance aux antibiotiques en bactériologie. L'une des raisons de ce désintérêt est que ce concept est souvent mal défini et ambigu. Dans cette thèse, nous proposons tout d'abord une base conceptuelle de la résilience aux antibiotiques. A partir de l'analyse de différentes définitions existantes de la résilience, nous fournissons une démarche pour formaliser le concept de résilience dans le contexte d'une population bactérienne soumise à des traitements antibiotiques. De cette première analyse, le mécanisme biologique de persistance bactérienne est ressorti comme important dans la résilience aux antibiotiques. Ce phénomène repose sur la formation de cellules tolérantes aux antibiotiques, les persisters, dont la formation est influencée par les conditions environnementales. Afin de relier la formation des persisters aux conditions environnementales, nous avons développé des modèles mathématiques de transition phénotypique entre cellules sensibles et persisters que nous avons calibrés et testés à l'aide de données expérimentales. Enfin, nous avons étudié l'effet de la persistance bactérienne sur la résilience aux antibiotiques des biofilms. Pour cela, nous avons développé un modèle individu-centré de biofilm intégrant des transitions entre cellules sensibles et persisters. Différentes stratégies de transition ont été reliées à la capacité des biofilms à croître, survivre et se régénérer après un choc antibiotique. La mise en place d'expériences capables de fournir des données à comparer aux simulations est proposée dans la discussion de cette thèse. Cette thèse contribue à la clarification du concept de résilience aux antibiotiques et à la compréhension du phénomène de persistance bactérienne dans les biofilms. Elle ouvre des perspectives sur l'utilisation du concept de résilience en bactériologie clinique et souligne l'importance de l'hétérogénéité des populations bactérienne dans leur capacité à confronter les perturbations et évoluer.

Mots clés : biofilm, antibiotique, résilience, résistance, persistance bactérienne, modélisation, modèle individu-centré

Abstract

Antibiotic resilience of bacterial biofilms: concepts, numerical modeling and experimentations

Bacterial systems are complex and adaptive. When faced with disturbances, such as antibiotic treatments, they survive, recover and evolve. This is particularly true for biofilms, which survive treatments that planktonic cells cannot overcome. The capacity of systems to recover their initial state, some of their functions or composition after a disturbance is called resilience. The resilience concept is often considered complementary to resistance in ecology. However, antibiotic resilience has received little attention compared to antibiotic resistance. One reason of this lack of interest comes from the fact that the resilience concept is often poorly defined and ambiguous. In this thesis, we firstly developed a conceptual framework of antibiotic resilience and applied this framework to the case of a bacterial population faced with antibiotics. This analysis highlighted the importance of the biological mechanism of bacterial persistence. This phenomenon is based on the formation of sub-populations of antibiotic tolerant cells, the persisters, which is influenced by environmental conditions. To relate persister formation to environmental conditions, we developed mathematical models of phenotypic switches between susceptible and persister cells and calibrated and tested them with experimental data. Lastly, we studied the influence of bacterial persistence on biofilm antibiotic resilience. For this purpose, we developed an individual-based model of biofilm with phenotypic switches between susceptible and persister cells. Different strategies of phenotypic switches were related to the dynamics of growth, survival and recovery of bacterial biofilms faced with antibiotic shocks. The setting up of experimentations to obtain data to compare to simulations is presented in the discussion of this thesis. Globally, this thesis contributes to the clarification of the concept of antibiotic resilience and to the understanding of bacterial persistence in biofilms. It gives new perspectives on the use of the resilience concept in clinical bacteriology and emphasizes the importance of the heterogeneity of bacterial populations in their capacity to face disturbances and evolve.

Key words: biofilm, antibiotic, resilience, resistance, bacterial persistence, computational modeling, individual-based model

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord Jean-Denis Mathias pour m'avoir encadré durant ces trois années de thèse. Merci pour ton soutien, ta disponibilité et ton enthousiasme. Un grand merci aussi à Christiane Forestier et Damien Balestrino pour leurs conseils et leur bonne humeur.

Je remercie toutes les personnes de mes deux laboratoires, le LISC et le LMGE, pour avoir su entretenir une ambiance chaleureuse, pour les pauses café aux discussions et projets parfois farfelus ou encore pour les séances de mots croisés pour lesquels je crains ne pas avoir développé de talent particulier. Merci d'avoir créé un cadre si bienveillant, que je sais être rare. Merci aux doctorants, avec lesquels nous nous sommes serrés les coudes mais aussi avons partagé des moments conviviaux autour d'une bière ou d'un ballon.

Je voudrais aussi remercier l'équipe B2HM de l'Institut Micalis pour m'avoir accueilli et avoir partagé leur expérience et leur savoir-faire. Merci aussi à Sylvain Brisse de l'Institut Pasteur pour avoir fourni les souches de *Klebsiella pneumoniae* nécessaires à la cartographie de la persistance bactérienne.

Merci à mes amis, d'école d'ingénieur, de ma colocation, de l'escalade et d'ailleurs pour tous ces moments de partages. Merci de me changer les idées quand j'en ai besoin. Sachez que même si la distance et nos routes nous font nous rencontrer que rarement, vos souvenirs viennent me réconforter dans mes moments de doute.

Merci à ma famille de toujours me soutenir dans mes choix et mes épreuves. Merci à mes parents, à ma sœur et à tous. Enfin, une pensée particulière va à ma grand-mère, qui nous a quittés trop tôt mais dont l'amour m'accompagnera toujours.

Table des matières

1	<i>Introduction</i>	1
1.1	Contexte	1
1.2	Etude bibliographique	3
1.3	Objectifs et déroulement de la thèse	21
2	<i>Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques</i>	23
	Présentation de l'article	23
2.1	Introduction	26
2.2	Formalizing the concepts of resistance and resilience	28
2.3	Relating resistance and resilience concepts to concrete bacterial mechanisms	34
2.4	Illustrating the formalization of resistance and resilience with a mathematical model	40
2.5	Discussion and conclusion	48
2.6	Acknowledgments	50
3	<i>Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences</i>	51
	Présentation de l'article	51
3.1	Introduction	54
3.2	Results	57
3.3	Discussion and conclusion	62
3.4	Experimental procedures	64
3.5	Acknowledgments	74
4	<i>Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?</i>	75
	Présentation de l'article	75
4.1	Introduction	79
4.2	Results	82
4.3	Discussion	90

4.4	Methods	92
4.5	Acknowledgments	96
5	<i>Discussion générale</i>	97
5.1	Bilan	97
5.2	Résultats préliminaires d'expériences en cours	99
5.3	Perspectives	103
6	<i>Références bibliographiques</i>	105
7	<i>Annexes</i>	<i>i</i>
7.1	Informations supplémentaires du chapitre 3	ii
7.2	Informations supplémentaires du chapitre 4	iv
7.3	Expérience en <i>flow cell</i> couplée à la microscopie confocale : protocole et résultats préliminaires	xvii
7.4	Expérience de cytométrie en flux : protocole	xxiii
7.5	Dynamiques de souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> traitées à la ciprofloxacine	xxiv

Table des figures

Figure 1.1 : Les étapes de la formation d'un biofilm.	4
Figure 1.2: Synthèse des mécanismes de protection d'un biofilm.	11
Figure 1.3 : Différences entre sensibilité, résistance, tolérance et persistance pendant un traitement antibiotique d'une population bactérienne.	14
Figure 2.1: Different meanings of resilience.	30
Figure 2.2: Behavior of a mature biofilm toward disturbances.	33
Figure 2.3: Schematic view of the model.	43
Figure 2.4: Resistance, resilience or failure of the property of interest with different combinations of mechanisms and disturbance intensities and durations.	45
Figure 2.5: Dynamics of the different populations.	47
Figure 3.1: Expected dynamics in planktonic batch cultures.	56
Figure 3.2: Total ($n+p$) and persistent (p) populations in the antibiotic-free batch culture.	58
Figure 3.3: Experimental and simulated total (X) and persistent (p) populations in an antibiotic-free batch culture with the different switching models.	60
Figure 3.4: R^2 obtained for different initial glucose concentrations with the different models.	61
Figure 3.5: Experimental design used to obtain data to calibrate the models.	71
Figure 3.6: Characteristic biphasic killing curve of a population treated with a high dose of antibiotic (here 1000-fold the ciprofloxacin MIC).	72
Figure 4.1: Simulation process.	81
Figure 4.2: Live cells (susceptible cells s + persisters p) after 5 hours of biofilm formation, with and without phenotypic switches.	83
Figure 4.3: Fraction of the populations surviving after 2- and 8h-long antibiotic treatments for the three switching strategies.	85
Figure 4.4: Populations recovered 5 hours after the treatment compared to the pre-treatment populations for the three switching strategies.	87
Figure 4.5: Structural patterns of the recovered biofilms 5 hours after the treatment.	89
Figure 5.1 : Fraction de cellules survivantes après 26 heures de traitement antibiotique.	102
Figure 7.1 : Optimization procedure of the switching model parameters.	ii
Figure 7.2 : Killing curves obtained with the different samples from the batch cultures with 4.0g/L initial glucose.	iii
Figure 7.3: Scheme of the spatial organization of the computational domain.	iv
Figure 7.4 : Correlations.	vi
Figure 7.5 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with stochastic switches, two hours treatment (means of four simulations).	vii

Figure 7.6 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with stochastic switches, eight hours treatment (means of four simulations).....	viii
Figure 7.7 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with substrate-dependent switches, two hours treatment (means of four simulations).....	ix
Figure 7.8 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with substrate-dependent switches, eight hours treatment (means of four simulations).....	x
Figure 7.9 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with antibiotic-dependent switches, two hours treatment (means of four simulations).....	xi
Figure 7.10 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with antibiotic-dependent switches, eight hours treatment (means of four simulations).....	xii
Figure 7.11 : Biofilms initially treated during two hours, stochastic switches.....	xiii
Figure 7.12 : Biofilms initially treated during eight hours, stochastic switches.....	xiii
Figure 7.13 : Biofilms initially treated during two hours, substrate-dependent switches.....	xiv
Figure 7.14 : Biofilms initially treated during eight hours, substrate-dependent switches.....	xiv
Figure 7.15 : Biofilms initially treated during two hours, antibiotic-dependent switches.....	xv
Figure 7.16 : Biofilms initially treated during eight hours, antibiotic-dependent switches.....	xv
Figure 7.17 : Local sensibility analysis.....	xvi
Figure 7.18 : Schéma de montage du système <i>flow cell</i>	xix
Figure 7.19 : Croissance d'un biofilm en <i>flow cell</i>	xx
Figure 7.20 : Biomasse au cours du temps lors de la croissance d'un biofilm en <i>flow cell</i>	xxi
Figure 7.21 : Régénération d'un biofilm traité à la ciprofloxacine.....	xxii
Figure 7.22 : Régénération d'un biofilm traité à la ciprofloxacine, réplica.....	xxiii
Figure 7.23 : Concentration Minimal Inhibitrice (CMI) de différentes souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	xxv
Figure 7.24 : Populations en phase de latence (à 0h de culture) traitées à 100 fois la CMI.....	xxv
Figure 7.25 : Populations en phase exponentielle (à 3h de culture) traitées à 100 fois la CMI.....	xxvi
Figure 7.26 : Populations en phase stationnaire (à 24h de culture) traitées à 100 fois la CMI.....	xxvi
Figure 7.27 : Courbes de croissance en milieu M63B1 4g/L de glucose.....	xxvii

Liste des tableaux

Table 2.1: Mechanisms that influence resistance and resilience.....	35
Table 2.2: Parameters used for the simulations.....	44
Table 3.1: Optimal parameters of the different switching models obtained with 4.0g/L glucose.....	61
Table 3.2: Limit values of the switching rates in set environments for the IM and DM models.	69
Table 7.1 : Growth parameters optimized for the initial substrate concentration 4.0g/L.....	iv
Table 7.2 : Model default parameters.....	v
Table 7.3 : Correspondance entre les souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de Blin <i>et al.</i> , (2017) et du LMGE.	xxvii

1 Introduction

1.1 Contexte

Aussi bien en santé qu'en environnement, les bactéries sont fréquemment exposées à des antibiotiques (Martinez, 2009). Bien que ces derniers soient pour la plupart d'origine naturelle, les activités anthropiques ont largement contribué à une répartition universelle et importante de la plupart de ces molécules. Cette pression de sélection a abouti au cours des années à l'émergence de souches bactériennes résistantes à de multiples antibiotiques (Davies and Davies, 2010), ce qui constitue une menace majeure sur la santé humaine (Laxminarayan *et al.*, 2013; Jørgensen *et al.*, 2016). Une population bactérienne est dite résistante si elle est capable de croître en présence d'un antibiotique, car elle possède des fonctions spécifiques contrant l'effet des molécules. Cependant, quand une population fait face à un stress, la résistance n'est pas la seule réponse possible. Ainsi, et notamment en écologie, un concept est souvent considéré comme complémentaire de la résistance : la résilience (Shade, Peter, *et al.*, 2012).

Globalement, la résilience est définie comme la capacité d'un système à retrouver son état ou ses fonctions initiales après une perturbation (Shade, Peter, *et al.*, 2012; Konopka *et al.*, 2015; Todman *et al.*, 2016). L'intérêt de ce concept vient de la prise de conscience que certaines perturbations altèrent la dynamique ou l'équilibre des systèmes. Les systèmes ainsi perturbés retournent vers leur état initial, se régénèrent partiellement ou encore changent complètement d'équilibre. La résilience dépend de la réponse du système étudié à une perturbation. Cependant, de nombreuses divergences existent quant à sa définition et différents consensus et débats émergent selon les domaines d'application. Qu'est-ce qui est résilient ? Le système dans son ensemble ou certaines de ses propriétés ? Et par rapport à quelles perturbations ? Sur quels mécanismes repose la résilience ? Malgré l'importance du concept de résilience en écologie, le terme « résilience aux antibiotiques » est quasiment absent de la littérature en bactériologie. D'autres termes sont plus souvent utilisés comme la tolérance, la persistance ou la récalcitrance.

Dans le cas où la perturbation est une molécule antibiotique, les bactéries regroupées sous la forme de communautés appelées biofilms sont particulièrement bien adaptées pour faire face. En effet, les biofilms sont des groupes de microorganismes adhérents entre eux et à une surface, capables d'adopter des comportements collectifs et de survivre à des

1.1 Contexte

traitements antibiotiques qui seraient létaux vis-à-vis de microorganismes sous forme individuelle (Van Acker *et al.*, 2014). Les biofilms sont à l'origine d'infections chroniques et de contaminations d'équipements, conduisant à des surcoûts économiques et sociaux (Römling and Balsalobre, 2012; Bridier *et al.*, 2014). La réponse des biofilms bactériens aux antibiotiques dépend de mécanismes biologiques variés tels que la survenue de bactéries dormantes, des mutations, des transferts horizontaux de gènes, ou encore l'hétérogénéité génétique et phénotypique de ces communautés. A cela s'ajoute le phénomène de persistance bactérienne qui repose sur la formation de sous-populations de cellules tolérantes aux antibiotiques. Ce phénomène assure la survie et la régénération des populations bactériennes face à des traitement antibiotiques et facilite l'émergence de cellules résistantes (Cohen *et al.*, 2013; Levin-reisman *et al.*, 2017). Comment les sous-populations de cellules tolérantes se forment dans les biofilms est encore méconnu (Balaban *et al.*, 2013).

L'objectif de cette thèse était de caractériser les bases de la résilience aux antibiotiques de biofilms bactériens. Le concept de résilience rassemble de nombreux concepts et mécanismes en microbiologie. Cependant, le concept de résilience reste ambigu et il a été tout d'abord nécessaire de le clarifier et de le formaliser pour l'utiliser dans un contexte bactériologique. La résilience aux antibiotiques d'un biofilm découle de divers mécanismes au niveau moléculaire, cellulaire et de propriétés enchevêtrés. Pour lier ces mécanismes à la résilience des biofilms, qui se définit au niveau du biofilm dans son ensemble, la modélisation numérique apparaissait comme un outil approprié. Un modèle numérique a besoin de données issues d'expériences réelles pour être testé et validé. C'est pourquoi cette thèse a adopté une approche multidisciplinaire entre concepts, modélisation et expériences microbiologiques.

Dans l'étude bibliographique qui suit, nous présentons la formation des biofilms bactériens et nous faisons ressortir l'ambiguïté du concept de résilience. Les mécanismes biologiques liés à la résilience des biofilms aux antibiotiques sont présentés. Parmi ces mécanismes, le phénomène de persistance bactérienne apparaît comme hétérogène et environnement-dépendant. Nous présentons également les outils que sont les modèles numériques de biofilms.

A la suite de cette bibliographie, nous déclinons les trois objectifs de recherche par lesquels nous avons contribué à former les bases de la résilience aux antibiotiques des biofilms bactériens : i) formaliser le concept de résilience aux antibiotiques, ii) déterminer l'influence des conditions environnementales sur la persistance bactérienne et iii) étudier l'influence de la persistance bactérienne sur la résilience des biofilms.

1.2 Etude bibliographique

1.2.1 Le biofilm : un mode de vie

Les bactéries dites planctoniques vivent en suspension dans un milieu liquide, séparées les unes des autres. Cependant, la plupart des bactéries dans la nature adoptent un autre mode de vie : le biofilm. Les biofilms sont des communautés de bactéries adhérentes entre elles et à une surface à l'aide d'une matrice de substances extracellulaires (MSE). La formation d'un biofilm est généralement décrite en quatre étapes : 1) adhésion réversible, 2) adhésion irréversible, 3) formation de micro-colonies, 4) maturation et 5) détachement (Monds and O'Toole, 2009). Une fois fixées à une surface, les bactéries se divisent et sécrètent de la matrice. Des colonies se forment et se rencontrent jusqu'à constituer des structures complexes. Enfin, une fois mature, des fragments du biofilm se détachent et vont ainsi coloniser d'autres surfaces (Figure 1.1).

La MSE est composée d'un mélange de polysaccharides, d'ADN extracellulaire (ADNe) et de protéines et sa composition varie selon les espèces bactériennes constituant le biofilm. Les polysaccharides et les protéines sont excrétés par les cellules actives tandis que l'ADNe est principalement libéré par des mécanismes d'autolyse des cellules (Zhurina *et al.*, 2014). La matrice a une utilité fonctionnelle, comme séquestrer les ressources du milieu dans le biofilm, digérer les nutriments par les enzymes qu'elle contient ou servir de barrière face aux molécules nocives exogènes (Flemming *et al.*, 2016). La MSE structure également les biofilms. L'architecture des biofilms varie grandement d'une espèce à l'autre, mais également entre différentes souches d'une même espèce et en fonction des conditions environnementales (Branda *et al.*, 2005). Les biofilms matures comportent des pores, des cavités, ou forment des structures en champignon élaborées (Ghanbari *et al.*, 2016). La structure des biofilms crée une hétérogénéité spatiale qui conduit à des gradients de concentrations internes. Les cellules qui composent les biofilms adoptent alors différents phénotypes en fonction de leur position spatiale, ce qui amène parfois à comparer les biofilms à des organismes multicellulaires (Claessen *et al.*, 2014).

La proximité des cellules en biofilm favorise les échanges et la communication entre cellules. Cette communication se fait notamment *via* le quorum-sensing (Flemming *et al.*, 2016) : les bactéries communiquent entre elles en utilisant des auto-inducteurs. Ces molécules émises par les bactéries diffusent dans les biofilms et sont perçues à l'aide de récepteurs spécifiques par d'autres bactéries qui adaptent leur phénotype en conséquence. La proximité des cellules en biofilm permet d'atteindre localement de fortes

1.2 Etude bibliographique

concentrations d'auto-inducteurs, ce qui n'est pas réalisable en culture planctonique où la communication est « diluée » dans le milieu. Le quorum-sensing permet ainsi la coordination de l'expression de gènes spécifiques impliqués dans la formation du biofilm, sa maturation ou encore son détachement (Nadell *et al.*, 2008; Flemming *et al.*, 2016).

L'intérêt porté aux biofilms bactériens vient du fait qu'ils survivent à des traitements antibiotiques qui seraient létaux à un groupe de bactéries planctoniques (Römling and Balsalobre, 2012). Pour le moment, la capacité des biofilms à surmonter des traitements antibiotiques est appelé récalcitrance, tolérance ou encore persistance, et repose sur des mécanismes divers. Rassembler tous ces termes et mécanismes sous le concept de résilience donnerait une vision plus claire de la réponse des biofilms soumis à des antibiotiques.

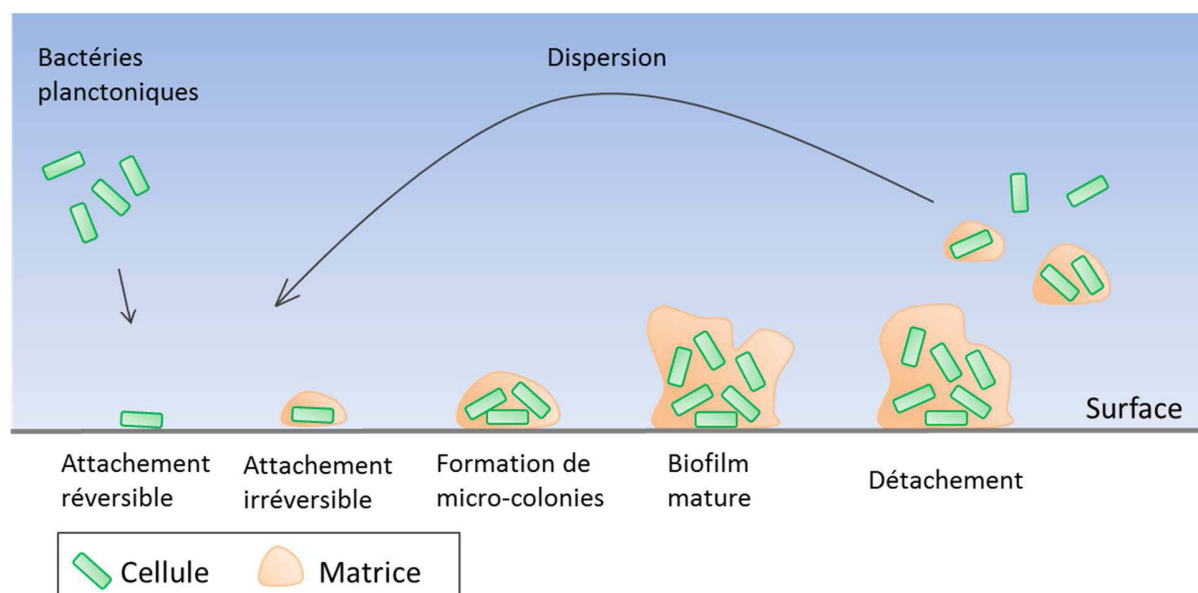


Figure 1.1 : Les étapes de la formation d'un biofilm.

Les cellules planctoniques, libres en milieu liquide, adhèrent à une surface. Elles excrètent des substances extracellulaires qui les fixent de manière irréversible. La croissance et la division des cellules conduisent à la formation de micro-colonies puis d'un biofilm structurellement complexe. Enfin, des cellules seules ou des fragments de biofilm se détachent et colonisent d'autres surfaces, commençant un nouveau cycle.

1.2.2 La résilience en microbiologie : un concept ambigu

Notre objectif est d'établir les bases de la résilience aux antibiotiques de biofilms bactériens. En d'autres termes, nous voulons utiliser le concept de résilience, complémentaire de celui de la résistance, pour formaliser la réponse des biofilms aux traitements antibiotiques. Or, le concept de résilience est peu utilisé en bactériologie contrairement au terme de résistance aux antibiotiques. En bactériologie clinique, la résilience est utilisée sans définition claire. Par exemple, la résilience aux thérapies anti-infectieuses en cas d'infections impliquant des biofilms fait référence à la capacité des bactéries à survivre dans l'hôte et donc à faire échouer les traitements (Römling and Balsalobre, 2012). A la place de la résilience, d'autres concepts sont souvent utilisés comme la persistance bactérienne, la résistance phénotypique, la tolérance aux antibiotiques, la récalcitrance ou encore l'hétérorésistance (Wang *et al.*, 2014; Brauner *et al.*, 2016; Fisher *et al.*, 2017; Hall and Mah, 2017). Alors, comment définir la résilience aux antibiotiques des biofilms ?

Dans la littérature, les définitions du concept de résilience sont diverses, de l'écologie à la psychologie, tout comme les systèmes auxquels il s'applique (Hosseini *et al.*, 2016). Cette diversité confère sa richesse à ce concept mais le rend aussi difficile à appréhender et à définir. De manière générale, la résilience est la capacité d'un système à retrouver ou maintenir ses fonctions, ses propriétés ou encore son identité après des perturbations. L'intérêt de ce concept vient du fait qu'un système peut être affecté par de nombreuses perturbations qui écartent le système de son état initial. Connaître la résilience d'un système, c'est savoir s'il est capable de surmonter ces perturbations, et avec quelle efficacité. Cependant, toute définition plus précise de ce concept devient rapidement sujette à interprétation (Todman *et al.*, 2016). Par exemple, la résilience se réfère au retour à un état initial, à la récupération d'une fonction précise, ou au maintien d'un équilibre particulier. Et l'état initial, la fonction ou l'équilibre considérés dépendent du contexte. De plus, les méthodes de quantification de la résilience sont diverses. La résilience est parfois quantifiée par la durée nécessaire pour retrouver l'état initial après une perturbation ou encore par la proportion de l'état initial régénéré (Baho *et al.*, 2012; Todman *et al.*, 2016). Par conséquent, comparer des études sur la résilience est un défi. Bien que le concept de résilience s'adresse à un aspect fondamental de la capacité des systèmes à réagir aux perturbations, son utilisation reste ambiguë.

En microbiologie, le concept de résilience est principalement utilisé en écologie microbienne et dans l'étude du microbiote intestinal (Lozupone *et al.*, 2012; Shade, Peter,

1.2 Etude bibliographique

et al., 2012). Ces deux domaines considèrent le concept de résilience comme complémentaire au concept de résistance (Shade, Peter, *et al.*, 2012). La résilience et la résistance forment deux aspects de la capacité d'une communauté microbienne à maintenir sa stabilité (Shade, Peter, *et al.*, 2012; Konopka *et al.*, 2015). En écologie microbienne, la mise en pratique du concept de résilience contraint à définir l'état initial par un nombre restreint de mesures expérimentales. Par conséquent, la résistance et la résilience sont relatives à ces mesures, qui sont généralement des indicateurs de la composition et des fonctions de la communauté microbienne étudiée. Ces indicateurs sont, entre autres, des mesures de diversité à partir de données métagénomiques, des taux d'utilisation d'oxygène ou de sources de carbone (Baho *et al.*, 2012; Shade, Read, *et al.*, 2012). Les perturbations sont des augmentations de salinité, des dessiccations, des variations de température, des apports en nutriments ou en antibiotiques pour le cas du microbiote intestinal (Allison and Martiny, 2008; Dethlefsen and Relman, 2011; Baho *et al.*, 2012; Hershkovitz and Gasith, 2013). Les communautés microbiennes sont très diverses et leurs états initiaux de référence et les perturbations prises en compte varient selon les études. Devant ces disparités, qu'est ce qui est vraiment considéré « stabilité » dont la résistance et la résilience sont deux aspects ?

En écologie, Grimm and Wissel (1997) ont mis en évidence les nombreuses définitions du terme stabilité. Cette ambiguïté vient souvent du fait que ce qui est considéré stable est laissé implicite. La résistance et la résilience dépendent des variables analysées, du niveau de description du système étudié, de la perturbation considérée, de l'état de référence avant la perturbation, et des échelles spatiales et temporelles de l'étude. De plus, les perturbations considérées varient en type, en fréquence, en intensité et en durée (Grimm and Wissel, 1997). Aussi, le concept de résilience est parfois associé aux notions d'adaptation, d'apprentissage, d'évolution et de transformation (Folke *et al.*, 2010). Ces notions sont pertinentes pour les systèmes biologiques, qui sont adaptatifs et évolutifs. Cependant, ces notions semblent contradictoires au concept de stabilité puisque, par définition, un système qui évolue est un système qui change. Comment ces notions s'intègrent-elles dans le concept de résilience ?

Afin de former les bases de la résilience aux antibiotiques des biofilms bactériens, il convient donc tout d'abord de clarifier le concept de résilience dans ce contexte. C'est le premier objectif de cette thèse et l'objet du chapitre 2. Ce chapitre, sous forme d'article, présente plus en détails différentes définitions des concepts de résistance et de résilience et s'attache à formaliser un cadre afin d'appliquer ces concepts au cas de la résilience aux antibiotiques de populations bactériennes.

1.2.3 Mécanismes biologiques liés à la résilience aux antibiotiques des biofilms

Quelle que soit la définition de la résilience adoptée, la résilience dépend de la manière dont le système considéré réagit face aux perturbations. Dans notre cas, la résilience dépend donc de la réponse des biofilms pendant et après un traitement antibiotique. De nombreux mécanismes protégeant les biofilms contre les perturbations ont été décrits et sont présentés de manière non exhaustive dans les paragraphes suivants.

1.2.3.1 Une matrice protectrice

La matrice de substances extracellulaires (MSE) fait barrière aux agents extérieurs au biofilm, y compris les substances nocives. Cet effet barrière dépend de la nature de la matrice et des molécules exogènes. Par exemple, concernant les antibiotiques, la ciprofloxacine diffuse dans les biofilms de *Klebsiella pneumoniae* rapidement tandis que l'ampicilline reste en grande partie à l'extérieur (Anderl *et al.*, 2000). La diffusion limitée est dépendante de la molécule antibiotique - les petites molécules non-chargées n'ont généralement pas de difficulté à pénétrer les biofilms (Flemming *et al.*, 2016) - de la souche bactérienne étudiée et de l'épaisseur du biofilm. Mais un faible coefficient de diffusion ne constitue qu'un frein à la diffusion interne des molécules. Pour les stopper, il est nécessaire que ces molécules interagissent directement avec les éléments constitutifs de la matrice. Que l'antibiotique diffuse dans le biofilm malgré cette première barrière qu'est la matrice ne garantit pas pour autant son efficacité, car d'autres mécanismes de survie entrent alors en jeu. Par exemple, la rifampicine, la daptomycine, l'amikacine et la ciprofloxacine diffusent dans des biofilms de staphylocoques sans parvenir à éradiquer les cellules (Hall and Mah, 2017).

1.2.3.2 Protection par le groupe

L'effet d'un antibiotique dépend de la concentration en biomasse de la population traitée, ce phénomène est appelé effet inoculum (Vega and Gore, 2014). Pour les bactéries productrices d'enzymes capables de dégrader les antibiotiques, la forme de vie en biofilm permet d'atteindre des concentrations locales élevées d'enzymes. Par exemple, certaines souches de *K. pneumoniae* produisent des β -lactamases qui s'accumulent dans le biofilm et dégradent l'ampicilline, ce qui augmente la tolérance du biofilm à cet antibiotique (Hall and Mah, 2017). Le comportement collectif des biofilms est dépendant du quorum-sensing et le perturber augmente la sensibilité des biofilms aux antibiotiques (Hall and Mah, 2017). Cette sensibilité est souvent due au fait que les cellules incapables de produire ou de détecter certains auto-inducteurs forment des biofilms structurellement peu

1.2 Etude bibliographique

développés. Cependant, inhiber le quorum-sensing de biofilms matures augmente aussi leur sensibilité. Par exemple, la déficience du récepteur TraP impliqué dans le quorum-sensing augmente la sensibilité de biofilms matures de *Staphylococcus aureus* à la vancomycine, la daptomycine ainsi qu'à la tobramycine en réduisant la synthèse de peptidoglycane et en diminuant l'épaisseur des parois bactériennes (Brackman *et al.*, 2011). Cet effet est spécifique aux biofilms car la déficience de TraP dans des cultures planctoniques n'a pas d'effet significatif sur leur sensibilité à ces mêmes antibiotiques.

1.2.3.3 Hétérogénéité spatiale, génétique et phénotypique des biofilms

En plus de la protection fournie par la matrice et de l'effet de groupe, la capacité de survie des biofilms vient en grande partie de leur hétérogénéité : spatiale, génétique et phénotypique. Les cellules d'un biofilm ne sont pas toutes affectées de la même manière par un stress extérieur au biofilm. La structure spatiale des biofilms préserve certaines parties de la présence d'antibiotique ou en limite l'accès. Des gradients de concentration d'antibiotique se forment dans les biofilms et créent des zones protégées dans lesquelles des cellules survivent voire régénèrent le biofilm. L'hétérogénéité spatiale des biofilms génère aussi des gradients de concentration de nutriments, d'oxygène ou encore des gradients de pH. Les biofilms favorisent aussi l'hétérogénéité génétique. La proximité des cellules en biofilm facilite les échanges d'éléments génétiques mobiles par transfert horizontal de gènes (Darmon and Leach, 2014). Les bactéries s'échangent des plasmides ou intègrent directement de l'ADNe présent dans la matrice extracellulaire. Certains stress induits dans les couches basales des biofilms (faible pH, manque de nutriments...) stimulent aussi le taux de mutations des bactéries (Galhardo *et al.*, 2007; Boles and Singh, 2008). Cette diversité génétique au sein des biofilms augmente les chances de produire des cellules peu sensibles à certains antibiotiques.

Même en restant isogéniques, les cellules d'un biofilm sont phénotypiquement hétérogènes. Les biofilms contiennent des bactéries dites dormantes peu sensibles aux antibiotiques en raison d'un métabolisme peu actif et de l'absence de division. Beaucoup d'antibiotiques ont en effet besoin de procédés actifs au sein des cellules pour être efficaces. L'inhibition de ces procédés limite de même l'efficacité de ces antibiotiques. Différents types de cellules dormantes existent, comme les cellules viables mais non cultivables (CVNC), les persisters ou encore les spores (Rittershaus *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). La mise en place de ces phénotypes dépend de différents mécanismes comme le remodelage de la paroi bactérienne et l'inhibition de la transcription (Rittershaus *et al.*, 2013). L'induction de l'état de dormance est aléatoire ou fait suite à des stress environnementaux comme le manque de substrat. L'hétérogénéité spatiale des biofilms

1 Introduction

favorise donc la formation de ce type de cellules dans les couches profondes des biofilms, où l'accès aux nutriments est limité. Les CVNC sont capables de revenir à un état métabolique actif dans des conditions spécifiques, comme la présence de molécules du quorum-sensing (Ayrapetyan *et al.*, 2014b). Parmi les cellules dormantes, les persisters ont la particularité de pouvoir reprendre leur croissance rapidement en milieu standard. Les persisters font partie du phénomène de persistance bactérienne, c'est-à-dire la capacité d'une sous-population de bactéries à tolérer un stress puis de régénérer la population initiale une fois le stress disparu (Kint *et al.*, 2012; Balaban *et al.*, 2013). La persistance bactérienne est étroitement liée au déclenchement de réponses au stress (Kint *et al.*, 2012), comme la réponse stringente, déclenchée par un manque de nutriments, et la réponse SOS, déclenchée par des dommages à l'ADN (Poole, 2012). Cependant, les sous-populations de persisters sont elles-mêmes hétérogènes et leur formation repose sur divers mécanismes biologiques. La persistance bactérienne est présentée en détail dans la partie 1.2.4.

1.2.3.4 Protection par la coopération inter- et intra-espèce(s)

En milieu naturel ou lors d'infections, les biofilms sont presque toujours composés de plusieurs espèces bactériennes. La composition et les interactions de ces communautés affectent également la capacité des biofilms à faire face aux antibiotiques.

La résistance à un antibiotique d'une espèce microbienne au sein d'un biofilm multi-espèces peut s'étendre à toute la communauté (Lee *et al.*, 2014; Vega and Gore, 2014). Par exemple, le β -1,3-glucan présent dans la matrice des biofilms du champignon *Candida albicans* protège *Staphylococcus aureus* de la vancomycine quand les deux microorganismes sont présents dans un même biofilm (Kong *et al.*, 2016). Le β -1,3-glucan sert probablement de barrière à la diffusion de la vancomycine dans le biofilm mixte. Des biofilms multi-espèces sont également capables d'augmenter de manière synergique leur croissance, leur tolérance aux antibiotiques mais aussi aux invasions d'autres espèces (Burmølle *et al.*, 2006). Aussi, comme déjà cité précédemment, les biofilms sont des environnements propices aux transferts horizontaux de gènes. Bien entendu, ces échanges sont plus diversifiés dans un biofilm multi-espèces que dans un biofilm mono-espèce. Les échanges de plasmides et l'acquisition d'ADN extracellulaire, présent dans la matrice des biofilms, entraînent une diversification des génomes au sein des biofilms et favorisent l'émergence de résistances (Hall and Mah, 2017).

La coopération est coûteuse pour la population produisant un bien commun, c'est-à-dire excréant une molécule bénéfique à l'ensemble de la communauté. Les populations bénéficiant de ce bien commun sans en payer le coût, en énergie et en ressources, ont

1.2 Etude bibliographique

tendance à croître plus rapidement que la population exploitée. La population « altruiste » doit obtenir un avantage sélectif de son action pour stabiliser la coopération (Nadell *et al.*, 2013). La coopération entre bactéries d'une population isogénique émerge plus facilement que la collaboration entre espèces différentes puisque les bactéries supportant le coût de la collaboration favorisent alors les bactéries ayant un génome identique (Gestel *et al.*, 2015). Par exemple, certaines bactéries induisent leur propre lyse afin de participer à la formation de la matrice en apportant de l'ADN extracellulaire et ainsi consolider le biofilm (Kaplan *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2013). Cet effet peut être lié à la présence d'antibiotiques : des concentrations sub-inhibitrices de β -lactamines induisent la formation de biofilm par autolyse chez certaines souches de *Staphylococcus aureus* (Kaplan *et al.*, 2012).

La stratégie dite de *bet-hedging* est aussi une forme de coopération dans laquelle des cellules d'une population adoptent un phénotype adapté à un environnement potentiel plutôt que d'optimiser leur phénotype pour leur environnement actuel (Grimbergen *et al.*, 2015). Cette stratégie est basée sur des transitions aléatoires de phénotypes et permet à une population de se préparer à des changements environnementaux imprévisibles (Grimbergen *et al.*, 2015; Nichol *et al.*, 2016). La persistance bactérienne est une forme de *bet-hedging* dans laquelle des cellules d'une population perdent leur capacité à se multiplier, aléatoirement ou en réponse à un stimulus, mais acquièrent une tolérance aux antibiotiques (van den Bergh *et al.*, 2017).

1.2.3.5 Conclusions

Dans l'ensemble, la résilience aux antibiotiques des biofilms dépend de multiples facteurs, schématisés dans la Figure 1.2 (Bridier *et al.*, 2011). L'hétérogénéité spatiale, génétique et phénotypique des biofilms génère une diversité de réponses possibles face aux perturbations. Cette diversité augmente les chances de survie d'une partie du biofilm et de son adaptation rapide aux perturbations extérieures telles que les antibiotiques (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014; Vega and Gore, 2014; Wang *et al.*, 2014).

1 Introduction

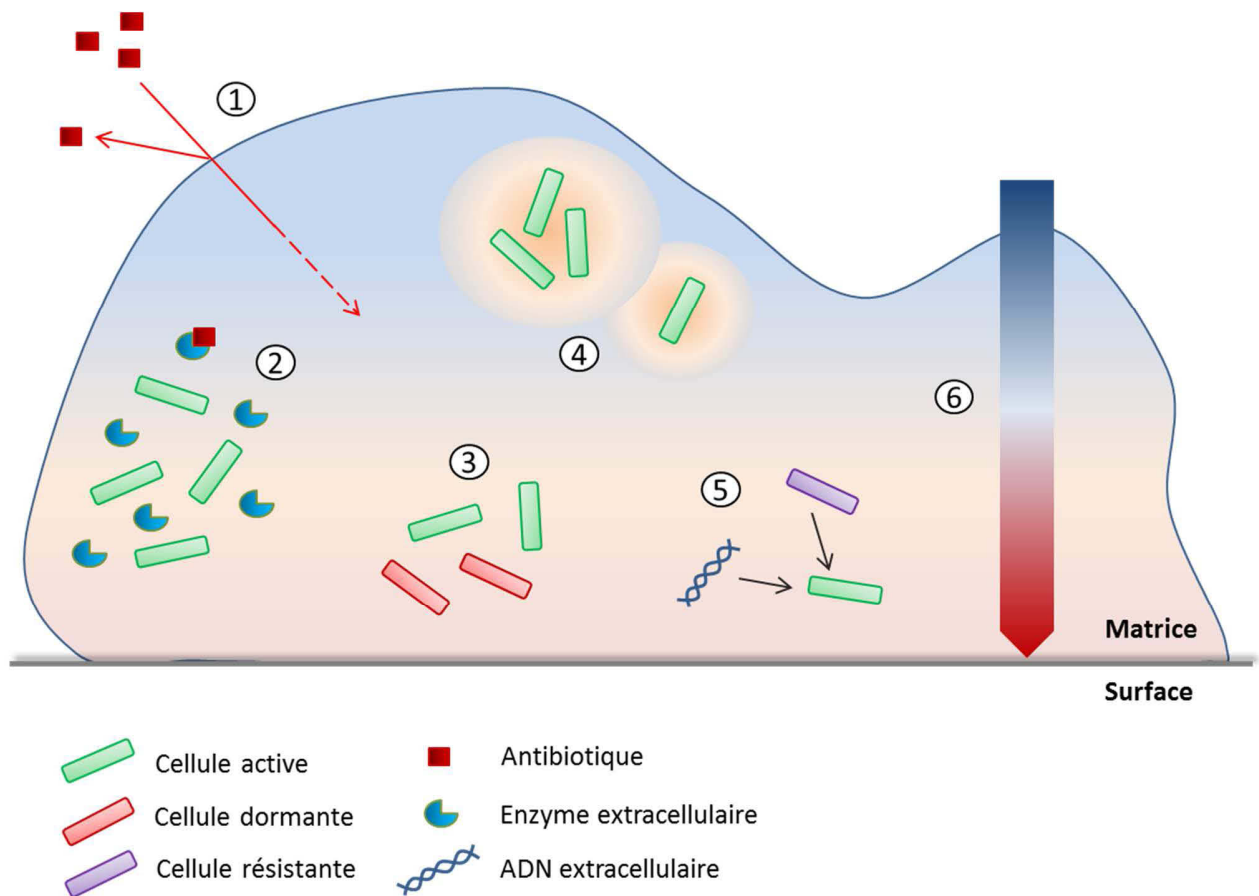


Figure 1.2: Synthèse des mécanismes de protection d'un biofilm.

(1) La matrice du biofilm fait office de barrière face aux agents extérieurs. (2) Une concentration locale élevée d'enzymes dégrade l'antibiotique. (3) Des cellules dormantes, telles que les persisters, se forment aléatoirement ou en réponse aux conditions environnementales défavorables dans les couches profondes du biofilm. (4) Les bactéries communiquent par l'intermédiaire d'auto-inducteurs dont la concentration dépend de la densité de biomasse. (5) Les bactéries récupèrent de l'ADN par transfert horizontal de gènes. (6) Des gradients de concentration se forment, diversifiant la réponse des cellules selon leur position spatiale dans le biofilm.

1.2 Etude bibliographique

1.2.4 La persistance bactérienne

1.2.4.1 Un rôle majeur dans la résilience des biofilms ?

La persistance bactérienne assure la survie partielle puis la régénération d'une population de bactéries après un traitement antibiotique (van den Bergh *et al.*, 2017). Ce phénomène est considéré comme important dans la réponse des biofilms aux traitements antibiotiques (Van Acker *et al.*, 2014; Wood, 2016a). Cependant, bien qu'il soit très étudié depuis une dizaine d'années, il reste méconnu. La persistance bactérienne apparaît comme hétérogène et fortement dépendante des conditions expérimentales, ce qui rend difficile de déterminer son influence sur la dynamique des biofilms soumis aux antibiotiques.

Au niveau d'une population, la persistance se distingue de la sensibilité, de la résistance et de la tolérance à un antibiotique. Les différentes dynamiques de ces types de réponse lors d'un traitement antibiotique sont représentées sur la Figure 1.3. En présence d'une forte concentration d'antibiotique (Brauner *et al.*, 2016) :

- Une population sensible décline rapidement.
- Une population résistante est capable de croître.
- Une population tolérante décline lentement.
- Une population persistante présente deux phases, une première phase durant laquelle est décline rapidement puis une seconde phase où elle décline lentement.

La persistance est due à une réponse hétérogène de la population bactérienne durant le traitement. Elle est liée à la formation d'une sous-population de persisters tolérants aux stress dans une population isogénique sensible, c'est à dire dépourvue de mécanismes spécifiques de résistance vis-à-vis de l'antibiotique. Cette sous-population de persisters est dite tolérante car elle est éliminée lentement pendant le traitement. Cependant, la majorité de la population est bien sensible à l'antibiotique et seule la minorité de persisters est tolérante. Les persisters sont généralement décrits comme dormants d'un point de vue métabolique, ne se multipliant pas ou lentement. Ce phénotype est réversible et un persister ayant survécu à un stress est capable de se « réveiller » et de recommencer à se multiplier normalement. En contrepartie, il perd sa tolérance (Balaban *et al.*, 2013). Lors d'un stress bactéricide, les bactéries sensibles meurent et les persisters survivent régénérant ainsi la population une fois le stress évacué, en reprenant leur croissance normale (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014; Vega and Gore, 2014). Par conséquent, la persistance bactérienne est un facteur important de la survie et de la régénération des populations bactériennes dans l'environnement et lors de traitements anti-infectieux (Cohen *et al.*, 2013). La persistance bactérienne, contrairement à une résistance spécifique

1 Introduction

à un antibiotique, repose sur de nombreux gènes non spécialisés dans la réponse à un antibiotique particulier (Wu *et al.*, 2015). Elle dépend de réponses générales aux stress, est déclenchée par des mécanismes redondants au sein des cellules et son évolution peut être rapide (Fridman *et al.*, 2014). La résistance repose quant à elle sur des mutations spécifiques ou des acquisitions d'éléments génétiques donnant la capacité aux cellules de neutraliser l'antibiotique en le détruisant, en modifiant sa cible ou en l'évacuant par des pompes à efflux. La persistance est un phénomène plus général et répandu que la résistance. Elle précède la résistance en permettant la survie et la régénération de la population face à des stress répétés (Cohen *et al.*, 2013; Levin-reisman *et al.*, 2017; Lewis and Shan, 2017).

La proportion de persisters dans les biofilms est souvent plus importante que dans les cultures planctoniques et est considérée comme l'un des facteurs majeurs de leur protection face aux traitements antibiotiques (Jolivet-Gougeon and Bonnaure-Mallet, 2014). Comme déjà cité, les persisters se forment aléatoirement ou en réponse à des stress ou signaux extérieurs comme le manque de nutriments, le quorum-sensing ou encore des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotique. Par conséquent, les gradients de concentration de ces molécules dans les biofilms favorisent leur formation (Balaban, 2011; Amato *et al.*, 2013; Helaine and Kugelberg, 2014; A. Harms *et al.*, 2016). Cependant, bien que la proportion de persister soit plus élevée parmi les cellules ne se divisant pas, l'arrêt de la croissance n'est ni nécessaire ni suffisant à la persistance bactérienne (Orman and Brynildsen, 2013). Il devient de plus en plus clair que l'état de persister n'est pas acquis par le simple arrêt de la réplication mais par la mise en place d'un ensemble de mécanismes de défense par les cellules (Amato *et al.*, 2014).

1.2 Etude bibliographique

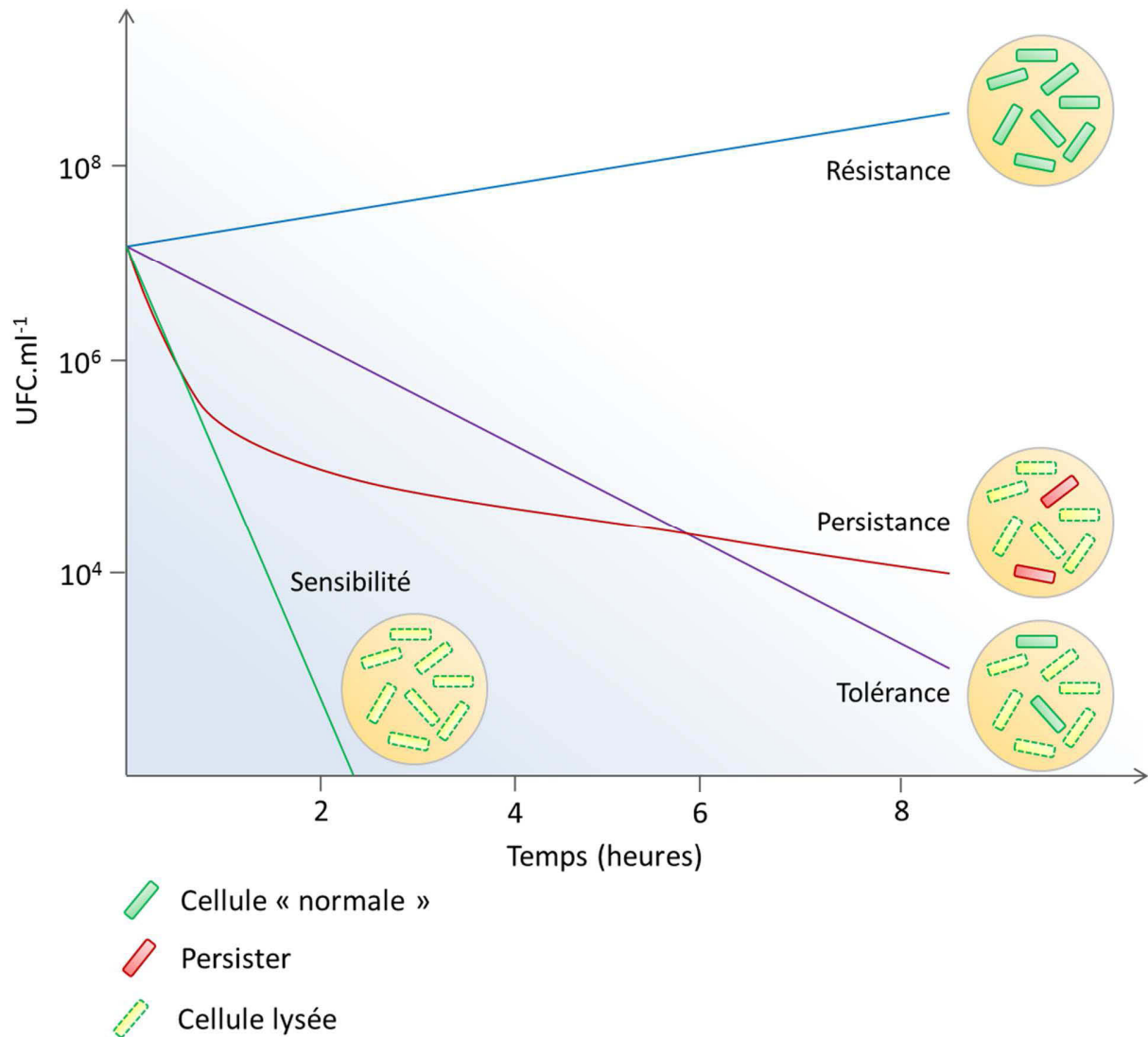


Figure 1.3 : Différences entre sensibilité, résistance, tolérance et persistance pendant un traitement antibiotique d'une population bactérienne.

Une population sensible décline rapidement. Une population résistante croît pendant le traitement. Une population tolérante est phénotypiquement homogène et décline lentement. Une population persistante présente une courbe en deux phases, caractéristique de la présence d'une sous-population de persister.

1.2.5 Mécanismes de la persistance bactérienne

Malgré l'abondance de la littérature sur la persistance bactérienne, la compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu reste incomplète. La mise en place de cet état physiologique particulier implique un ensemble de mécanismes divers, redondants et affectés par les conditions environnementales.

1.2.5.1 Formation aléatoire de persisters : les modules toxine/antitoxine

Les modules toxine/antitoxine (TA) induisent aléatoirement la formation de persisters (Fasani and Savageau, 2013; Gelens *et al.*, 2013; Zucca, 2014). La toxine est le plus souvent neutralisée par son antitoxine. Cependant, les fluctuations dans la production de ces deux molécules conduisent éventuellement à un excès de la toxine au sein de la cellule bactérienne. Ceci induit alors des changements physiologiques tels que l'inhibition de la réplication ou l'activation de réponses au stress comme la réponse stringente, qui conduisent à l'état de persister (Michiels *et al.*, 2016). Plusieurs types de modules TA sont impliqués dans la persistance bactérienne, le module HipBA étant le plus étudié (Kint *et al.*, 2012). Outre leur implication dans la formation de persisters, les modules TA serviraient de régulateurs globaux pour plusieurs mécanismes de défense, telles que les réponses aux stress mais aussi la formation de biofilm (Wang and Wood, 2011). L'action des toxines se doit d'être réversible pour que les persisters reprennent leur croissance et leur sensibilité. Quelques mécanismes de réversion sont décrits dans la littérature (Hall *et al.*, 2017). Par exemple, l'effet de la toxine RelE est contrecarré par l'ARN de transfert-messager (ARN_{tm}), qui libère les ribosomes bloqués par de l'ARN messager endommagé par la toxine, dans un mécanisme dit de trans-translocation (Christensen and Gerdes, 2003).

1.2.5.2 Formation de persisters en réponse au manque de ressources : la réponse stringente et le facteur sigma RpoS

La réponse stringente est déclenchée suite à un manque de nutriments dans le milieu, notamment en acides aminés, ou par d'autres types de stress comme un choc thermique (Hauryliuk *et al.*, 2015). Ces stress déclenchent la production d'un régulateur central, l'alarmone (p)ppGpp, qui dirige le métabolisme de la cellule des fonctions de croissance vers des fonctions d'homéostasie et de survie. La réponse stringente est impliquée dans plusieurs cas de persistance (Alexander Harms *et al.*, 2016). Cette réponse physiologique est déclenchée en phase stationnaire des cultures planctoniques et à l'intérieur des biofilms, où les bactéries ont difficilement accès aux nutriments. La diauxie, c'est-à-dire la

1.2 Etude bibliographique

transition entre la consommation d'un substrat particulier à un autre, induit aussi la formation de persisters (Amato and Brynildsen, 2014).

RpoS est un facteur sigma de réponse généralisée au stress capable d'interférer avec de nombreux promoteurs de gènes et d'induire ainsi un changement significatif de la physiologie de la cellule. Il a été montré que la délétion du gène *rpoS* chez *E. coli* augmente la proportion de persisters en présence d'ampicilline et de norfloxacine mais la diminue au contraire en présence de gentamycine (Wu *et al.*, 2015). Cette réponse généralisée au stress est déclenchée par le manque de nutriments (carbone, phosphore...) ou d'autres conditions défavorables telles que des pH ou températures extrêmes. Elle augmente la tolérance à une variété de stress comme le pH, la température, le peroxyde d'hydrogène ou le stress osmotique (Battesti *et al.*, 2011). La réponse stringente et la réponse générale au stress induite par RpoS possèdent une certaine redondance dans les mécanismes biologiques qu'elles activent. Ainsi, la (p)ppGpp, actrice principale de la réponse stringente, augmente directement ou indirectement la quantité d'ARNm du gène *rpoS* (Battesti *et al.*, 2011). Ces deux types de réponse sont également réversibles quand les conditions environnementales redeviennent favorables, comme lors du transfert d'une culture en phase stationnaire dans du milieu de culture riche en nutriments. La reprise de la croissance prend plus ou moins longtemps selon les milieux et les souches. La durée de la phase de latence, durant laquelle les persisters conservent une tolérance aux stress, est capable d'évoluer rapidement. Traité à l'ampicilline, la durée de la phase de latence d'*E. coli* s'ajuste à la durée des traitements en seulement huit cycles de traitement/régénération (Fridman *et al.*, 2014).

Outre un manque de ressources, la réponse stringente et le facteur RpoS peuvent aussi être induits par des concentrations d'antibiotiques inférieures à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI). Exposer préalablement *E. coli* à des concentrations d'ampicilline sub-CMI augmente son taux de survie face à un traitement létal d'ampicilline, en lien avec l'induction de ces deux mécanismes (Mathieu *et al.*, 2016).

1.2.5.3 Formation de persisters en réponse à un traitement antibiotique : la réponse SOS

La réponse SOS induit des mécanismes de réparation de l'ADN lorsque la molécule a été lésée, notamment par des antibiotiques (Bernier *et al.*, 2013; Michiels *et al.*, 2016). C'est le cas des traitements à la ciprofloxacine, où l'induction de la réponse SOS permet la survie partielle d'une population bactérienne chez *E. coli*. La délétion des gènes impliqués dans l'induction de la réponse SOS diminue la proportion de persisters quand *E. coli* est traitée à la ciprofloxacine mais pas à l'ampicilline ou à la streptomycine, des β -lactamines. Ceci

1 Introduction

suggère que la réponse SOS est principalement impliquée dans la persistance aux fluoroquinolones, tels que l'ofloxacine ou la ciprofloxacine, que ciblent des topoisomérases bactériennes impliquées dans la réplication de l'ADN (Dörr *et al.*, 2009). La ciprofloxacine déclenche la réponse SOS par l'intermédiaire de la toxine TisB (Dörr *et al.*, 2010); la délétion du gène *tisAB* montre une réduction nette du nombre de persisters chez *E. coli* traitée à la ciprofloxacine. La réponse SOS stoppe la réplication des cellules par l'intermédiaire de la protéine SulA. Les cellules reprennent rapidement leur croissance normale après l'arrêt de la production de cette molécule chez *E. coli* (Vedyaykin *et al.*, 2017).

1.2.5.4 Fluctuations génétiques et autres mécanismes

Mis à part les modules TA et les réponses au stress, la persistance bactérienne émerge aussi des fluctuations d'expression de gènes entre individus d'une population isogénique (Davidson and Surette, 2008). La persistance bactérienne peut ainsi être déclenchée par la sur- ou sous-expression d'un ou plusieurs gène(s) augmentant la tolérance d'une cellule à un stress particulier. Par exemple, la surexpression par une partie de la population bactérienne de gènes codant des pompes à efflux permet à cette sous-population d'être temporairement tolérante (les bactéries ne se divisent pas) ou résistante (les bactéries se divisent) à un antibiotique (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014). La surexpression de gènes d'hydrolase dans une sous-population conduit aussi à la tolérance de cette sous-population vis-à-vis de la ceftriaxone chez *E. coli* (Wang *et al.*, 2014). La surproduction d'hydrolase induit l'inhibition de la croissance bactérienne et donc de l'activité de l'antibiotique qui nécessite des cellules se divisant activement, conduisant à la tolérance de la cellule. Chez *Salmonella enterica*, les cellules sous-exprimant le gène *ompC* codant une porine ont une sensibilité moindre par rapport à la kanamycine (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014). Chez *Mycobacterium smegmatis*, les sous-populations de persisters traités à l'isoniazide ne sont pas complètement dormantes mais se divisent lentement. La population de persisters reste stable pendant le traitement de par l'équilibre entre la division et la mort des cellules. La tolérance des persisters à l'isoniazide est en partie due à la sous-expression de la catalase-peroxydase (Wakamoto *et al.*, 2013). A travers ces quelques exemples, il apparaît qu'en réponse à un stress, la sur- ou sous-expression d'un ou plusieurs gènes conduit à un phénomène de tolérance voire à une résistance temporaire à un stress. Ces niveaux d'expression sont héréditaires sur plusieurs générations par épigénétique mais restent instables comparés à une modification génétique (Adam *et al.*, 2008).

1.2 Etude bibliographique

D'autres mécanismes plus inhabituels conduisent aussi à la survie partielle d'une population bactérienne et au phénomène de persistance bactérienne. Par exemple, des erreurs dans la traduction des ARNm en protéines chez *Mycobacterium smegmatis* la rendent tolérante à la rifampicine (Javid *et al.*, 2014). Il a aussi été montré chez *E. coli* que les débris cellulaires de bactéries lysées par l'ampicilline recouvrent la surface des bactéries encore viables et les protègent de l'action de l'antibiotique, en formant une matrice similaire à celle des biofilms (Podlesek *et al.*, 2016).

1.2.5.5 Conclusions

Les persisters ne sont donc pas composés d'un seul phénotype mais forment plutôt un ensemble hétérogène et redondant de phénotypes et de mécanismes sous-jacents (Kyle R. Allison *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015; Kaldalu *et al.*, 2016). Selon leur nature, les persisters sont tolérants à un stress particulier ou à un ensemble de stress. Les persisters se forment préalablement au traitement antibiotique, aléatoirement, en réponse à des conditions environnementales ou sont induits par l'antibiotique lui-même. Les dynamiques de formation des persisters dans une population bactérienne sont donc difficiles à prédire car elles dépendent de phénomènes aléatoires, des conditions environnementales et des mécanismes de formation des persisters. Ces dynamiques sont d'autant plus complexes dans les biofilms où l'environnement est spatialement hétérogène. C'est pourquoi une partie de cette thèse (les chapitres 3 et 4) s'intéresse à la dynamique de formation des persisters en fonction des conditions environnementales et de l'influence de cette modification physiologique sur la résilience aux antibiotiques des biofilms.

1.2.6 La modélisation numérique des biofilms

Les biofilms et la persistance bactérienne sont des phénomènes hétérogènes dans l'espace et dans le temps. Dans cette situation, la modélisation numérique est un outil intéressant, car elle permet de compléter les approches expérimentales classiques en microbiologie et de tester des hypothèses qui nécessiteraient des moyens expérimentaux conséquents pour les vérifier. Cependant, les modèles numériques ne constituent pas à eux seuls une preuve des hypothèses émises. Les approches de modélisation numériques et d'expérimentation microbiologique sont complémentaires. Idéalement, des échanges se mettent en place entre les expériences réelles et la formalisation théorique (le modèle) afin de répondre à la problématique de recherche (Szekely and Burrage, 2014).

1 Introduction

Différents modèles numériques de biofilms, mathématiques, individu-centrés (IC) et des automates cellulaires ont été proposés depuis plus d'une dizaine d'années. Ces modèles permettent de prendre en compte l'hétérogénéité spatiale des biofilms et sont utilisés pour étudier la déformation de la structure des biofilms en fonction du flux, leurs mécanismes de résistance et de tolérance ou encore les interactions sociales dans les biofilms (Esser *et al.*, 2015).

Les modèles mathématiques de biofilm reposent uniquement sur des équations différentielles. Ils ont notamment été développés pour étudier le quorum-sensing (Emerenini *et al.*, 2015) ou optimiser le traitement antibiotique des biofilms (Imran and Smith, 2014; Szomolay and Cogan, 2015). Ils sont efficaces pour représenter le comportement global des biofilms mais s'avèrent limités pour représenter en détail l'hétérogénéité des populations bactériennes et l'individualité des cellules. Ils sont peu adaptés à l'étude des phénomènes émergents d'interactions au niveau cellulaire. Les automates cellulaires reposent sur des équations différentielles ainsi que sur des algorithmes de diffusion-réaction. Ce sont des modèles en deux ou trois dimensions spatiales discrétisées, c'est-à-dire que l'espace y est divisé en pixels (2D) ou voxels (3D). Chaque pixel contient des solutés et de la biomasse qui se déplacent aux pixels voisins selon différentes règles (Laspidou *et al.*, 2012; Skoneczny, 2015). La biomasse est représentée par sa densité dans chaque pixel et les cellules n'ont pas de représentation physique. Le biofilm se forme par diffusion de la biomasse d'un pixel à l'autre au fur et à mesure de la croissance cellulaire. Ce type de modèle inclue une hétérogénéité spatiale et phénotypique plus fine que les modèles purement mathématiques. Cependant, l'architecture du biofilm dépend des règles de déplacement de la biomasse implémentées dans le modèle, règles souvent définies de manière plus ou moins intuitive.

Les modèles individu-centrés (IC) de biofilms reposent sur des équations différentielles, des algorithmes de diffusion-réaction et des règles régissant les interactions entre cellules. L'espace y est discrétisé en ce qui concerne la diffusion-réaction des solutés. Cependant, contrairement aux automates cellulaires, chaque cellule est physiquement représentée par un cercle (2D), une sphère (3D) ou plus rarement une géométrie filiforme (Smith *et al.*, 2017). Les cellules croissent, se divisent et se repoussent les unes les autres, conduisant à la croissance et à l'expansion du biofilm. Les modèles IC fournissent une représentation spatiale des biofilms plus fidèle à la réalité que les automates cellulaires, bien qu'en réalité les bactéries ne soient pas vraiment des sphères rigides mais soient plutôt spongieuses et déformables (Laspidou *et al.*, 2010). L'avantage des modèles IC est que chaque bactérie est une entité unique et que la formation du biofilm émerge des actions des cellules

1.2 Etude bibliographique

individuelles. Ce type de modèle est donc idéal pour représenter l'hétérogénéité d'une population bactérienne (Ferrer *et al.*, 2008), une caractéristique cruciale dans la réponse d'une population face à une perturbation. La modélisation individu-centrée des biofilms se développe depuis plusieurs années et des cadres servant de base à leur développement sont disponibles dans la littérature (Kreft *et al.*, 2001; Xavier *et al.*, 2005; Lardon *et al.*, 2011). Des modèles IC de biofilms ont été utilisés pour étudier l'émergence de structures spatiales en fonction des conditions environnementales (Nadell *et al.*, 2010; Ghanbari *et al.*, 2016), la compétition entre espèces (Xavier *et al.*, 2005), la coopération entre cellules (Mitri *et al.*, 2011) ou encore des mécanismes de protection des biofilms face aux antibiotiques (Chambless *et al.*, 2006). Par exemple, Ghanbari *et al.* (2016) ont identifié les conditions d'inoculation et de substrat nécessaires à la formation de structures en champignon dans les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*.

La modélisation mathématique est utilisée dans les chapitres 2 et 3 pour représenter des dynamiques de populations entre différents types de cellules (sensibles, mutants, persisters) dans des environnements homogènes, c'est-à-dire avec des concentrations en solutés et en biomasse homogènes dans un même espace. La modélisation individu-centrée est utilisée au chapitre 4 pour représenter la formation d'un biofilm bactérien au sein duquel les cellules changent de phénotype entre sensible et persister selon leur microenvironnement.

1.3 Objectifs et déroulement de la thèse

Le but de cette thèse est de former les bases de la résilience aux antibiotiques des biofilms bactériens.

Afin de répondre à cette problématique, cette thèse a trois objectifs de recherche :

- (i) Clarifier et formaliser le concept de résilience dans le cadre d'une population bactérienne soumise à des antibiotiques.
- (ii) Déterminer l'influence des conditions environnementales sur la formation des persisters en utilisant une approche mixte de modélisation mathématique et d'expérimentation.
- (iii) Etudier l'influence de la persistance bactérienne sur les capacités de survie et de régénération des biofilms bactériens en utilisant un modèle individu-centré.

Ces trois objectifs correspondent chacun à un article de cette thèse :

- Le manque d'un cadre formel du concept de résilience aux antibiotiques en microbiologie a conduit à l'écriture du premier article. Son but est de formaliser les concepts de résilience et de résistance afin de les utiliser dans le contexte d'une population bactérienne soumise à un traitement antibiotique. Afin d'alimenter ces concepts pour ce contexte, notre travail s'inspire de définitions issues de l'écologie et de la socio-écologie, où le concept de résilience fait débat depuis de nombreuses années. Les mécanismes biologiques impliqués dans la résilience aux antibiotiques des populations bactériennes sont examinés et intégrés dans un modèle mathématique qui sert d'illustration à la démarche proposée.
- De ce premier article ressort que le phénomène de persistance bactérienne semble particulièrement important dans la résilience des populations bactériennes. Ce phénomène est affecté par les conditions environnementales. Or, celles-ci sont spatialement hétérogènes dans les biofilms, ce qui rend la dynamique de formation des persisters à l'intérieur difficile à déterminer. Ces limitations conduisent au deuxième article dont le but est de déterminer l'influence des conditions environnementales sur la formation des persisters. Pour cela, nous utilisons une approche mixte entre expérimentation et modélisation mathématique. Nous développons des modèles qui relient les transitions phénotypiques entre cellules sensibles et persisters aux concentrations en substrat et en antibiotique. Ces modèles sont calibrés à partir de données expérimentales obtenues avec des

1.3 Objectifs et déroulement de la thèse

cultures planctoniques mais ils peuvent être utilisés dans des contextes où les conditions environnementales sont spatialement hétérogènes tels que dans les biofilms.

- Le troisième article a pour but d'étudier l'influence de la persistance bactérienne sur la capacité des biofilms à croître, survivre et se régénérer à la suite de traitements antibiotiques. Pour cela, nous développons un modèle individu-centré de biofilm comprenant différentes stratégies de transitions phénotypiques entre cellules sensibles et persisters. Nous simulons ensuite la croissance et le traitement antibiotique de biofilms.

La discussion générale synthétise la contribution de cette thèse à la résilience aux antibiotiques des biofilms bactériens et suggère la mise en place d'expériences *in vitro* pour comparer à terme les données expérimentales aux résultats de simulation du modèle individu-centré. Cette thèse ouvre des perspectives sur l'utilisation du concept de résilience aux antibiotiques en santé et sur la cartographie des transitions entre cellules sensibles et persisters de diverses souches bactériennes. Elle apporte également une réflexion sur le type de modèle numérique à utiliser lorsque le sujet d'étude est, comme les populations bactériennes, un système biologique évolutif.

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

Présentation de l'article

La résilience aux antibiotiques : un besoin de clarification

La résilience et la résistance sont considérées comme complémentaires en écologie. Ces deux concepts forment deux aspects de la réponse d'un système à une perturbation. La résistance dépend du degré de sensibilité par rapport à la perturbation considérée. La résilience dépend de la dynamique de la réponse du système une fois perturbé. De ces deux concepts, le terme de résilience aux antibiotiques est très peu répandu en comparaison du terme de résistance aux antibiotiques. Si la résistance aux antibiotiques peut effectivement être vue comme l'insensibilité à un antibiotique, qu'est-ce que la résilience aux antibiotiques ? En bactériologie, des termes autres que la résilience sont utilisés comme la persistance, la récalcitrance, l'hétérorésistance ou encore la tolérance aux traitements antibiotiques. Ces notions font référence à différentes façons dont un système biologique répond à un traitement antibiotique et elles font partie du concept plus global de résilience. Une formalisation du concept de résilience est nécessaire pour clarifier son rôle dans la réponse des populations bactériennes aux antibiotiques et pour la distinguer de la résistance.

C'est pourquoi le premier objectif de cette thèse, traité dans cet article, est de formaliser le concept de résilience aux antibiotiques des populations bactériennes. Pour ce faire, nous avons analysé des paradigmes et définitions du concept de résilience issus des domaines de l'écologie, de l'écologie microbienne et de la socio-écologie, où le concept de résilience s'est développé considérablement sans pour autant faire consensus. La formalisation proposée est applicable dans le cadre d'une population bactérienne soumise à des antibiotiques, que cette population soit planctonique ou en biofilm.

Contributions

Cet article est actuellement soumis à *PLoS ONE*. Les principales contributions de cet article sont :

- Une analyse des définitions de la résilience en écologie microbienne, écologie et socio-écologie.
- La proposition d'une approche pour formaliser une problématique de résilience : (i) définir le cadre spatial et temporel du système étudié, (ii) choisir une propriété d'intérêt par rapport à laquelle la résistance et la résilience seront considérées, (iii) choisir les perturbations à prendre en compte, en type, intensité, durée et fréquence, (iv) identifier les mécanismes qui influencent la résistance et la résilience de la propriété d'intérêt considérée contre les perturbations définies dans les contraintes du système défini.
- L'application de cette approche au cas d'une population bactérienne soumise à des antibiotiques. Des mécanismes biologiques sont identifiés comme influençant la résistance ou la résilience d'une propriété d'intérêt, choisie comme une concentration minimale de biomasse.
- L'illustration de l'approche proposée par un modèle mathématique incluant les mécanismes de persistance bactérienne, de mutation et d'hétérogénéité spatiale.

Conclusions

Considérer la résistance et la résilience relativement à une propriété d'intérêt permet de formaliser ces concepts dans une variété de contextes. La résistance est alors considérée comme la capacité à maintenir cette propriété malgré des perturbations ; et la résilience comme la capacité à retrouver cette propriété après l'avoir perdue suite à une perturbation. En écologie microbienne, cette propriété est le plus souvent un ensemble de fonctions ou une composition d'une communauté bactérienne. Dans notre cas - une population bactérienne soumise à des antibiotiques et une biomasse minimale comme propriété d'intérêt - des changements dans la composition et les fonctions de la population ne sont plus synonymes de manque de résilience mais au contraire contribuent potentiellement à la résilience de la propriété d'intérêt, la biomasse. Cette définition permet d'intégrer la notion d'adaptation et le développement de résistances aux antibiotiques.

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

Dans le modèle mathématique utilisé, simulant un traitement antibiotique d'une population, la persistance bactérienne augmente nettement la résilience de la biomasse pour une large gamme d'intensité et de durée de traitement. De manière non-intuitive, l'hétérogénéité spatiale augmente la résilience quand considérée isolément mais diminue la résilience d'une population persistante. Le modèle mathématique simple développé met à jour des liens non-évidents entre les mécanismes à l'échelle cellulaire et la résilience de la biomasse, au niveau d'une population.

Formalizing the concepts of resistance and resilience to identify mechanisms that drive the survivability of bacterial populations faced with antibiotics

Gabriel Carvalho^{1*}, Damien Balestrino², Christiane Forestier², Jean-Denis Mathias¹

¹UR LISC Laboratoire d'ingénierie pour les systèmes complexes, IRSTEA, Aubière, France

²LMGE, UMR6023 CNRS, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Although the concepts of resistance and resilience are widely developed in the fields of ecology, socio-ecological systems and gaining interest in microbial ecology, they have not yet reached a consensus. This paper formalizes these concepts in the case of a bacterial population faced with antibiotics. We choose a recent approach based on a property of interest of the system studied. This approach allows a system to change its state and focuses on the resilience of particular properties. Considering the maintenance of a minimum threshold of viable biomass as the property of interest of a bacterial population, we review several mechanisms that allow this property to be resistant or resilient to antibiotics. We illustrate our approach with a mathematical model that includes persisters, mutants and a sanctuary. Simulation results show that the resistance and resilience of the bacterial population's biomass to antibiotics are greatly affected by these three mechanisms.

2.1 Introduction

The emergence of multidrug-resistant bacteria, the persistence of infections owing to persister cells, and the recalcitrance of biofilms to antibiotic treatments are all evidences of the adaptability of bacterial populations (Cohen *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2013). Multidrug-resistance is currently a major challenge for the scientific community (Levy and Marshall, 2004). In other cases, bacterial adaptation can be desirable and buffers human impact on ecological processes (Griffiths and Philippot, 2013). Studying how bacteria cope with change and adapt to fluctuating and stressful environments is crucial to understand their evolution and the emergence of new properties in bacterial populations. Many

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

studies report how bacterial populations resist or are resilient when faced with diverse stresses, by using various phenotypic and genetic mechanisms (Poole, 2012; Sánchez-Romero and Casadesús, 2014; Olsen, 2015). However, resistance and resilience can take many meanings.

The resilience-based framework, initially developed by Holling (1973), suggested numerous concepts and ideas to structure the reactions of systems to disturbances. However, the concepts used, mainly resistance and resilience, are vague and potentially conflicting if they are not clearly defined (Brand and Jax 2007; Flood and Schechtman 2014). Indeed, ecology and socio-ecology have assigned various definitions to resistance and resilience. For instance, resistance can be “staying essentially unchanged despite the presence of disturbances” and resilience “returning to the reference state (or dynamic) after a temporary disturbance” (Grimm and Wissel, 1997). Elsewhere, Walker et al. (2004) define resilience as “the capacity of a system to absorb disturbance and reorganize while undergoing change so as to retain essentially the same function, structure, identity and feedback”. In microbiology, the concepts of resistance and resilience are mostly used in microbial ecology. The focus is usually on the capacity of microbial communities to conserve or recover their pre-disturbance species composition after a shock (Shade, Peter, *et al.*, 2012). Different definitions may be more suitable depending on the objectives set. Formal approaches may be useful to clarify those concepts, especially for mathematical modelling. In socio-ecology, the viability theory has been used recently to mathematically formalize the resilience framework (Martin, 2004; Deffuant and Gilbert, 2011; Rougé *et al.*, 2013). This viability-based framework of resilience focuses on the recovery and maintenance of properties of interest instead of pre-disturbance states. It has allowed the formalization of other concepts such as reliability for avoiding the collapse of a system (Rougé *et al.*, 2014), flexibility for evaluating the number of viable options in terms of controllability (Mathias *et al.*, 2015) and vulnerability for evaluating future damages due to uncertainties (Rougé *et al.*, 2015). It has also been applied in many domains, fisheries (Brias *et al.*, 2016), wireless sensor node (Kone *et al.*, 2017), social networks (Mathias, Lade, *et al.*, 2017) and climate change (Mathias, Anderies, *et al.*, 2017). Independently, in microbial ecology, Song et al. (2015) recently proposed resilience as the recovery of a function of interest.

In an attempt to formalize the concepts of resistance and resilience in the case of a bacterial population faced with antibiotics, we reviewed the concepts of resistance and resilience used in the fields of socio-ecological systems and microbial ecology. Defining resistance and resilience relative to a function or property of interest should make it

2.2 Formalizing the concepts of resistance and resilience

possible to identify key biological mechanisms influencing the resistance and resilience of these properties. Choosing to maintain a population's biomass above a minimum threshold as the property of interest, we reviewed the bacterial mechanisms that influence the resistance and resilience of this property. To illustrate our approach and evaluate the importance of phenotypic and spatial heterogeneities, we implemented some of these mechanisms in a mathematical model of a bacterial population subjected to antibiotic shocks. We assessed the resistance and resilience of the property of interest of the simulated bacterial population - here, the viable biomass - to various intensities and durations of disturbance.

2.2 Formalizing the concepts of resistance and resilience

The resilience concept is widely developed in the field of socio-ecology and has various meanings. In microbial ecology, the use of this concept is more recent and tends to be more applied due to experimental constraints. To have a global view of resilience, we review concepts from both fields.

2.2.1 Concepts from socio-ecological systems

Resistance has similar definitions in the literature. Usually, it is the amount of disturbance that is needed to disrupt a system (Carpenter *et al.*, 2001), or “the ease or difficulty of changing the system” (Walker *et al.*, 2004). Resilience, however, can take fundamentally different meanings. Holling (1996) differentiates two kinds of resilience: engineering resilience and ecological resilience. Engineering resilience is the speed with which a set of given variables recovers after a disturbance. This definition assumes a single equilibrium and does not take into account possible shifts in system behaviors. In contrast, ecological resilience is the amount of disturbance a system can tolerate before it shifts to an alternative regime with different properties. It assumes that ecological systems can have multiple equilibria and shift from one to another under the effect of disturbances. Resilience is characterized by the size of the system's basin of attraction, i.e. the set of states from which the system tends to a unique equilibrium, also called a stable state or attractor (Walker *et al.*, 2004; Gallopín, 2006). From the concept of ecological resilience, Walker *et al.* (2004) define resilience as “the capacity of a system to absorb disturbance and reorganize while undergoing change so as to retain essentially the same function,

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

structure, identity and feedback". As so defined, being resilient thus means not losing the properties that represent the system's function, structure, identity and feedback. However, these properties may be difficult to define in practice. In addition, how the system can reorganize and adapt without losing any of those properties is not straightforward.

Carpenter et al. (2001) add that it is necessary to specify what is resilient to what disturbances: "resilience of what to what?" To be operational, it is necessary to state clearly which properties of a system we take into account, and what are the disturbances we consider. Hence, resilience is not the resilience of a whole system (function, structure, identity and feedback) but the resilience of a restricted number of properties chosen depending on our goals and assumptions. This has also been called specific resilience (Folke *et al.*, 2010). For Folke (2006), resilience is more useful as an abstract approach. He differentiates between ecological resilience, focused on the persistence of different equilibria, and socio-ecological resilience, focused on adaptation, transformation, learning and innovation. He states that "the resilience approach is concerned with how to persist through continuous development in the face of change, and how to innovate and transform into new more desirable configurations". In this view, disturbances are necessary to create opportunities and recombination, themselves necessary for systems to evolve.

The viability-based framework of resilience, which is not specific to socio-ecological systems, is oriented toward a property of interest instead of attractors (Martin *et al.*, 2011). Unlike specific resilience, which is centered on attractors, viability-based resilience is defined as the capacity to recover and maintain a property of interest after a disturbance (Rougé *et al.*, 2013), implying that this property has been lost at some point. Systems can adopt various distinct behaviors, stable or not, and still be resilient as regards the chosen property of interest. The capacity of a system to change its behavior, i.e. its composition and interactions, is even a key factor of resilience. Mathematically, the resilient states of the system are the states from which the system can recover and maintain the property of interest in a given time.

Different meanings of resilience are schematized in Figure 2.1. Two main streams emerge from the socio-ecological literature on resistance and resilience. One focuses on the speed of recovery (engineering resilience) or maintenance (ecological resilience) of a reference state, and the other on the resilience of properties of interest that can be lost and recovered and allows changes in the system's state. In field studies, we have to choose what to measure, depending on our goals. To be operational, we have to take into account a restricted number of properties that we deem of interest. Differentiating resistance and resilience by the capacity to maintain or recover these properties allows a clear

2.2 Formalizing the concepts of resistance and resilience

mathematical definition and differentiation. According to Folke (2006), adaptation, transformation, innovation and changes in equilibrium and system dynamics are part of resilience and can all be used to maintain or recover the property of interest. It also maintains the need to specify “resilience of what to what?” argued by Carpenter et al. (2001). A property of interest seems to be the most useful element to formalize the concepts of resistance and resilience and to relate them to biological mechanisms. The focus of viability-based resilience is on the main mechanisms that are able to maintain or recover the property of interest defined for the system studied.

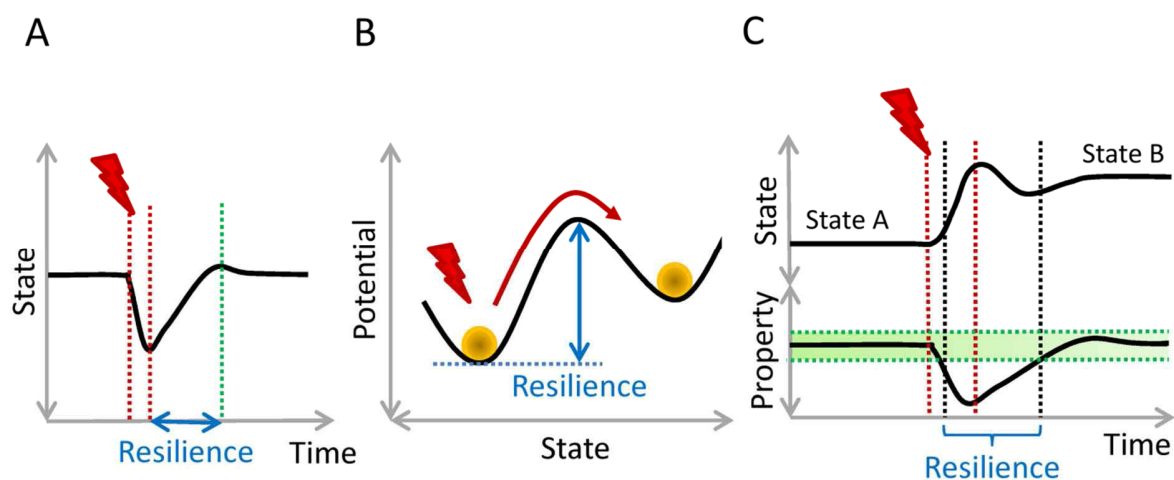


Figure 2.1: Different meanings of resilience.

Red lightning: disturbance. (A) Engineering resilience: time necessary to recover the initial state after disturbance. (B) Ecological resilience: amount of disturbance necessary to shift the system to a different state. (C) Viability-based resilience: capacity to recover and maintain a property of interest (here the green shaded area) after having lost it. The state of the system may change. Here, the system moves from state A to state B, both desirable as they maintain the property of interest.

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

2.2.2 Concepts from microbial ecology

Concepts derived from ecology and socio-ecological systems are increasingly used in microbiology and in particular in microbial ecology. In microbiology, disturbances take the form of stresses such as antibiotics, biocides, pollutants, low pH, high temperatures and substrate limitation. Studies of microbial communities usually concentrate on the resistance and resilience of the composition or the functions of communities faced with particular disturbances (Girvan *et al.*, 2005; Shade, Peter, *et al.*, 2012; Meola *et al.*, 2014). Shade *et al.* (2012a) published a review looking at resilience in the context of microbial ecology. They focused on community stability, and defined resistance as insensitivity to a disturbance and resilience as the time required for a community to recover its former composition and/or functions after a disturbance. However, the compositions and functions chosen vary greatly between studies owing to the great diversity of microbial communities. Other studies have discussed similar concepts to resistance and resilience such as the concept of robustness (Kitano, 2007), i.e. the capacity of a system to maintain its functions despite disturbances. In this meaning, robustness is a larger concept that depends on the resistance and resilience of the functions considered (Shade, Read, *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2015). Engineering resilience is often used in field studies, because of its applicability, but lacks the inherent plasticity of biological systems. Song *et al.* (2015) recently suggested grouping together ecological and engineering resilience by defining resilience as the recovery of a function of interest. This point of view is close to the viability-based view of resilience that defines resilience as the capacity to recover and maintain a property of interest (Martin *et al.*, 2011). If we elect to study resilience relative to a limited function or a property of interest, changes in system state may favor resilience, i.e. the recovery of this particular function or property. For example, if the function of interest is a substrate conversion rate, the community can vary its composition to recover this function and be considered resilient. If the property of interest is defined by a minimum amount of biomass, the community or population can vary its functions to recover this property. In this context, resilience as the capacity to recover a former community species composition is a particular case in which the property of interest defined is a particular community composition.

2.2 Formalizing the concepts of resistance and resilience

2.2.3 Defining a formal framework of resistance and resilience

We decided in this paper to take the common point of view of Martin et al. (2011) from socio-ecological science and of Song et al. (2015) from microbial ecology and to define resilience as the capacity to recover a property/function of interest after it has been completely or partially lost owing to a disturbance. We add resistance as the capacity to maintain the property/function of interest despite disturbances. The system is considered in a desirable state if it maintains the property of interest. The resistance and resilience concepts used with reference to a property of interest can be applied to other biological systems than microbial communities. The property chosen has just to be relevant for the system studied. For a bacterial population, this property could be a minimum biomass concentration, which is desirable from the point of view of bacteria or the conversion rate of a substrate to a product useful for humans. With this formalization, key biological mechanisms that influence resistance and resilience are those able to maintain or recover the property of interest while the system is dealing with the disturbances considered. The time scale of the study should also be considered since a property can be judged resilient or not according to the time it takes to recover it.

Thus, to formalize a problem with the concepts defined, we (i) have to define the spatial and temporal boundaries of the system studied (Carpenter *et al.*, 2001), (ii) choose which property of interest we want to be resistant and resilient, (iii) choose which disturbances to take into account and (iv) select the mechanisms that influence the resistance and resilience of the property of interest against the disturbances considered in the boundaries of the system studied. For example, (i) the system could be a bacterial biofilm on a surface of a few square millimeters observed over a few days, (ii) the property of interest could be maintaining a quantity of viable biofilm biomass (X) above a certain threshold ($X > X_{min}$), (iii) disturbances could be increases in flow turbulence over a few hours and (iv) the relevant mechanisms could be the composition of the biofilm matrix, quorum sensing and growth rate (Figure 2.2).

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

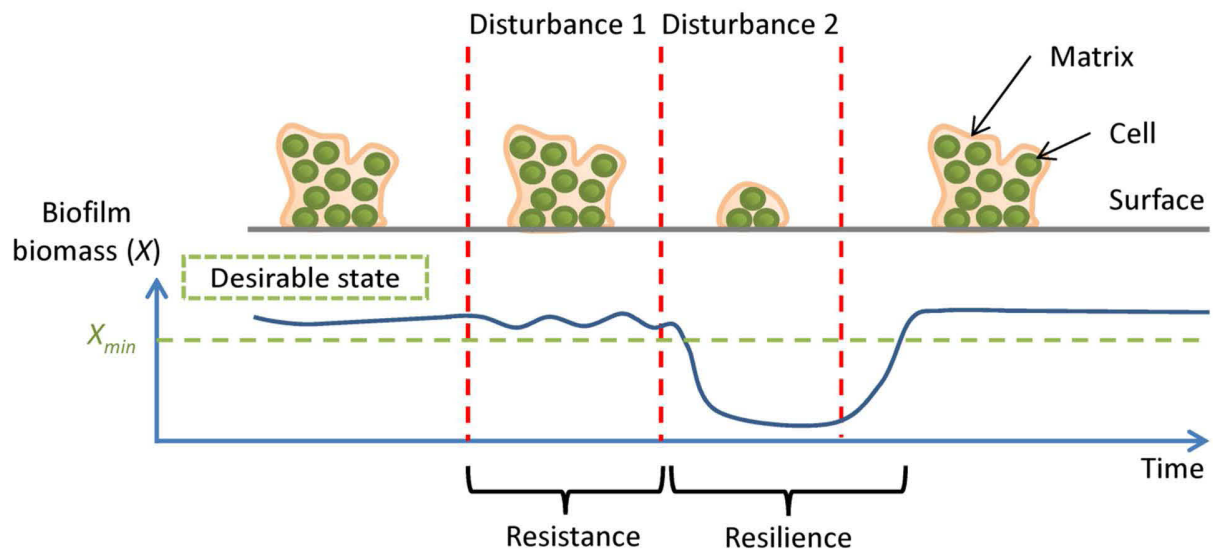


Figure 2.2: Behavior of a mature biofilm toward disturbances.

System: mature biofilm on a surface of $x \text{ cm}^2$ observed over a few days. Property of interest: total viable biomass X above a certain threshold X_{min} . Disturbances: short increase in shear forces of low (Disturbance 1) or high (Disturbance 2) intensity. Mechanisms: biofilm structure, matrix composition, quorum sensing etc. The property resists Disturbance 1, i.e. $X > X_{min}$ is maintained. The property is resilient to Disturbance 2, i.e. the system recovers a desirable state after having lost the property. The post-disturbance state may have the same characteristics as the initial one or switch to a new configuration (e.g. a denser matrix).

2.3 Relating resistance and resilience concepts to concrete bacterial mechanisms

2.3.1 Formalizing the problem of a bacterial population facing antibiotics

We want to study the capacity of a bacterial population to overcome antibiotic shocks. According to the guidelines defined in the previous section, (i) the system is a bacterial population in a restricted space, such as a liquid culture of a few milliliters fed with nutrients, and observed over several days. (ii) The property of interest chosen is the maintenance of a viable biomass (X) above a minimum threshold (X_{min}), $X > X_{min}$. We assume that $X > X_{min}$ is representative of the optimal proliferation of cells and so advantageous for bacteria. Other properties may be chosen. The methodology would remain the same but the relevant mechanisms to be considered and the results of the study would be affected thereafter. (iii) The disturbances are shocks of antibiotics of different durations, typically a few hours, and intensities, i.e. ranging from sub-lethal to high concentrations of antibiotic. (iv) Resistance is supported by mechanisms that allow the population to keep its viable biomass above X_{min} despite antibiotic shocks, i.e. mechanisms that prevent or limit bacterial death. Resilience is supported by mechanisms that allow the population to partially survive ($X < X_{min}$) and recover a desirable state.

Within this framework, to be resistant, the great majority of cells in the populations have to be insensitive to the antibiotic during the shock. Resistant bacteria are mostly formed by the generation of genetic variants in the population, i.e. of genetic heterogeneity. To be resilient, only a sub-part of the population needs to survive if it is able to reform the whole population later. This sub-population can be formed by permanently insensitive mutants, by reversible tolerant phenotypes or by spatially protected places. In this context, mechanisms involved in resistance and resilience can be categorized into mechanisms that generate genetic phenotypic heterogeneity, non-genetic phenotypic heterogeneity and spatial heterogeneity. The impact of the different mechanisms that influence the resistance and resilience of the bacterial population's biomass is shown in Table 2.1 and detailed below.

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

Table 2.1: Mechanisms that influence resistance and resilience.

The system is a bacterial population subjected to antibiotics. The property of interest is the maintenance of a minimum threshold of biomass. In this framework, resilience mechanisms are mainly based on a heterogeneous response of the population to disturbances. They are very efficient for short disturbances. Resistance needs a population mainly composed of resistant cells. Such a population results from the formation and proliferation of resistant genetic variants. Resistance mechanisms are efficient for long or permanent disturbances. However, resistant cells are formed at a lower rate than tolerant cells and may be less appropriate for short disturbances.

Mechanism	Resistance	Resilience	Comment
Mutation	+++	+	Selection of resistant mutants under stress, low probability.
Stress-induced mutation	+++	+	Production of resistant mutants under stress, low probability.
HGT	+++	+	Acquisition of resistance genes.
Dormancy	+	+++	Survival and recovery after stress.
Bacterial persistence	+	+++	Survival and quick recovery after stress.
Phenotypic heterogeneity	+	+++	Survival and recovery after stress.
Stress-responses	++	++	Survival and recovery after stress.
Modularity	++	++	Resistance or resilience depends on the reactivity and efficiency of cells to rearrange their metabolic network.
Concentration gradients	++	++	Partial survival of susceptible cells. Increased resistance development.
Sanctuaries	++	++	Survival and recolonization. Increased resistance development.
Biofilms	+++	+++	Greatly increased survival.

2.3 Relating resistance and resilience concepts to concrete bacterial mechanisms

2.3.2 Genetic phenotypic variability

Bacterial resistance is usually the insensitivity of a cell to a particular stress such as an antibiotic (Levy and Marshall, 2004; Baquero *et al.*, 2013; Vuotto *et al.*, 2014). Resistance mechanisms are supported by resistance genes and are permanently expressed by a cell. Genetic variability can lead to the formation of resistant phenotypes in a bacterial population. A population of cells resistant against an antibiotic will be able to continue growing in its presence. The biomass of the population will resist the disturbance. If just a sub-population of bacteria developed resistance mechanisms, they would survive during the disturbance and allow the population's biomass to be resilient. The new-formed population's biomass would then be resistant to the disturbance it has been subjected to. However, resistance mechanisms often come with a fitness cost (Sandoval-Motta and Aldana, 2016). A resistance mechanism may not be stable over time without environmental pressure.

Resistance mechanisms can be intrinsic or acquired by various processes (Sandoval-Motta and Aldana, 2016). Mutations and horizontal gene transfer (HGT) are ways to create genotypic variants in originally clonal populations (Darmon and Leach, 2014). Mobile genetic elements produce new phenotypes by rearranging genomes without the need to modify genes by mutation. Mutation rates can be increased under stress. Stress-induced mutations boost the evolvability of bacterial populations (Galhardo *et al.*, 2007). Having high mutation rates under stress may be a good compromise between fitness and adaptation capacities (Rosenberg *et al.*, 2012). It was recently observed that under sub-inhibitory concentrations of ciprofloxacin, *Escherichia coli* can form multinucleated filaments with high mutation rates, leading to the budding of moderately resistant bacteria (Bos *et al.*, 2015). This shows that stresses can induce the formation of resistant cells and not merely select pre-existent resistant bacteria. In their theory of facilitated variation, Gerhart and Kirschner (2007) propose that phenotypic plasticity, which favors adaptability, can be selected during the evolution of a species, thereby increasing the chance that random mutations effectively lead to operational phenotypes.

2.3.3 Non-genetic phenotypic variability

2.3.3.1 Dormant cells

Bacteria can enter dormant states that enable them to survive for long periods of time in unfavorable conditions. Cells can go through phenotypic changes leading to dormancy such as carbon storage, cell wall remodeling, reduced growth and transcription

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

(Rittershaus *et al.*, 2013). Spores are the most obvious form of bacterial dormancy. However, other types of dormant cells, such as viable but non-cultivable cells (VBNCs), can be found. VBNCs, like spores, usually need specific conditions, such as the presence of quorum-sensing molecules or an increase in temperature, to resume growth (resuscitate) (Li *et al.* 2014). Dormant states are tolerant to various stresses lethal for regular cells. Dormancy can allow partial survival and biomass resilience when they resume growth.

2.3.3.2 Bacterial persistence

Persister cells (or persisters) are a sub-population of stress-tolerant bacterial cells in a susceptible isogenic population. They confer what is usually called bacterial persistence (Kint *et al.*, 2012; Balaban *et al.*, 2013). Persisters are mostly described as a dormant-like phenotype, a specialized phenotype designed to survive. However, unlike most dormant cells such as VBNCs, persisters can resume growth spontaneously on standard media and reform colonies after stress removal. This small difference makes the distinction between VBNCs and persisters somewhat tenuous (Ayrapetyan *et al.*, 2014a). Persisters can be formed by stochastic switches in the equilibrium of toxin/antitoxin modules (Fasani and Savageau, 2013; Gelens *et al.*, 2013). They can be induced by stressful conditions such as entry into stationary phase or produced randomly regardless of environmental conditions (Balaban *et al.*, 2004). However, recent reviews emphasize that persisters do not comprise one single phenotype but, rather, are heterogeneous (Kint *et al.*, 2012; Zhang, 2014). It is noteworthy that persisters are tolerant and not resistant to stresses. Unlike resistance, a genetic feature that provides a continuous protection against a stress, tolerance is induced by reversible phenotypic variations and general stress responses (Olsen, 2015). Persisters may survive under antibiotic shocks but the post-disturbance population will still be susceptible.

2.3.3.3 Other tolerant phenotypic variants

In addition to persisters, heterogeneity in enzyme production or in efflux pump activity has been reported to induce heterogeneous stress tolerance in bacterial populations (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014; Wang *et al.*, 2014). Phenotypic heterogeneity allows bacterial populations to adopt a “bet-hedging” strategy in unpredictable environments, increasing the chances that a part of the population will survive disturbances and ultimately achieve biomass resilience (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014; Vega and Gore, 2014; Wang *et al.*, 2014). Some papers point out a possible link between resilience and antibiotic resistance in microbiology (Cohen *et al.*, 2013; Sandoval-Motta and Aldana, 2016). For example, bacterial populations can survive repeated

2.3 Relating resistance and resilience concepts to concrete bacterial mechanisms

exposure to antibiotics owing to tolerant cells. This may give them enough time to develop resistance mechanisms.

Phenotypic heterogeneity is partially due to intrinsic cell noise. Noise is inherent uncertainty, randomness, at the molecular level. Fluctuations in transcription (Lv *et al.*, 2014), gene copy number, location of genes, promoter regions and mutation all affect gene expression and can randomly vary from cell to cell. Cells possess tools for reducing noise, such as the histone variant H2A.Z, negative feedback loops and functional redundancy (Richard and Yvert, 2014). Although they can reduce noise, bacterial populations may take advantage of the randomness at the molecular level to create phenotypic heterogeneity. Phenotypes may be inherited for some generations of cells for example with epigenetic mechanisms such as methylation (Sandoval-Motta and Aldana, 2016).

2.3.3.4 Bacterial stress responses

Numerous bacterial stress responses have been studied and reviewed (Poole, 2012). The stringent response and the SOS response, induced respectively by substrate limitation and DNA damage, are the most commonly documented stress responses. Stress responses have been reported to be involved in the formation of persisters. Stationary phase, starvation or low antibiotic concentrations can increase the level of persisters in bacterial populations (Kint *et al.*, 2012), pointing to the involvement of stress responses in bacterial persistence. Stress responses can increase the survivability of a population facing a disturbance apart from the preexisting phenotypic heterogeneity.

2.3.3.5 Modularity

The physicochemical properties of the environment can shape the distribution of the regulatory potential among cell functions and allow bacteria to adapt to various habitats without changing their genome (Fernandez *et al.*, 2014). Bacteria evolving in fluctuating environments tend to develop modular metabolic networks and so increase their flexibility toward environmental change (Parter *et al.*, 2007) and their evolvability (Crombach and Hogeweg, 2008). Metabolic networks may change their shape in response to disturbances such as antibiotic shocks to compensate for their negative effects.

2.3.4 Spatial heterogeneity

One way to survive a stress is simply to avoid it. A disturbance is usually not spatially homogeneous. After the removal of an antibiotic, cells which survived in undisturbed locations can repopulate sterilized ones (Baho *et al.*, 2012; Hershkovitz and Gasith, 2013; König *et al.*, 2016). If a location remains disturbed, bacterial populations can also

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

recolonize it by adaptive radiation (Rainey *et al.*, 1998). Concentration gradients and compartmentalization or sanctuaries, i.e. places less affected by disturbances, provide bacterial populations with protected areas where they can survive and develop resistance mechanisms (Zhang *et al.*, 2011; Hermsen *et al.*, 2012).

2.3.5 Biofilms: boosting phenotypic and spatial heterogeneity

A biofilm is composed of bacteria agglomerated in a matrix of extra-polymeric substances. This mode of development allows bacteria to be grouped in a particular place and behave collectively in a more complex way than their planktonic counterpart. Being organized in biofilms allows bacteria to overcome harsh environments that their planktonic counterparts could not (Römling and Balsalobre, 2012). Biofilms enhance the survivability of bacterial populations by a variety of mechanisms that include limited diffusion of solutes, slow growth rates and increased mutation rates and genetic exchanges (Jolivet-Gougeon and Bonnaure-Mallet, 2014; Vega and Gore, 2014; Olsen, 2015). Synergistic interactions and cooperation in multi-species biofilms can also affect the overall susceptibility of a bacterial community (Lee *et al.*, 2014; Vega and Gore, 2014). In addition, the spatial heterogeneity of mature biofilms leads to various phenotypes depending on the position of a bacterium in the biofilm. Even when the environment is favorable at the surface of the biofilm, some bacteria are stressed by substrate limitation, metabolite accumulation or pH inside the biofilm. Consequently, the response of a biofilm to a disturbance is complex and often increases the resistance and resilience of its biomass.

2.4 Illustrating the formalization of resistance and resilience with a mathematical model

2.4.1 From a formal framework to a mathematical model

In section 3, phenotypic and spatial heterogeneities appeared to be important factors influencing biomass resistance and resilience to antibiotics. To illustrate our formal approach and investigate the impact of mechanisms able to generate such heterogeneities we included some of them in a mathematical model. First, we need to provide some further details about the system defined in part 2.3.1.

- (i) The system modeled is a continuous bacterial culture in a perfectly mixed bioreactor that works like a chemostat with a dilution rate D . It is constantly fed with a substrate at a concentration S_i . Solute concentrations are assumed to be homogeneous. The bioreactor contains a bacterial population of susceptible “normal” cells (N) that grows at a rate μ . The bioreactor is run until it reaches equilibrium and for four days after an antibiotic shock.
- (ii) The property of interest defined is a quantity of viable biomass X above a threshold X_{\min} . We set it at $X_{\min}=10^8\text{cell.ml}^{-1}$. This threshold is a bit under the maximum biomass concentration reached at equilibrium in the bioreactor. We chose it to be representative of the optimal proliferation of cells.
- (iii) The system is disturbed by introducing an antibiotic at a concentration A_i in the influent from sub-lethal to high concentrations for up to 20 hours. Normal cells can be killed by the antibiotic at a rate k .
- (iv) We implemented some of the mechanisms presented in section 3 to allow our virtual bacterial population to benefit from phenotypic and spatial heterogeneities.
 - 1) Non-genetic phenotypic heterogeneity: Normal cells (N) can transit to a persister state (P) (Balaban *et al.*, 2004). Persisters are formed at a relatively low constant rate (a). They do not grow but are not affected by disturbances and can switch back to normal cells at a constant rate (b). Since persisters do not grow, we did not take into account the formation of mutants from persisters. We supposed that the formation of persisters is unaffected by

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

environmental conditions (a and b are constant). We limited non-genetic phenotypic heterogeneity to the presence of persisters and did not include VBNCs, stress responses and modularity.

- 2) Genetic phenotypic heterogeneity: Normal cells (N) can become mutants (M). Mutants are formed at a very low rate (c). They are less susceptible to the antibiotic. They are killed by the antibiotic at a rate k' . They have a lower growth rate than normal cells. They grow at a rate μ' . With a higher growth rate, they would replace totally normal cells even without disturbance. With higher susceptibility to the antibiotic they would not improve the resistance and resilience of the biomass. For the sake of simplicity, mutants are identical and formed at a constant rate, regardless of the origin of the genetic change (mutations, HGT or stress-induced mutations). We also assumed that mutations are irreversible.
- 3) Spatial heterogeneity: Cells can move to a sanctuary (Hermsen *et al.*, 2012). The sanctuary is a compartment linked to the bioreactor, which is considered as the main space. A constant flow goes from the main space to the sanctuary and another identical one from the sanctuary to the main space. The sanctuary has a dilution rate d . The sanctuary depends completely on the main space to receive culture medium. As a result, substrate and antibiotic concentrations evolve differently in the sanctuary and the main space.

2.4.2 Equations

A schematic view of the system is presented in Figure 2.3. Different resistance and resilience characteristics emerge depending on the mechanisms included. The dynamics of the different populations over time (t) in the main space follow equations 1, 2 and 3. N , P and M are the populations of normal cells, persisters and mutants, respectively. μ and μ' are the growth rates of the normal cells and the mutants. k and k' are the death rates of the normal cells and the mutants. a , b , c , d and D are constants. a and b are the transition rates between normal and persister cells. c is the formation rate of resistant mutants, assumed to be irreversible. D and d are the dilution rates of the main space and the sanctuary, respectively.

2.4 Illustrating the formalization of resistance and resilience with a mathematical model

$$\frac{dN}{dt} = \mu(t)N(t) - aN(t) + bP(t) - cN(t) + d[N_S(t) - N(t)] - DN(t) - k(t)N(t) \quad (1)$$

$$\frac{dP}{dt} = aN(t) - bP(t) + d[P_S(t) - P(t)] - DP(t) \quad (2)$$

$$\frac{dM}{dt} = \mu'(t)M(t) + d[M_S(t) - M(t)] - DM(t) - k'(t)M(t) \quad (3)$$

N_S , P_S and M_S are the populations in the sanctuary. Similarly, the dynamics of the different populations in the sanctuary follow equations 4, 5 and 6.

$$\frac{dN_S}{dt} = \mu(t)N_S(t) - aN_S(t) + bP_S(t) - cN_S(t) + d[N(t) - N_S(t)] - k(t)N_S(t) \quad (4)$$

$$\frac{dP_S}{dt} = aN_S(t) - bP_S(t) + d[P(t) - P_S(t)] \quad (5)$$

$$\frac{dM_S}{dt} = \mu'(t)M_S(t) + d[M(t) - M_S(t)] - k'(t)M_S(t) \quad (6)$$

The growth rates μ and μ' follow a Monod growth model and are defined by equations 7 and 8. S is the substrate concentration in the main space. It is replaced by S_S in the sanctuary. μ_{max} is the maximum growth rate. K_S and K'_S are the Monod coefficients of the normal and mutant cells, respectively. Mutants have a fitness lower than that of normal cells because $K'_S > K_S$.

$$\mu(t) = \mu_{max} \times \frac{S(t)}{S(t) + K_S} \quad (7)$$

$$\mu'(t) = \mu_{max} \times \frac{S(t)}{S(t) + K'_S} \quad (8)$$

k and k' are dependent on the antibiotic concentration and follow equations 9 and 10. A is the antibiotic concentration in the main space. It is replaced by A_S in the sanctuary. k_{max} is the maximum killing rate. K_A and K'_A are constants. Mutants can face higher concentrations of antibiotic because $K'_A \gg K_A$.

$$k(t) = k_{max} \times \frac{A(t)}{A(t) + K_A} \quad (9)$$

$$k'(t) = k_{max} \times \frac{A(t)}{A(t) + K'_A} \quad (10)$$

With Y_{XS} being the substrate consumed to produce one cell, the substrate and antibiotic concentrations in the main space follow equations 11 and 12, respectively.

$$\frac{dS}{dt} = -[\mu(t)N(t) + \mu'(t)M(t)]Y_{XS} + D[S_i(t) - S(t)] + d[S_S(t) - S(t)] \quad (11)$$

$$\frac{dA}{dt} = D[A_i(t) - A(t)] + d[A_S(t) - A(t)] \quad (12)$$

In the sanctuary, substrate and antibiotic concentrations follow equations 13 and 14, respectively.

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

$$\frac{dS_S}{dt} = -[\mu(t)N_S(t) + \mu'(t)M_S(t)]Y_{XS} + d[S(t) - S_S(t)] \quad (13)$$

$$\frac{dA_S}{dt} = d[A(t) - A_S(t)] \quad (14)$$

In sum, biomass is produced by growth (μ, μ') and removed by dilution (d, D) and death (k, k'). Growth and death depend on substrate and antibiotic concentrations, respectively (S, A, S_S, A_S). Cells can switch their phenotypes at defined rates (a, b, c).

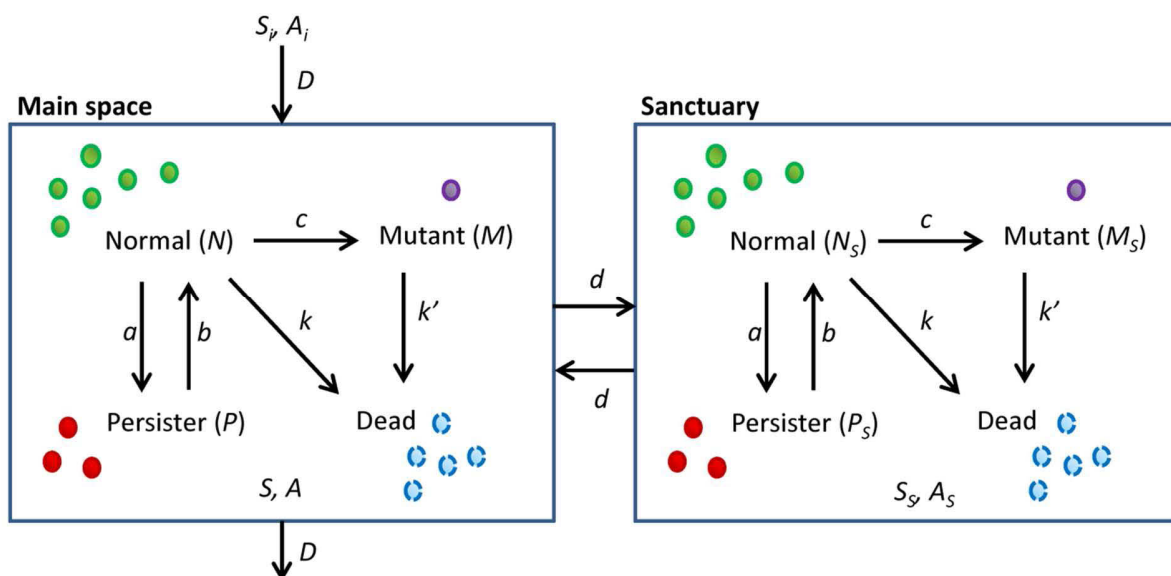


Figure 2.3: Schematic view of the model.

Normal cells (N) can become persisters (P), mutants (M) or dead cells. Persisters can switch back to normal cells. Mutants can become dead cells at a rate $k' < k$. The main space is fed with fresh medium containing substrate at a concentration S_i and potentially the antibiotic at a concentration A_i . The sanctuary is fed via the main space, which contains cells, substrate and antibiotic.

2.4.3 Simulations of the disturbed system

We tested the capacity of our bacterial system to keep the biomass in the main space ($N+P+M$) above a minimal value, $X_{min}=10^8 \text{cell.ml}^{-1}$. Parameters used for the simulations are given in Table 2.2. Simulations were discretized in time and initialized with 10^8 normal cells. They were run for a few days to reach equilibrium. Simulations were run with and without persisters, mutants and sanctuary. The biomass obtained was $3.4 \times 10^9 \text{cell.ml}^{-1}$ with 0.5% of persisters and/or $1.3 \times 10^{-6}\%$ of mutants. Disturbances were then applied by

2.4 Illustrating the formalization of resistance and resilience with a mathematical model

setting A_i to a value between 0 and 15 times K_A for up to 20 hours. The antibiotic entered progressively into the main space and from the main space to the sanctuary. At the end of the disturbances, A_i was set to 0 and the antibiotic progressively left the main domain and the sanctuary by dilution. All combinations between the disturbance intensities and durations were tested. If a population reached less than one cell per milliliter, it was set to zero. The time necessary to recover the property of interest after the disturbances (after A_i was set to 0) was calculated. If the property was not recovered four days after the end of the disturbance, the system failed. Results obtained for different combinations of mechanisms, i.e. with persisters or mutants and with or without a sanctuary, are given in Figure 2.4.

Table 2.2: Parameters used for the simulations.

Symbol	Unit	Value	Description
X_{min}	10^8	cell.ml ⁻¹	Threshold of the property of interest
a	10^{-3}	h ⁻¹	Transition rate from susceptible cells to persisters
b	10^{-1}	h ⁻¹	Transition rate from persisters to susceptible cells
c	10^{-10}	h ⁻¹	Transition rate from susceptible cells to mutants
d	10^{-2}	h ⁻¹	Dilution rate of the sanctuary
D	10^{-1}	h ⁻¹	Dilution rate of the main space
μ_{max}	1.2	h ⁻¹	Maximum growth rate of susceptible cells
K_S	2.3×10^{-6}	g.ml ⁻¹	Monod half-saturation constant of susceptible cells
K'_S	4.6×10^{-6}	g.ml ⁻¹	Monod half-saturation constant of mutants
Y_{XS}	1000	fg.cell ⁻¹	Gram of substrate consumed per cell produced
S_i	4.0×10^{-3}	g.ml ⁻¹	Substrate concentration in the influent
k_{max}	15	h ⁻¹	Maximal killing rate
K_A	1	mg.ml ⁻¹	Death constant of susceptible cells
K'_A	500	mg.ml ⁻¹	Death constant of mutants
Δt	10^{-3}	h	Time step for the simulations

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

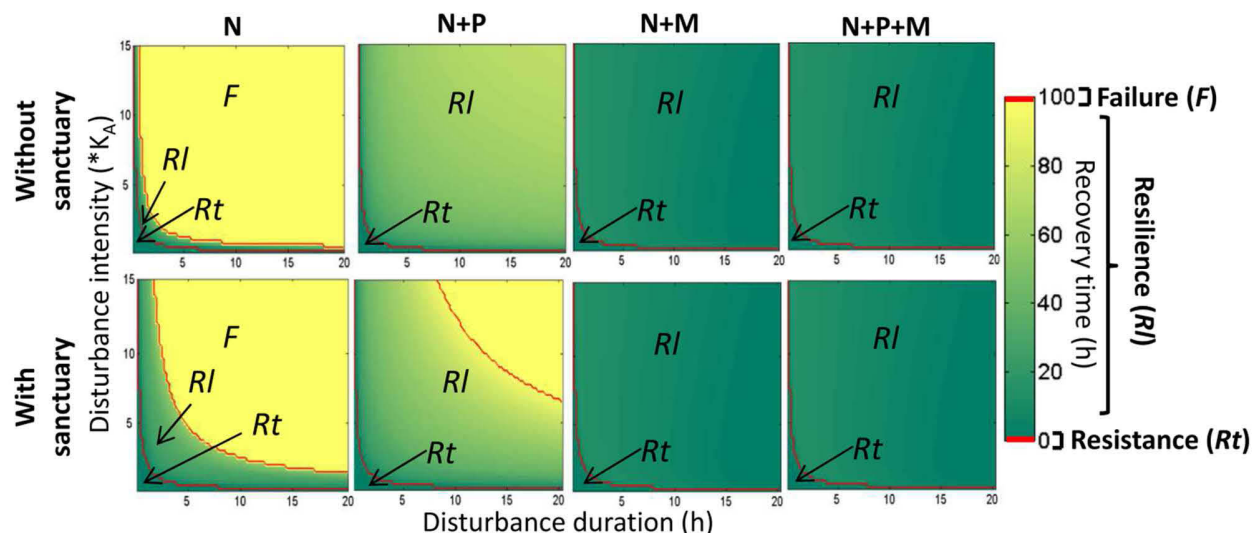


Figure 2.4: Resistance, resilience or failure of the property of interest with different combinations of mechanisms and disturbance intensities and durations.

N: Normal cells. P: Persisters. M: Mutants. Each combination of mechanisms were tested with disturbance intensity ranging from 0 to $15 \cdot K_A$ and disturbance duration ranging up to 20 hours. Red lines represent the limits between resistance and resilience and, if existing, between resilience and failure. Persisters increased the resilience of the biomass compared to normal cells alone. Mutants led to high resilience and became the major population when they were present.

With only susceptible cells (N) and without sanctuary, the resistance or resilience of the property was only obtained for small disturbance intensities and durations. Resilience increased with the sanctuary. The sanctuary is only fed by the medium from the main space at a rate $d < D$. Consequently, the sanctuary benefits from some inertia compared to the main space and the antibiotic takes more time to reach high concentrations in it. It allows the population of susceptible cells to survive and recover from higher disturbance intensities and durations. With persisters (P) and without sanctuary, resistance was not affected but resilience was greatly increased. The system was able to recover after all disturbances tested. Surprisingly, with the sanctuary recovery was not as great. In fact, the sanctuary is double-edged: with its inertia, it reaches lower antibiotic concentrations than the main space but maintains them for longer and becomes a reserve of antibiotic that contaminates the main space. This slows down the recovery of the biomass.

With mutants (M), resilience was greatly increased. Without the competition of normal cells, mutants were able to grow during the disturbance and take over the space. The

2.4 Illustrating the formalization of resistance and resilience with a mathematical model

biomass reached X_{min} quickly after the disturbance or even before the end of the disturbance for long treatment durations. When we tested a second identical disturbance four days after the end of the first one, the biomass had become resistant and stayed above X_{min} (data not shown). In contrast, populations reformed from persisters had the same susceptibility for both disturbances. When the population could produce both persisters and mutants, the patterns of resistance and resilience were similar to those of mutants alone. Normal cells reformed from persisters were not able to overcome the competition with mutants just after disturbances and represented a negligible amount of the total population four days after the disturbances. For relatively smooth disturbances, as shown in Figure 2.5, the proportion of susceptible cells increased slowly after the disturbances but the normal population would need several days before getting the upper hand on mutants. In Figure 2.5, we can also see that the sanctuary may favor the development of mutants by delaying the recovery of the normal population. Formation of resistant mutants seems to be the most efficient mechanism to increase resistance and resilience. On the other hand, a cell may not be able to cumulate resistance mechanisms without fitness burdens. In addition, we set a relatively high mutation rate. Resistant mutants may not appear so frequently and regularly. Bacterial persistence maintains the former fitness of the population after disturbances and is a reliable alternative for allowing bacterial populations to survive antibiotic shocks. Of note, the transition rates to the mutant or persister state are very low compared to the growth rate of normal cells. They significantly affect the resistance and resilience of the bacterial population without affecting its overall growth rate and hence its fitness and competitiveness. Even at low rates, the large number of normal cells makes these transitions frequent.

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

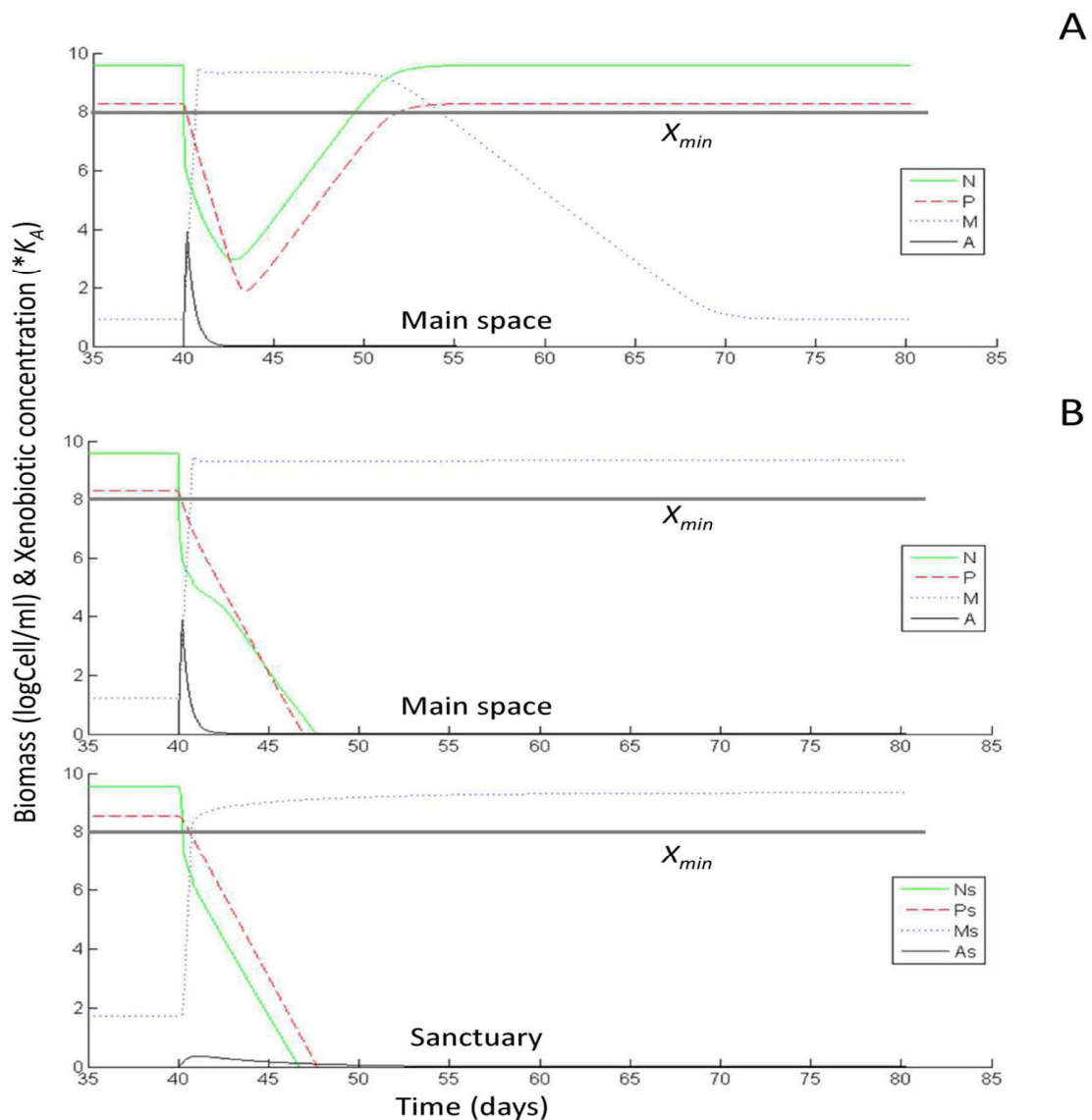


Figure 2.5: Dynamics of the different populations.

N: normal cells. P: persisters. M: mutants. A: antibiotic. The antibiotic shock started at day 40 and had an intensity of $10 \cdot K_A$ and a duration of 5 hours. Mutants allowed the overall population to recover a biomass above 10^8 cells/ml in all cases. **(A)** Without sanctuary, normal cells are able to become again the principal population after the disturbance. **(B)** With the sanctuary, the antibiotic takes more time to be evacuated and normal and persister cells are eradicated, leaving only mutants. The mutant population can maintain the property of interest more easily against antibiotic shocks than the normal population but may be more vulnerable to colonization by other species owing to its lower fitness.

2.5 Discussion and conclusion

Our model shows the significant effect of phenotypic and spatial heterogeneity on the resistance and the resilience of viable biomass to antibiotic shocks. It is interesting how resistance and resilience are already greatly affected with the integration of simplified mechanisms, i.e. constant transition rates, only one type of mutants, one type of persisters and one connected spatial compartment. As seen in section 3, genetic variants can arise from mutations, horizontal gene transfer and stress-induced mutations. Non-genetic phenotypic heterogeneity can arise from the constant formation of persisters but also from the heterogeneous expression of several genes and can be increased by stressful conditions. Spatial heterogeneity can be far more complex than just two separated compartments, and bacterial populations can form structures such as biofilms. Using our formalization of resistance and resilience in further investigations with more detailed mechanisms could lead to a better understanding of the dynamics of bacterial populations undergoing disturbances.

2.5 Discussion and conclusion

We argued that defining a property or function of interest, as suggested for both socio-ecological systems (Martin *et al.*, 2011) and microbial ecology (Song *et al.*, 2015), can be used to formalize the concepts of resistance and resilience. Relative to a property of interest, resistance is the capacity to maintain the property despite disturbances, and resilience the capacity to recover the property after having lost it. We proposed the following guidelines to structure the concepts of resistance and resilience for further studies: (i) delimit the system studied, spatially and temporally, (ii) choose the property of interest depending on the objective of the study, (iii) delimit the disturbances to be considered and (iv) identify the mechanisms that affect the resistance and resilience of the property of interest to the disturbances considered in the limits of the system studied. In this way, the focus of the study is on the concrete mechanisms that drive the resistance and resilience of a particular property of the system to particular disturbances and on how these mechanisms affect the dynamics of loss and recovery of the property.

Following the guidelines, we studied (i) a bacterial population in a space of a few milliliters followed over a few days. (ii) We chose staying above a minimum threshold of viable biomass ($X > X_{min}$) to be the desired property and (iii) antibiotic shocks to be the disturbances. (iv) In this context, resistance and resilience were influenced by mechanisms that allow bacterial populations to survive antibiotic shocks and to recover. We reviewed the mechanisms that influence the resistance and resilience of the viable biomass to

2 Formaliser les concepts de résilience et de résistance dans le cadre d'une population bactérienne soumise aux antibiotiques

antibiotics and organized them according to their influence on resistance and resilience (Table 2.1). As seen in our simulations, phenotypic and spatial heterogeneity had a great influence on the resistance and resilience of the biomass. Heterogeneity generates response diversity, i.e. diverse responses to disturbances (Leslie and McCabe, 2013; Kahiluoto *et al.*, 2014). It is a kind of bet-hedging strategy (Grimbergen *et al.*, 2015) that increases the chance that a bacterial population responds adequately to environmental change. Indeed, a population's history and phenotypic and genetic heterogeneity play a major role in its evolutionary success (Ryall *et al.*, 2012; Ferenci and Maharjan, 2015). A completely clonal population is very rare outside a laboratory (Bobay *et al.*, 2015). Models aiming to simulate the ability of bacterial populations to survive and cope with disturbances should focus on their different ways of generating phenotypic and spatial heterogeneity.

We focused on the bacterial population level. However, disturbances can propagate into communities (Hunt and Ward, 2015). They can also modify the ratio of power between populations and could decrease competition, unbalance collaborations or favor the development of conditionally rare taxa (Shade *et al.*, 2014; Shade and Gilbert, 2015). If populations react differently to the same stresses, redundancy of functions between populations may favor the resistance and resilience of some functions judged desirable to certain stresses (Allison and Martiny, 2008). Even so, a community is more than the sum of its populations. To understand communities we have to include interactions between species such as synergistic interactions, antagonistic interactions and trophic structure. Identifying interactions between populations limits the risks of unpredicted change. We also did not include human intervention in the mechanisms presented. Management actions can be used to influence resilience (Martin *et al.*, 2011). Although we did not account for these parameters in our study they may be important in other contexts.

In conclusion, resistance and resilience are subjective (Botton *et al.*, 2006). Defining these concepts relative to a property of interest makes it possible to devise a formal framework useful for mathematical modeling. We chose a minimum threshold of viable biomass as the desired property of a bacterial population. In this context, resistance and resilience depended widely on the phenotypic and spatial heterogeneity that the bacterial population could generate or benefit from. However, different studies will choose different properties/functions of interest for the same system, different disturbances and time and space scales. The relevant mechanisms and conclusions obtained vary depending on how the concepts of resistance and resilience are framed. The desired property may be a production rate for a bioreactor or a null biomass for sterilized surfaces, which would lead

2.6 Acknowledgments

to different organizations of the biological and human actions and reactions that influence the property.

2.6 Acknowledgments

This work was supported by a "Contrat de Plan Etat Region Auvergne". We thank Guillaume Deffuant for his helpful advice on the manuscript.

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

Présentation de l'article

L'influence des conditions environnementales sur la formation des persisters a besoin d'être quantifiée

La persistance bactérienne permet à une population de survivre partiellement lors d'un traitement antibiotique et de se régénérer une fois le traitement terminé. D'après l'article précédent, elle apparaît comme un mécanisme important de la résilience aux antibiotiques. La formation de persisters est influencée par les conditions environnementales. La dynamique de formation des persisters dans les biofilms dépend donc des gradients de concentration interne en différentes molécules (substrats, oxygène...). Bien que la persistance bactérienne soit l'objet de nombreuses études depuis plusieurs années, elle est difficile à étudier de par l'aspect éphémère, hétérogène et environnement-dépendant des persisters. Dans ce cas, les modèles informatiques s'avèrent pertinents pour compléter les résultats expérimentaux. La conception d'un modèle mathématique reliant la formation de persisters aux conditions environnementales est nécessaire pour intégrer la formation de persisters dans un modèle de biofilm. Plusieurs modèles définissant les transitions entre cellules sensibles et persisters en fonction de conditions environnementales ont été proposés, mais ils sont rarement calibrés et validés par des résultats expérimentaux (Roberts and Stewart, 2005; Cogan, 2006; Ayati and Klapper, 2012; Cogan *et al.*, 2012; Chihara *et al.*, 2015; Szomolay and Cogan, 2015).

0 Présentation de l'article

Le deuxième objectif de cette thèse est donc de lier les transitions phénotypiques entre cellules sensibles et persisters aux concentrations en substrat et en antibiotique du milieu à l'aide de modèles mathématiques. Les modèles développés sont calibrés et testés avec des résultats d'expériences sur des cultures planctoniques, où les concentrations en solutés sont spatialement homogènes. Les modèles développés dans cet article sont susceptibles d'être intégrés dans un modèle de biofilm, où les conditions environnementales sont spatialement hétérogènes.

Les expériences sont réalisées avec une souche de *Klebsiella pneumoniae* et l'antibiotique ciprofloxacine. Les raisons de ce choix sont les suivantes : *K. pneumoniae* est une espèce bactérienne formant des biofilms et est impliquée dans plusieurs cas de multi-résistances aux antibiotiques (Laxminarayan *et al.*, 2013; Vuotto *et al.*, 2014). La ciprofloxacine est une molécule bactéricide de la famille des fluoroquinolones, qui diffuse rapidement dans les biofilms de *K. pneumoniae* (Anderl *et al.*, 2000). Elle agit en entravant la réplication de l'ADN via une fixation au niveau des enzymes impliquées dans le déroulement initiale de la molécule d'ADN (la topoisomérase et l'ADN gyrase) et elle est connue pour induire la formation de persisters en activant la réponse SOS (Dörr *et al.*, 2010).

Contributions

Cet article est publié dans la revue *Microbial Biotechnology* (accepté le 4 mai 2017). Les principales contributions de cet article sont :

- Le développement de modèles liant les transitions entre cellules sensibles et persisters aux concentrations en substrat et en antibiotique.
- La calibration de ces modèles à partir de données expérimentales, utilisant les dynamiques d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* traitée à la ciprofloxacine.
- La comparaison des modèles développés avec des modèles de référence.

Conclusions

Les modèles proposés sont valides pour une large gamme de concentrations de substrat et pour une concentration nulle ou élevée d'antibiotique. Ils reproduisent fidèlement les données expérimentales obtenues et donnent de meilleurs résultats que les modèles de référence. De plus, les modèles développés, parce qu'ils prennent en compte des variations de concentrations, peuvent être intégrés dans un modèle de biofilm.

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

Les paramètres des modèles obtenus montrent que le manque de substrat est le principal déclencheur de la formation de persisters pour la souche testée. Durant les traitements, les bactéries sensibles meurent rapidement et la formation de persisters induite par l'antibiotique lui-même est limitée. Les résultats de cet article montrent que la phase de croissance de la population traitée est aussi un facteur affectant la persistance à la ciprofloxacine.

Relating switching rates between normal and persister cells to substrate and antibiotic concentrations: a mathematical modeling approach supported by experiments

Gabriel Carvalho^{1*}, Cyril Guilhen², Damien Balestrino², Christiane Forestier², Jean-Denis Mathias¹

¹UR LISC Laboratoire d'ingénierie pour les systèmes complexes, Irstea, Aubière, France

²LMGE, UMR6023 CNRS, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Abstract

We developed and compared two mathematical models of variable phenotypic switching rates between normal and persister cells that depend on substrate concentration and antibiotic presence. They could be used to simulate the formation of persisters in environments with concentration gradients such as biofilms. Our models are extensions of a previous model of the dynamics of normal and persistent cell populations developed by Balaban *et al.* 2004. We calibrated the models' parameters with experimental killing curves obtained after ciprofloxacin treatment of samples regularly harvested from planktonic batch cultures of *Klebsiella pneumoniae*. Our switching models accurately reproduced the dynamics of normal and persistent populations in planktonic batch cultures and under antibiotic treatment. Results showed that the models are valid for a large range of substrate concentrations and for zero or high doses of antibiotics.

3.1 Introduction

Microbiologists continually grapple with bacterial resistance to antibiotics (Penesyan *et al.*, 2015). Antibiotic resistance is an abiding major problem but other mechanisms such as bacterial persistence have gained prominence in recent years and have also emerged as an important factor in the survivability of bacterial populations (Cohen *et al.*, 2013). Persister cells (persisters) are stress-tolerant bacteria in a susceptible isogenic population. They are usually dormant-like cells able to resume growth quickly on standard media (Balaban *et al.*, 2013). Unlike in resistant bacteria, stress-tolerance is temporary and reversible: normal susceptible cells switch their phenotype to the persister state and, inversely,

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

persisters switch their phenotype to actively growing susceptible cells. Once persisters switch their phenotype to normal, they lose their tolerance. This phenomenon allows bacterial populations to adopt a bet-hedging strategy. Consequently, sub-parts of bacterial populations are able to survive unpredictable stresses and regrow an active susceptible population after stress (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014; Vega and Gore, 2014). The phenotypic switch between normal and persister cells can be caused by the bi-stability of toxin/antitoxin (TA) modules (Fasani and Savageau, 2013; Gelens *et al.*, 2013; Zucca, 2014). Environmental conditions such as starvation, quorum-sensing, biofilms, sub-inhibitory antibiotic concentration and diauxic shifts all have the potential to induce persistence (Balaban, 2011; Amato *et al.*, 2013; Helaine and Kugelberg, 2014; A. Harms *et al.*, 2016). The activation of stress-responses, such as the stringent and SOS responses, has been reported to be involved in tolerant states. Low growth rates have been mathematically modeled to influence the stability of TA modules and increase the formation of persisters (Feng *et al.*, 2013). Most studies focus on the HipBA module. However, other TA modules can be involved in bacterial persistence (Kint *et al.*, 2012). The number of modules also influences the switching rates between normal cells and persisters (Fasani and Savageau, 2013). The switching from persistent states to normal cells is also affected by the growth medium. Rich media tend to induce the wake-up of persisters and poor media to inhibit it (Jöers *et al.*, 2010).

Most existing persister models consider two sub-populations, normal (n) and persister (p) cells (Figure 3.1A). Both sub-populations can switch their phenotype from one to another at defined switching rates (Balaban *et al.*, 2004; Gefen and Balaban, 2009). For the sake of simplicity, these switching rates are often considered constant (Chambless and Stewart, 2007; Levin and Udekwu, 2010). A few models have related the switching rates to substrate and/or antibiotic concentration(s) (e.g. Roberts and Stewart, 2005; Ayati and Klapper, 2012; Cogan *et al.*, 2012; Chihara *et al.*, 2015; Szomolay and Cogan, 2015), but were theoretical in nature and not supported by experimental data, or only succinctly (Cogan, 2006). The model of Balaban *et al.* (2004) calculates different sets of switching rates for the exponential and stationary growth phases but does not directly relate the switching rates to environmental parameters. There is a need for an experimentally validated mathematical model that relates switching rates to environmental conditions such as substrate, antibiotic or auto-inducer concentrations. This kind of mathematical model will help to better understand the dynamics of persisters in heterogeneous environments.

3.1 Introduction

In this work, we tested two mathematical models that relate switching rates to substrate and antibiotic concentrations, two stresses commonly reported in the literature. The models' parameters were calibrated with experimental killing curves of samples taken regularly from planktonic batch cultures. These experiments assessed the dynamics of normal and persistent populations in batch cultures with variable substrate concentrations and under antibiotic treatment. The validity domain of our models was further assessed by varying the initial substrate concentrations of the experiments and of the simulations. We then compared our models with a reference model with constant switching rates and a model with discontinuous switching parameters between exponential and stationary phases.

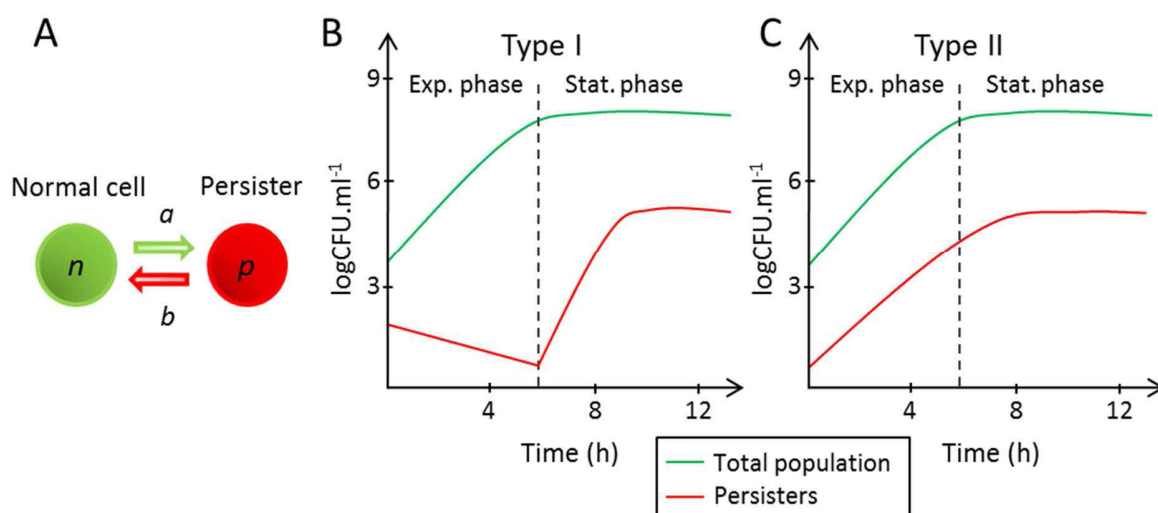


Figure 3.1: Expected dynamics in planktonic batch cultures.

(A) A same isogenic bacterial population with two distinct phenotypes forming two sub-populations, normal (n) and persister (p) cells. a and b are the switching rates between the two phenotypes. (B) Expected dynamics of type I persisters during bacterial growth (Gefen and Balaban, 2009). The switching rate a is null during exponential growth (Exp. phase) and increases during stationary phase (Stat. phase) because of substrate limitation (stress). The initial persisters come from the inoculum used to start the batch culture. (C) Expected dynamics of type II persisters during bacterial growth (Gefen and Balaban, 2009). The switching rates are constant and the number of persisters is proportional to the number of normal cells.

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

3.2 Results

3.2.1 Dynamics of experimental populations and growth parameters

The killing curves obtained were biphasic (Fig. S2) and we were able to quantify the persister fraction in the batch culture samples. The dynamics of the normal and persistent populations in the batch culture with 4.0g/L of initial glucose are presented in Figure 3.2. The initial persisters were formed during the overnight cultures used to inoculate the batch cultures. The evolution of the persistent population occurred in two phases. Between 0 and 3 hours of planktonic batch culture, the persister population decreased and was only able to increase after 3 hours. This dynamics matches the dynamics of type I persisters predicted in Figure 3.1B. However, the persister fraction started increasing before the stationary phase was reached. The results were quite reproducible. The initial decrease in the persister fraction was observed for all individual experiments. The variation between experiments was small compared to the decrease in the persister fraction. With 1.0 and 0.4g/L initial glucose, a decrease of the persister fraction was also observed but only between t_0 h and $t_{1.5}$ h. With these lower initial substrate concentrations, the persister fraction started to increase after $t_{1.5}$ h. With less substrate, persister formation induced by starvation occurred faster.

Table S1 brings together the experimental and optimized growth parameters of the Monod growth model. The R^2 between the simulated and experimental growth curves was >0.99 for 4.0g/L of initial glucose and was >0.93 for the other initial glucose concentrations (1.0 and 0.4g/L). The simulated growth curves were barely affected by the switching model used. An estimation of the substrate concentration in the batch culture is plotted in Figure 3.2. The persister population started to increase as soon as the substrate concentration started to decrease significantly, between 3 and 4 hours.

3.2 Results

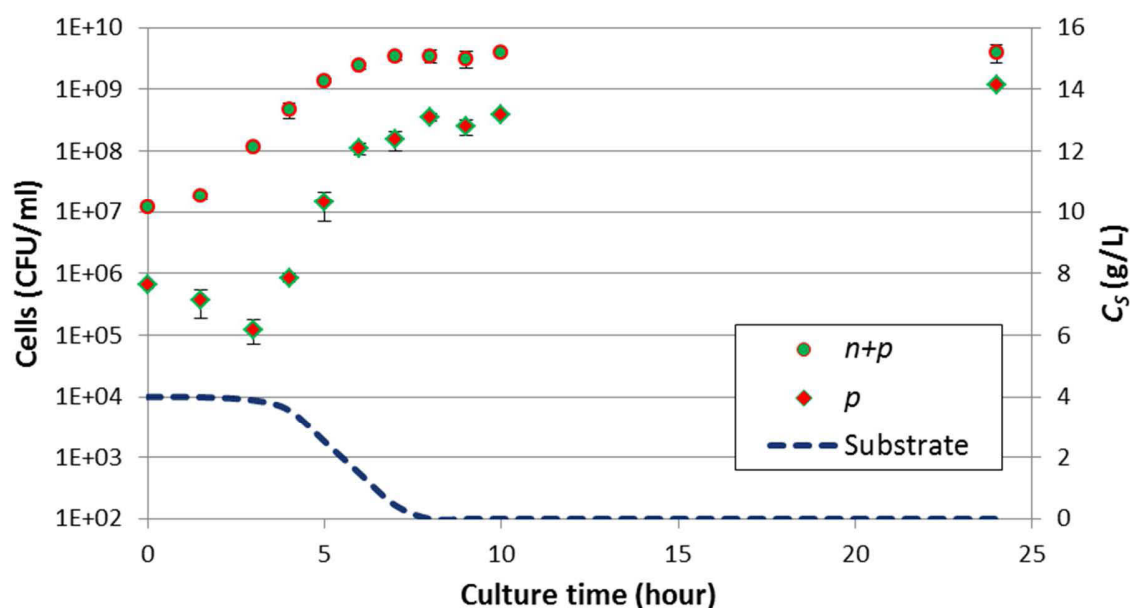


Figure 3.2: Total ($n+p$) and persistent (p) populations in the antibiotic-free batch culture.

The persistent population was assessed for each of the three experiments with an initial glucose concentration of 4.0g/L separately. The error bars represent the standard deviation of the three experiments. The dynamics of the persistent population shows the pattern of type I persistence. The persister population starts to increase when the substrate concentration (C_S) starts to diminish significantly.

3.2.2 Optimal switching rate parameters

We optimized the parameters of the four models of switching rates previously presented: the discontinuous model of type I persistence (RMI), the model of type II persistence (RMII) and models IM and DM. Parameters were optimized to fit the mean of the three experiments with an initial glucose concentration of 4.0g/L. The optimal parameters obtained are given in Table 3.1. The optimal substrate concentration threshold ($C_{S,threshold}$) of model RMI was 2.4g/L. For the RMII model, we also tested running optimizations with a growth rate for persisters $\mu_p > 0$ but the μ_p obtained was negligible and did not affect the other parameters. We left $\mu_p = 0$, as for the other models. Since we assumed $C_A \gg K'$ during antibiotic treatments, K' was not assessed. Theoretically, for type I persistence, $a(C_S; C_A)$ is negligible when conditions are favorable. This is consistent with the parameters obtained for the IM and DM models as parameter a' is very small. The parameters obtained for the

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

IM and DM models show that substrate limitation is the main trigger that leads to persister formation. a_A is one order of magnitude smaller than a_S for both models. For the IM model, the decay of the persister population during antibiotic treatments was mainly due to the wake-up of persisters while for the DM model the decay was mainly due to direct killing of persisters by the antibiotic. We cannot tell apart the real mechanism at stake from the dynamics of the populations alone. Figure 3.3 shows the experimental and simulated dynamics of total and persistent populations in the batch culture with the different models. As anticipated, the choice of the switching model had negligible impact on the total viable cells in the batch culture. Differences were observed in the dynamics of simulated persistent populations. The RMI model showed a sharp change when the substrate threshold was reached whereas the IM and DM models were smoother. The strain used produces type I persisters and the RMII model cannot present the characteristic initial decay of the persistent population, between 0 and 3 hours.

With the optimized parameters in Table 3.1 we ran two additional simulations by just changing the initial substrate concentration to 1.0g/L or 0.4g/L and the initial number of normal and persister cells. We compared the results of the simulations with the experimental ones with the same initial glucose concentrations to check the validity of the models in the different conditions. The coefficients of determination (R^2) obtained for the different models and for the different initial substrate concentrations are given in Figure 3.4. Figure 3.4 groups together the R^2 between the experimental and simulated killing curves and the R^2 between the experimental and simulated persistent populations as an additional indicator of the validity of the models. The models were optimized to fit the experimental killing curves. However, they were also able to simulate accurately the persister fraction in the batch culture with the initial glucose concentration of 4.0g/L. Although the strain used produces type I persisters, the RMII model, used for type II persistence, also produced good results. In Figure 3.3, we can observe that the models mainly differ during the first five hours of the batch culture. Although they have different patterns, they all stay close to the majority of the experimental points when the initial substrate concentration is 4.0g/L. In contrast, all the models do not have the same validity domain. The RMI model was the most affected by substrate concentration changes. When we compared killing curves, the RMII, IM and DM models showed similar losses of accuracy when the initial substrate concentration deviated from 4.0g/L. When comparing the persister fractions, the IM and DM models appeared to be the least affected by substrate concentration changes. The R^2 obtained with $C_{S,i}=1.0$ or 0.4g/L were higher than with $C_{S,i}=4.0$ g/L. Considering the killing curves, the DM model was the best model. Considering the persister fraction the IM and DM models were just as good.

3.2 Results

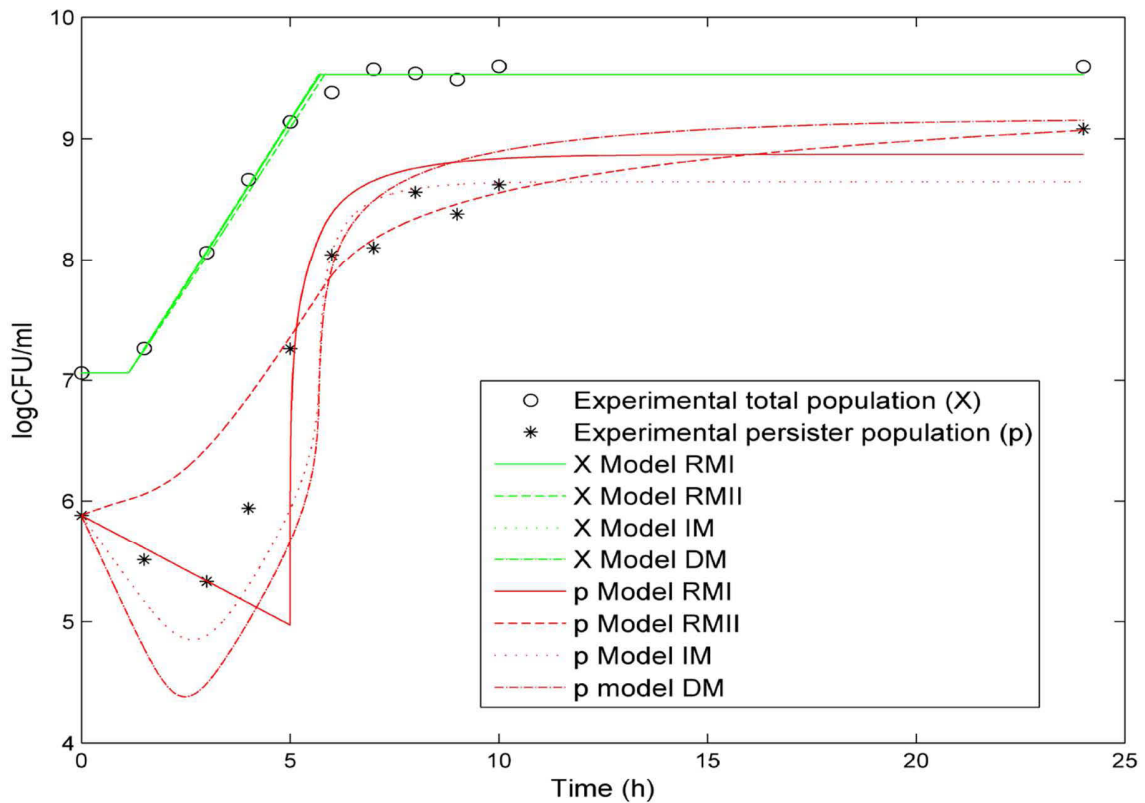


Figure 3.3: Experimental and simulated total (X) and persistent (p) populations in an antibiotic-free batch culture with the different switching models.

The initial substrate concentration used is 4.0g/L. The experimental data plotted is the mean of the three experiments performed with 4.0g/L glucose. The switching model selected barely affects the dynamic of the total population. The switching models principally differ by the behavior of the persistent population in the first five hours of the batch culture.

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

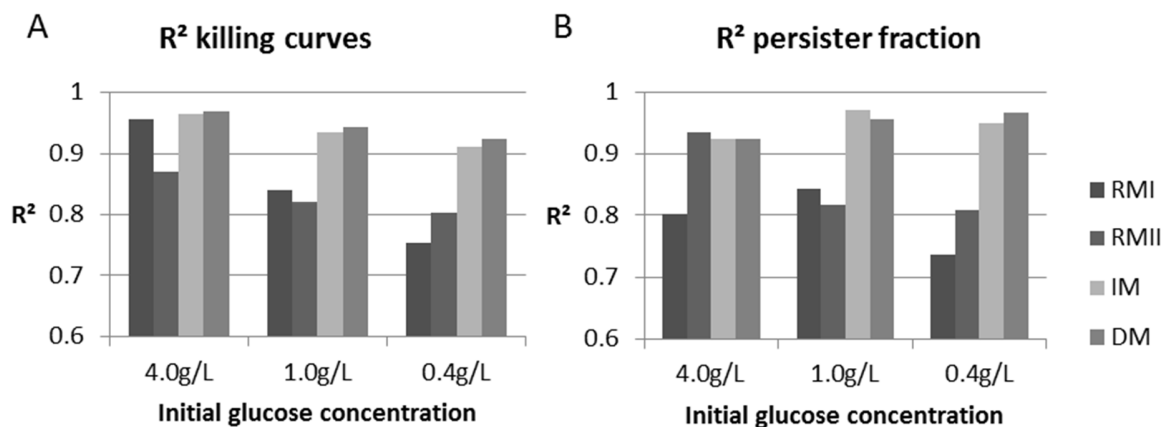


Figure 3.4: R^2 obtained for different initial glucose concentrations with the different models.

The models' parameters are optimized for an initial substrate concentration of 4.0g/L. The models react differently when this initial concentration is reduced. (A) R^2 between the simulated killing curves and the experimental ones. (B) R^2 between the simulated persistent population in the antibiotic-free batch culture and the experimental one. The IM and DM models are more representative of the experimental data than the RMI and RMII models for the initial glucose concentrations of 1.0 and 0.4g/L. The DM model gives the best results.

Table 3.1: Optimal parameters of the different switching models obtained with 4.0g/L glucose.

	a' (h ⁻¹)	a_S (h ⁻¹)	a_A (h ⁻¹)	b' (h ⁻¹)	b_S (h ⁻¹)	b_A (h ⁻¹)	b_{SA} (h ⁻¹)	K (g.mL ⁻¹)	k_n (h ⁻¹)	k_p (h ⁻¹)
RMI	1.8E-01			4.2E-01					1.4E+01	1.9E-02
RMII	2.2E-02			2.2E-14					2.0E+01	5.2E-01
IM	2.2E-14	1.2E-01	1.6E-02	1.8E-01	3.6E-01	6.0E-01		3.5E-05	1.3E+01	4.4E-10
DM	8.8E-13	7.6E-02	8.7E-03	9.8E-02			1.7E+00	3.5E-05	1.1E+01	2.2E-01

3.3 Discussion and conclusion

Four models of switching rates between normal and persister cells were tested: RMI, RMII, IM and DM. The IM and DM models were developed to relate substrate and antibiotic concentrations to the switching rates. RMI is a reference model with discontinuous switching rates depending on the growth phase and RMII is a reference model with constant switching rates. The IM and DM models accurately reproduced the experimental data and gave better results than the RMI and RMII models for the different experimental conditions tested. They could be used to simulate persister dynamics in complex environments with substrate concentration gradients.

We fitted a relatively large number of parameters together. Since we used numerous initial conditions, we assume that the best local optima obtained for each model are reliable. The optimal parameter sets obtained show that starvation is the main cause of persister formation. The parameter a' tends to zero and a_A is an order of magnitude smaller than a_S for both models IM and DM. As reported in previous studies, the stringent response may be involved (A. Harms *et al.*, 2016). Since the DM model gave the best results, it is likely that the antibiotic inhibits the wake-up of persisters despite the presence of substrate. Only experiments at the single cell level would be able to determine the underlying biological mechanism involved, of which there may be several (Helaine and Kugelberg, 2014; A. Harms *et al.*, 2016).

The substrate used in our assays was glucose and it is likely that changing the substrate will affect the switching rates (Jöers *et al.*, 2010; Helaine and Kugelberg, 2014). We also did not take into account oxygen (O_2) availability and assumed that the use of a shaking incubator did not limit the cells' access to O_2 . However, O_2 may play a significant role in complex environments such as biofilms. The stress induced by the depletion of oxygen in deep biofilm layers may increase the switching rate from normal to persisters in addition to the depletion of substrate. Experiments with different oxygen availabilities should be tested, e.g. by lowering the shaking speed for studies in which the hypothesis of non-limiting oxygen cannot be made. If glucose is indeed the main limiting growth substrate, the IM and DM models give reliable results. With use of the same method, their parameters will need to be calibrated again if other solutes essential for growth are limiting, and the concentration of substrate replaced by the new limiting solute in the equations. The models must be calibrated depending on the environmental conditions of the study conducted.

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

Another issue is how the switching rates are affected by low antibiotic concentrations. Sub-MICs have been reported to induce persister formation (Helaine and Kugelberg, 2014) but the parameter a_A obtained was very low for both models IM and DM. In our work, normal cells were rapidly lysed after contact with the high dose of the bactericidal ciprofloxacin antibiotic and did not have the time to switch to persister cells. Additional experiments should be run to determine the parameter K' and the validity of the models at low antibiotic concentrations. K' is probably a value below the MIC to avoid competition between the death of normal cells at antibiotic concentrations above the MIC and the switch to the persister state. At present, according to our results, the IM and DM models are valid for zero or high antibiotic concentrations.

We considered two sub-populations, normal and persister cells. However, additional persistent sub-populations could be included to explain the dynamics of particular populations, for example, the wild type strain in Balaban *et al.*, 2004. Persistent populations are quite heterogeneous (Kint *et al.*, 2012; Zhang, 2014; Kaldalu *et al.*, 2016). Different antibiotics and different combinations of consecutive antibiotic treatments may differently affect a persistent population, suggesting that various kinds of persisters with different tolerance or cross-tolerance properties can coexist in a same culture (Keren *et al.*, 2004; Lechner *et al.*, 2012). Persisters surviving a given antibiotic may not be the same as those surviving another given antibiotic (or other kinds of stresses). If more than one sub-population of persisters is observed, each population can have its own model parameters and susceptibility to the antibiotic(s) used. Survival heterogeneity in an isogenic bacterial population can also be due to other mechanisms such as heterogeneity in efflux pump activity among cells (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014), mistranslation of enzyme messengers (Wang *et al.*, 2014) or heterogeneity in enzyme production (Wakamoto *et al.*, 2013). This heterogeneity between cells may originate from biological noise (Tsimring, 2014). It has also been observed that debris of dead cells can shield viable cells from an antibiotic treatment (Podlesek *et al.*, 2016). Although particular mechanisms have been clearly related to persister formation, bacterial persistence is still unclear and may be more widely the reflection of the response diversity of a population (Kahiluoto *et al.*, 2014).

In this first study, the IM and DM models accurately reproduced the experimental data. The method developed here could be tested with new strains, limiting substrates or antibiotics. The structure of their equations can be kept and their parameters modified to match new environmental conditions. Knowing the dynamics of persistent populations is crucial to adjusting the timing of antibiotic treatments (Cogan *et al.*, 2012). In another

3.4 Experimental procedures

context, antibiotics could be used as a means of control to manage ecosystems. Also, the IM and DM models of switching rates can be implemented into models with heterogeneous substrate concentrations, such as biofilm models (see Ayati and Klapper, 2012; Szomolay and Cogan, 2014; Chihara *et al.*, 2015).

3.4 Experimental procedures

3.4.1 Development of a mathematical model with environment-dependent switching rates

3.4.1.1 Reference mathematical model of the dynamics of persistent populations

Balaban *et al.* (2004) propose that in the case of two subpopulations, normal and persister cells (Figure 3.1A), the dynamics of both populations in a planktonic batch culture follow equations 1 and 2. Cells can grow and switch between two phenotypes. n is the population of normal cells and p is the population of persisters. μ_n and μ_p are the growth rates of the normal and persister sub-populations, respectively. a is the switching rate toward the persister state and b is the switching rate toward the normal state.

$$\frac{dn}{dt} = \mu_n n(t) - a n(t) + b p(t) \quad (15)$$

$$\frac{dp}{dt} = \mu_p p(t) + a n(t) - b p(t) \quad (16)$$

Persisters are divided into types I and II (Balaban *et al.*, 2004; Gefen and Balaban, 2009). Type I persisters are induced by external stresses. In type I persistence, a is assumed to be null in exponential growth. a increases with external triggers such as the lack of substrate in stationary phase. In addition, type I persisters have a negligible growth rate, $\mu_p \approx 0$. In contrast, type II persisters are produced stochastically regardless of the bacterial environment, i.e. a and b are constant. Type II persisters have been observed to have a positive, though small, growth rate $\mu_p > 0$. The two persister types result in two different kinds of population dynamics during planktonic batch culture (Figure 3.1BC).

The switching and growth rates of equations 1 and 2 (μ_n , μ_p , a and b) are obtained by fitting the equations to the dynamics of normal and persistent populations in planktonic batch cultures and regrowth experiments (Balaban *et al.*, 2004; Lechner *et al.*, 2012). The persister fraction in a sample is measured by treating it with antibiotics and counting viable cells over time to obtain a killing curve. A regrowth experiment is the measurement of the regrowth of the survivors of an antibiotic treatment (mostly persisters) over time in

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

a fresh, antibiotic-free medium. a and b are considered constant when fitting these equations. This does not matter in the case of type II persistence, as switching rates are always constant (equations 5 and 6). However, for type I persistence, no continuous model can be used for all growth phases. Different switching rates must be calculated for different environmental conditions. Assuming $a = 0$ in exponential growth, b can be estimated during this time lapse. Then, assuming that b remains constant, a can be estimated during stationary phase. This results in a discontinuous model for a whole batch culture with different parameters for exponential and stationary phases. If we consider a particular substrate concentration ($C_{S,threshold}$) to be the threshold between the exponential and stationary phases, we write the switching rates of type I persistence in a batch culture as equations 3 and 4. C_S is the substrate concentration and a' and b' are constants. We take the following switching models, RMI and RMII, as reference models.

- RMI model: discontinuous model of type I persistence

$$\text{if } C_S \geq C_{(S,threshold)} \quad a=0 \text{ and } b=b' \quad (17)$$

$$\text{if } C_S < C_{(S,threshold)} \quad a=a' \text{ and } b=b' \quad (18)$$

- RMII model: type II persistence

$$a=a' \quad (19)$$

$$b=b' \quad (20)$$

The RMI model is suitable for batch cultures but could be unsuited for environments with concentration gradients such as biofilms. We must extend the model of Balaban *et al.* (2004) to account for environmental conditions and use it for complex environments, where exponential and stationary phases cannot be clearly separated and switching rates are not spatially homogeneous.

3.4.1.2 Extending the current model to include substrate and antibiotic concentrations

As mentioned in the introduction, various environmental conditions can affect switching rates. Substrate limitation and stressful conditions, such as the presence of antibiotics, are common (Balaban, 2011; Helaine and Kugelberg, 2014). We chose to take into account substrate and antibiotic concentrations (C_S and C_A) and to relate them to the switching rates a and b . We assumed the growth rate of persisters to be zero ($\mu_p = 0$) as in the case of type I persistence. Since we assume $\mu_p=0$, the growth rate of the total population (μ) is the

3.4 Experimental procedures

growth rate of normal cells, $\mu = \mu_n$. We adapted equations 1 and 2 by replacing the constant parameters μ , a and b with the functions $\mu(C_S)$, $a(C_S; C_A)$ and $b(C_S; C_A)$. In addition, in the presence of antibiotic, normal cells and persisters are killed. We added killing rates to equations 1 and 2 to take this factor into account. The new equations that we used to simulate the dynamics of normal and persistent populations in batch cultures were equations 7 and 8. $k_n(C_A)$ and $k_p(C_A)$ were the killing rates of normal and persister cells, respectively. They are considered constant during antibiotic treatments and set to zero during antibiotic-free batch cultures.

$$\frac{dn}{dt} = \mu(C_S)n(t) - a(C_S; C_A)n(t) + b(C_S; C_A)p(t) - k_n(C_A)n(t) \quad (21)$$

$$\frac{dp}{dt} = a(C_S; C_A)n(t) - b(C_S; C_A)p(t) - k_p(C_A)p(t) \quad (22)$$

For the switching rate $a(C_S; C_A)$, the literature is unanimous on the induction of the persister state. Starvation or sub-MIC antibiotic concentrations can separately induce the persister state (Balaban, 2011; Helaine and Kugelberg, 2014; A. Harms *et al.*, 2016). Thus, we assume that $a(C_S; C_A)$ must increase when the substrate concentration decreases or the antibiotic concentration increases. For the switching rate $b(C_S; C_A)$, the literature is unclear whether the substrate and the antibiotic influence the wake up of persisters independently or interdependently. In a few models previously described, the switching rate b was assumed to be zero in the presence of antibiotic regardless of the substrate concentration (Cogan *et al.*, 2012; Szomolay and Cogan, 2015). If $b(C_S; C_A)$ was inhibited by the presence of antibiotic, it would prevent persisters from waking up and dying during an antibiotic treatment. In this case, the substrate and the antibiotic influence b interdependently. However, a few experiments tend to prove that the substrate improves the efficacy of antibiotic treatments (Wood, 2016b). The substrate could increase the switching rate b despite the presence of antibiotic. In this case, the substrate and the antibiotic influence b independently.

Thus, we developed two mathematical models to relate the switching rates to the substrate and antibiotic concentrations, C_S and C_A respectively. We developed a model in which substrate and antibiotic concentrations affect $b(C_S; C_A)$ independently (model IM), and one in which substrate and antibiotic concentrations affect $b(C_S; C_A)$ interdependently (model DM). We used Hill functions (such as Monod and Michaelis-Menten equations), which are common in biology, to build the equations of the two models. Switching rates are bounded by a minimum and a maximum, depending on environmental conditions, as observed in previous models (Cogan, 2006; Cogan *et al.*, 2012).

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

- Model IM: Substrate and antibiotic concentrations influence $b(C_S; C_A)$ independently.

$$a(C_S; C_A) = a' + a_S \times (1 - C_S / (C_S + K)) + a_A \times C_A / (C_A + K') \quad (23)$$

$$b(C_S; C_A) = b' + b_S \times C_S / (C_S + K) + b_A \times (1 - C_A / (C_A + K')) \quad (24)$$

- Model DM: Substrate and antibiotic concentrations influence $b(C_S; C_A)$ interdependently.

$$a(C_S; C_A) = a' + a_S \times (1 - C_S / (C_S + K)) + a_A \times C_A / (C_A + K') \quad (25)$$

$$b(C_S; C_A) = b' + b_{SA} \times C_S / (C_S + K) \times (1 - C_A / (C_A + K')) \quad (26)$$

a' , a_S , a_A , b' , b_S , b_A , b_{SA} , K and K' are constants. Equations with the form $Concentration / (Concentration + Constant)$ are bounded by 0 and 1. Thus, $a(C_S; C_A)$ is bounded by a' and $(a' + a_S + a_A)$ and $b(C_S; C_A)$ is bounded by b' and $(b' + b_S + b_A)$ or $(b' + b_{SA})$. The IM and DM models are consistent with observations made in the literature (Balaban, 2011; Helaine and Kugelberg, 2014; A. Harms *et al.*, 2016): $a(C_S; C_A)$ will increase owing to nutrient starvation or the presence of antibiotics, eventually at sub-inhibitory concentrations. At stationary phase, substrate limitation will lead to an increase in the persister/normal cell ratio. We could not determine whether the substrate and the antibiotic influence $b(C_S; C_A)$ independently or interdependently. In the IM model, $b(C_S; C_A)$ needs the presence of substrate *or* the absence of antibiotic to increase. In the DM model, $b(C_S; C_A)$ needs the presence of substrate *and* the absence of antibiotic to increase.

To calculate $\mu(C_S)$, we chose a classical Monod growth model. The growth rate $\mu(C_S)$ depends on the substrate concentration C_S , the maximal growth rate μ_{max} , and the Monod constant K_S (equation 13). The Monod growth model usually assumes $\mu(C_S) = 0$ during the lag phase. The growth rate during the lag phase was determined by equation 14, with t_{lag} being the duration of the lag phase. With Y_{XS} , the average mass of substrate consumed to produce one cell, substrate dynamics in the batch culture was determined by equation 15. We assumed the consumption of substrate by persisters to be zero. Substrate concentration over time could be related to growth and switching rates: $\mu(C_S)$, $a(C_S; C_A)$ and $b(C_S; C_A)$.

3.4 Experimental procedures

- Growth rate during exponential and stationary phases

$$\mu(C_S) = \mu_{max} C_S / (C_S + K_S) \quad (27)$$

- Growth rate during the lag phase

$$\text{If } t < t_{lag} \mu(C_S) = 0 \quad (28)$$

- Substrate consumption

$$dC_S/dt = -\mu(C_S)n(t) \times Y_{XS} \quad (29)$$

With equations 7, 8 and 15 we are now able to simulate the dynamics of normal and persistent populations in a batch culture and under antibiotic treatment. $a(C_S; C_A)$ and $b(C_S; C_A)$ must be replaced by the switching model selected. To calibrate our models' parameters we need experimental dynamics of normal and persistent populations in environments with variable substrate concentrations and under antibiotic treatment. A batch culture experiences a diminishing substrate concentration owing to its consumption by growing cells. Switching rates should vary accordingly. To experimentally reveal the persistent population, we must challenge a culture with antibiotic and count the survivors over time. The persister fraction can be quantified by the characteristic biphasic killing curve obtained. Switching rates are also affected by the antibiotic treatments, as assumed by the IM and DM models. Table 3.2 shows the different limit values of $a(C_S; C_A)$ and $b(C_S; C_A)$ in different possible environments for models IM and DM. For model identification purposes, we will use killing curve data obtained from batch experiments.

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

Table 3.2: Limit values of the switching rates in set environments for the IM and DM models.

Normal and persistent population dynamics must be obtained in the different environments to calibrate the models.

Environment/Model	$a(C_S; C_A) \approx$		$b(C_S; C_A) \approx$		Experiment
	IM	DM	IM	DM	
Exponential culture $C_S \gg K$ $C_A \ll K'$	a'	a'	$b' + b_S + b_A$	$b' + b_{SA}$	Batch culture
Stationary culture $C_S \ll K$ $C_A \ll K'$	$a' + a_S$	$a' + a_S$	$b' + b_A$	b'	
Antibiotic treated exponential culture $C_S \gg K$ $C_A \gg K'$	$a' + a_A$	$a' + a_A$	$b' + b_S$	b'	Killing curves obtained by treating batch culture samples
Antibiotic treated stationary culture $C_S \ll K$ $C_A \gg K'$	$a' + a_S + a_A$	$a' + a_S + a_A$	b'	b'	

3.4.2 Experimental setup

3.4.3 Bacterial strain and growth conditions

The strain used was *Klebsiella pneumoniae* CH1440, a Green Fluorescent Protein-tagged strain constructed after the insertion of the mini-Tn7-*gfpmut3* into the genome of the biofilm-forming CH1034 strain (Guilhen *et al.*, 2015) using the method described by Choi and Schweizer (2006).

The strain was grown in M63B1 broth supplemented with glucose (4.0g/L; 1.0g/L or 0.4g/L) and Luria-Bertani agar for CFU count. Overnight cultures were made by inoculating 15ml of supplemented M63B1 broth in a 50ml Erlenmeyer flask with cells from a glycerol stock (-80°C) and incubated 12 hours at 37°C with shaking (100 rpm).

3.4 Experimental procedures

Glucose is assumed to be the only limiting nutrient and is referred to as the substrate in the models' equations.

3.4.3.1 Minimal Inhibitory Concentration

A solution of ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) at 10mg/ml was prepared. The minimal inhibitory concentration (MIC) determined according to the guidelines of the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) with Mueller-Minton (MH) medium was 0.05µg/ml.

3.4.3.2 Killing curves

An overnight culture (12 hours old) was diluted to obtain a 150ml bacterial suspension with an optical density (OD_{620}) of 0.015 in a 1 liter Erlenmeyer flask. This batch culture was run for 24h at 37°C with shaking (100 rpm).

At 0, 1.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 24 hours, 5ml of the batch culture were sampled and placed in a new 50 ml Erlenmeyer flask and supplemented with 1000-fold the ciprofloxacin MIC. For each antibiotic-treated sample, 150µl were taken at 0 (before the addition of ciprofloxacin), 0.5, 1, 3 and 5 hours. Quickly after sampling, each 150µl sample was centrifuged at 6000 g for 1 minute and the bacterial pellet resuspended in 1.5 ml of cold saline (water + NaCl 9g/L). Samples were then appropriately diluted with saline and plated on LB agar with an Easyspiral® using the exponential mode. CFUs were determined after at least 12 hours of incubation at 37°C. We assumed that all bacteria able to resume growth formed a visible colony within this time.

The experiment was performed three times with M63B1 broth supplemented with glucose 4.0g/L, once with 1.0g/L and once with 0.4g/L. A schematic view of the experiments is presented in Figure 3.5.

To check if the survivors of the antibiotic treatments were resistant or susceptible to ciprofloxacin, 100 colonies were transferred on LB agar with 2.0µg/ml of ciprofloxacin. None was able to grow overnight. A bacterial strain is considered resistant to ciprofloxacin if the MIC is >1µg/ml (Bonnet *et al.*, 2015). The colonies transferred were from three samples plated on antibiotic-free LB agar of three 7 hours old cultures treated for 5 hours. Although there could be a few resistant cells, they were in minority compared to tolerant cells and we can reasonably assume that their impact on the killing curves obtained was small.

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

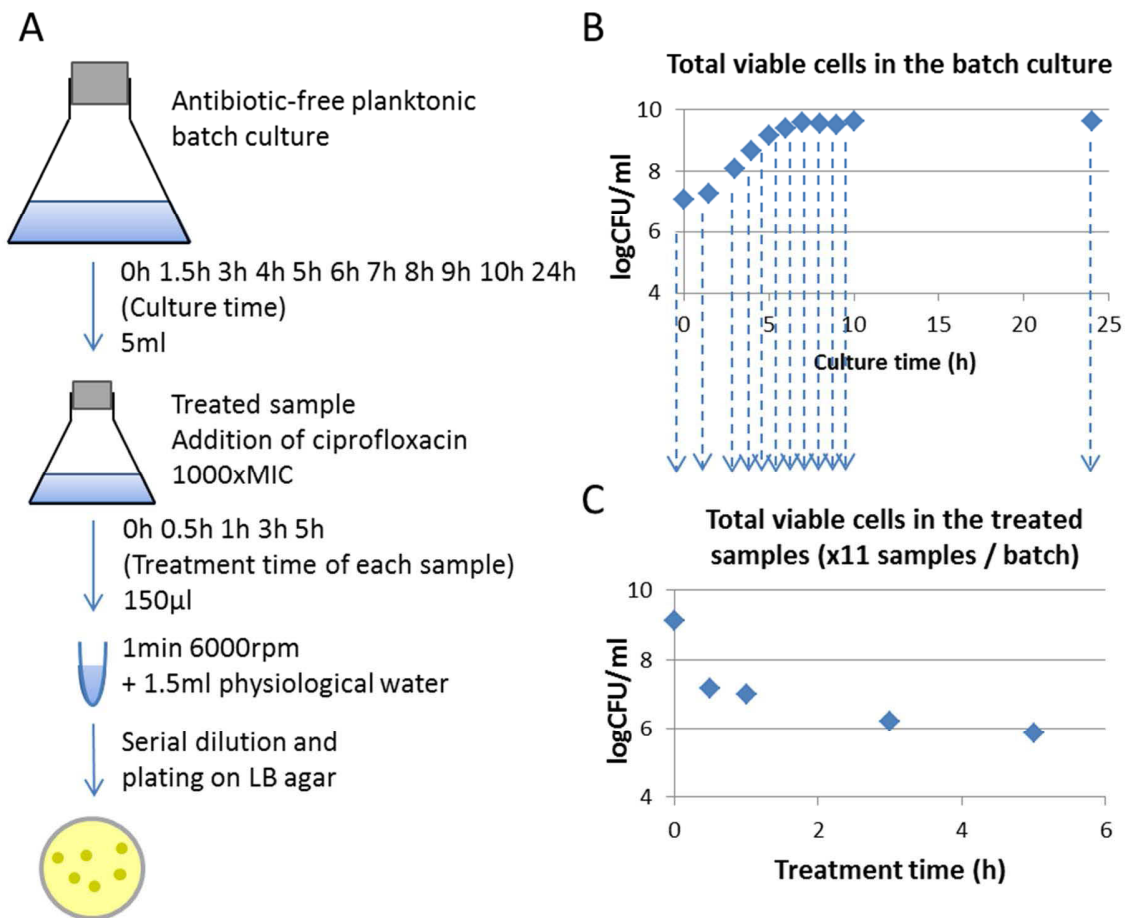


Figure 3.5: Experimental design used to obtain data to calibrate the models.

(A) 5 ml samples were regularly taken from an antibiotic-free batch culture, put into a new flask and treated with 1000-fold the ciprofloxacin MIC. Treated cultures were themselves sampled over time to determine the number of CFUs. (B) The total cells in the batch cultures showed the classical phases of bacterial growth: the lag, exponential and stationary phases. (C) Characteristic biphasic killing curve obtained by quantifying viable cells over time in treated samples. One killing curve is obtained for each 5 ml sample from the batch culture.

3.4 Experimental procedures

3.4.3.3 Quantification of the persistent population from the killing curves

The presence of persisters in a population leads to biphasic killing curves under antibiotic treatment (Figure 3.6). During a treatment, the normal and persistent populations evolve over time as two exponentials (equations 16).

$$X(t) = n_0 \times e^{(-d_n \times t)} + p_0 \times e^{(-d_p \times t)} \quad (30)$$

$X(t)$ is the total population over time. n_0 and p_0 are the initial populations of normal and persister cells in the treated sample. d_n and d_p are the decay rates of the normal and persister populations under the antibiotic treatment. The decay rates are caused by switching rates between normal and persister cells and the susceptibility of both populations to the antibiotic. The two populations are distinguished from each other because $d_n \gg d_p$. By fitting equation 16 to a killing curve, it is therefore possible to quantify the persister fraction in a sample. This method of quantification is used to obtain the experimental measurements of the persister fractions in the treated samples from the batch cultures.

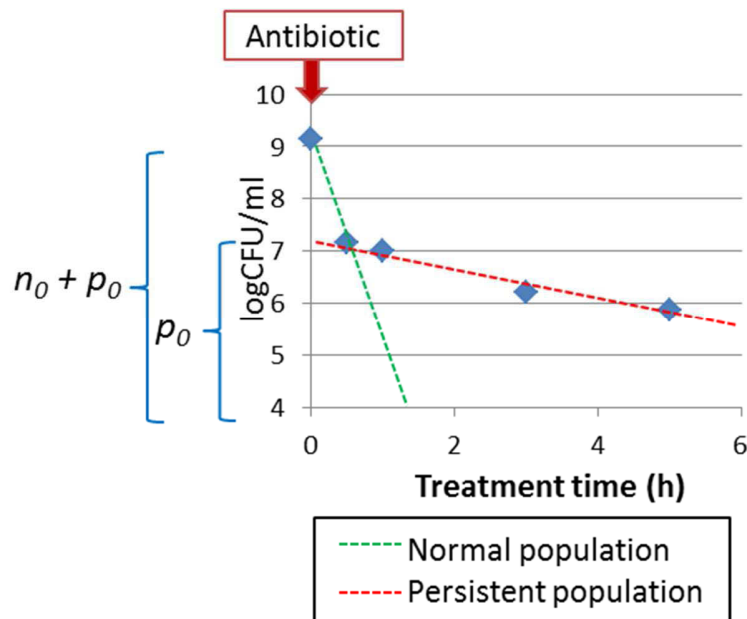


Figure 3.6: Characteristic biphasic killing curve of a population treated with a high dose of antibiotic (here 1000-fold the ciprofloxacin MIC).

The initial persister fraction in the sample, p_0 , can be obtained from the dynamics of the total viable cells ($n + p$) over time under antibiotic treatment.

3 Relier les taux de transition entre cellules normales et persisters aux concentrations de substrat et d'antibiotique : un modèle mathématique soutenu par des expériences

3.4.4 Optimization and validity of the models

The models were implemented in MATLAB®. Simulations were discretized in time and initialized with experimental data, unlike in the study of Balaban *et al.* (2004), who used analytical solutions. The optimization of the parameters was done with the MATLAB® function `lsqcurvefit`, which uses the least square method. The parameters were optimized to obtain the optimal fit between simulated and experimental killing curves. Since the antibiotic concentrations used were very high, we approximated $C_A/(C_A + K) \approx 1$ during simulated antibiotic treatments. We also assumed that the growth rate $\mu(C_S)$ and the substrate consumed were zero during antibiotic treatments. The optimization process of the switching models is presented in the supporting information of this paper (Fig. S1). Solutions obtained were the best local minima obtained from one thousand optimizations run with random initial conditions. The parameters were bounded by relatively narrow limits. The parameters a' , a_S , a_A , b' , b_S , b_A and b_{SA} were bounded by 0 and 2 hours⁻¹. Parameter K was bounded between 0.1*Ks and 10*Ks. Parameter k_n was bounded by 6 and 20 and parameter k_p by 0 and 2 hours⁻¹. Experimental and simulated data were compared in logCFU/ml. The experimental data used for the optimization were the means of the three experiments using the medium supplemented with 4.0g/L of glucose. Thus, all parameters were optimized for an initial substrate concentration of 4.0g/L in the batch culture.

We optimized the parameters of the Monod growth model separately from the switching and death parameters. We assumed that the effect of the switching models on the dynamics of the total populations was negligible. μ_{max} was determined by fitting the function $X(t) = y \times e^{\mu_{max}t}$ to the exponential phase points of the batch culture, between 1.5 and 5 hours (four points). K_S , t_{lag} and Y_{XS} were then optimized by fitting the equations 13, 14 and 15 to the whole growth curve.

To test the extent of the validity of the models, we run simulations by just changing the initial substrate concentration, $C_{S,i}$, to 1.0g/L or 0.4g/L. Simulations were initialized with the experimental normal and persistent populations at $t = 0$ of the experiments with medium supplemented with 1.0 or 0.4g/L of glucose. The other parameters of the models were maintained as optimized for the initial glucose concentration of 4.0g/L. The coefficients of determination (R^2) between simulated and experimental results were used to assess the validity of the models for changes in initial substrate concentrations.

3.5 Acknowledgments

3.5 Acknowledgments

This work was supported by a "Contrat de Plan Etat Region Auvergne". The authors declare no conflict of interest.

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

Présentation de l'article

L'influence de la persistance bactérienne sur la dynamique des biofilms est encore méconnue

Dans le premier article, la persistance bactérienne apparaît comme un mécanisme important de la résilience de la biomasse d'une population bactérienne vis-à-vis des antibiotiques. Le deuxième article propose des modèles qui lient les transitions entre cellules sensibles et persisters aux concentrations en substrat et en antibiotique. Il utilise des données d'expériences sur des cultures planctoniques, où ces concentrations évoluent dans le temps mais sont spatialement homogènes. En revanche, au sein des biofilms, ces concentrations sont spatialement hétérogènes. Un modèle numérique de biofilm doit donc prendre en compte cette hétérogénéité pour lier les transitions phénotypiques aux microenvironnements dans le biofilm. Les paramètres des modèles de transition phénotypique obtenus au chapitre 3 sont spécifiques à la souche et l'antibiotique utilisés pour les expériences. Bien que la méthode de calibration et la structure mathématique des modèles proposés puissent être réutilisées, les paramètres des modèles sont amenés à varier selon les souches bactériennes et les antibiotiques. Afin d'anticiper les dynamiques de formation des persisters dans les biofilms – de couples souche/antibiotique inconnus - il convient de tester les modèles de transitions phénotypiques avec différents jeux de paramètres dans un modèle de biofilm.

Le troisième objectif de cette thèse est de mesurer l'effet de la persistance bactérienne sur la dynamique des biofilms bactériens soumis à des antibiotiques. Pour cela nous avons développé un modèle individu-centré de biofilm qui comprend des transitions de

0 Présentation de l'article

phénotype entre cellules sensibles et persisters. Dérivées des modèles de transitions phénotypiques du chapitre 3, différentes stratégies de transition entre ces deux phénotypes sont testées : stochastique, substrat-dépendant et antibiotique-dépendant. Pour chaque stratégie, différents paramètres sont utilisés. Cet article permet de relier la dynamique des populations de cellules sensibles et de persisters dans les biofilms à la dynamique de la biomasse des biofilms soumis à un traitement antibiotique.

Contributions

Cet article est actuellement soumis à *npj Biofilms and Microbiomes*. Les principales contributions de cet article sont :

- Le développement d'un modèle individu-centré de biofilm prenant en compte les transitions entre cellules sensibles et persisters.
- L'étude des dynamiques de croissance, de survie et de régénération des biofilms soumis à un traitement antibiotique selon différentes stratégies de transition entre cellules sensibles et persisters et avec différents paramètres de ces stratégies.
- Une analyse de sensibilité locale des paramètres du modèle individu-centré.

Conclusions

Les dynamiques de croissance, de survie et de régénération des biofilms varient en fonction des stratégies et des paramètres de transition entre cellule sensibles et persisters. Les transitions phénotypiques dépendant des concentrations en substrat ou en antibiotique confèrent une capacité de régénération plus importante que des transitions environnement-indépendantes. Pour être efficaces, les transitions stochastiques (indépendantes de l'environnement) ont besoin de deux compromis : i) former de nombreux persisters mais ne pas inhiber la croissance globale de la population et ii) réveiller de nombreux persisters à la fin des traitements antibiotiques mais peu pendant les traitements.

Les résultats des simulations confortent l'importance de la persistance bactérienne dans la résilience telle que définie au chapitre 2. Cependant, la formation de persisters n'est pas le seul mécanisme de protection des biofilms. La résilience repose sur un ensemble de mécanismes biologiques mais aussi physiques. Une vue plus globale des processus impliqués dans la résilience nécessite d'intégrer dans un même modèle un ensemble plus complet de mécanismes. La démarche multidisciplinaire des chapitres 3 et 4 éclairci le lien

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

entre la persistance bactérienne, au niveau cellulaire, et la résilience de la biomasse au niveau d'une population.

How do environment-dependent switching rates between susceptible and persister cells affect the dynamics of biofilms faced with antibiotics?

Gabriel Carvalho^{1*}, Damien Balestrino², Christiane Forestier², Jean-Denis Mathias¹

¹UR LISC Laboratoire d'Ingénierie pour les Systèmes Complexes, Irstea, Aubière, France

²LMGE, UMR6023 CNRS, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Abstract

Persisters form sub-populations of stress-tolerant cells that play a major role in the capacity of biofilms to survive and recover from disturbances such as antibiotic treatments. The mechanisms of persistence are diverse and influenced by environmental conditions, and persister populations are more heterogeneous than formerly suspected. We used computational modelling to assess the impact of three switching strategies between susceptible and persister cells on the capacity of bacterial biofilms to grow, survive and recover from antibiotic treatments. The strategies tested were: 1) stochastic switches, 2) substrate-dependent switches and 3) antibiotic-dependent switches. We implemented these strategies in an individual-based biofilm model and simulated antibiotic shocks on virtual biofilms. Because of the limited feedback on switching rates in the literature, nine parameter sets were assessed for each strategy. Substrate and antibiotic-dependent switches allowed high switching rates without affecting the growth of the biofilms. Compared to substrate-dependent switches, stochastic and antibiotic-dependent switches were associated with higher proportions of persisters in the top of the biofilms, close to the substrate source, which probably confers a competitive advantage within multi-species biofilms. The stochastic and substrate-dependent strategies need a compromise between limiting the wake-up and death of persisters during treatments and leaving the persister state fast enough to recover quickly after antibiotic-removal. Overall, the simulations gave new insights into the relationships between the dynamics of persister populations in biofilms and their dynamics of growth, survival and recovery when faced with disturbances.

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

4.1 Introduction

Living as biofilms enables bacterial populations to withstand harsh disturbances such as antibiotic treatments and this lifestyle is the root of many chronic infections and bacterial survival in natural environments.(Jolivet-Gougeon and Bonnaure-Mallet, 2014; Vega and Gore, 2014; Olsen, 2015) Biofilm survival capacity is often conditioned by the formation of internal sub-populations of persisters, i.e. phenotypic variants tolerant to various stresses such as antibiotics.(Balaban, 2011; Kint *et al.*, 2012; Balaban *et al.*, 2013) Unlike resistance, tolerance is temporary and reversible.(Brauner *et al.*, 2016) A commonly accepted model of bacterial persistence is that a few cells can switch to the persister state in an isogenic bacterial population and, inversely, persisters can switch back to the susceptible state.(Balaban *et al.*, 2004) Although persisters tolerate stresses, their growth rate is impaired in comparison to that of actively growing susceptible cells. Several mechanisms are involved in the induction of the persister state including toxin/antitoxin modules and stress-responses such as the stringent and the SOS responses.(Amato *et al.*, 2014; Helaine and Kugelberg, 2014; A. Harms *et al.*, 2016; Radzikowski *et al.*, 2016) Persisters can be produced randomly or in response to environmental conditions such as nutrient deprivation, heat, extreme pH, quorum-sensing molecules and the presence of antibiotics.(Möker *et al.*, 2010; Kint *et al.*, 2012; A. Harms *et al.*, 2016) Persister populations are broadly heterogeneous and bacterial persistence relies on several genes.(Kyle R. Allison *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015; Kaldalu *et al.*, 2016) In addition, persisters are stress-specific: persisters surviving one kind of stress may not survive another kind.(Lechner *et al.*, 2012; Barth *et al.*, 2013) As a result, experimental studies on persisters are largely affected by the environmental conditions, strains and stresses used. The intrinsic heterogeneity of biofilms makes these environmental conditions difficult to predict and control at a cellular level within the community. Computational models are useful to simulate this heterogeneity and predict the population dynamics of susceptible and persister cells in biofilms.

A few mathematical biofilm models have been developed with various switching rates between persisters and susceptible cells.(Roberts and Stewart, 2005; Ayati and Klapper, 2012; Cogan *et al.*, 2013; Szomolay and Cogan, 2015; Zhao *et al.*, 2016) Most models assess one switching strategy with one set of parameters, and simulations are seldom correlated with experimental data. Switching rates are often assumed to be low but experimental evidence is scarce.(Balaban *et al.*, 2004; Lechner *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2017) Given the heterogeneity of persister populations and persister formation mechanisms it is therefore difficult to compare simulated and experimental biofilms. Instead of differential

4.1 Introduction

equations, Chihara *et al.* (Chihara *et al.*, 2015) implemented different persister formation strategies in an individual-based model (Ibm) of biofilm. This kind of model has been used for more than a decade to simulate biofilm formation, structure and heterogeneity. (Kreft *et al.*, 2001; Chambliss and Stewart, 2007; Lardon *et al.*, 2011; Goroehowski, 2016) In Ibms of biofilms, each cell is an independent virtual entity that evolves in a continuous space and interacts with other cells and its microenvironment, such as the local substrate and antibiotic molecules. Using an Ibm, Chihara *et al.* (2015) succeeded in identifying spatial patterns of persister formation in simulated biofilms. However, they did not implement switches from the persister state to the susceptible state nor considered antibiotic treatments. Their model therefore needs to be modified to achieve simulation of biofilm recovery after antibiotic shocks.

The objective of this work was to study the effect of the switching dynamics between susceptible and persister cells on the capacity of biofilms to grow, survive and recover from antibiotic shocks. Because of the diversity of persister producing mechanisms, we tested three switching strategies: 1) stochastic switches, 2) substrate-dependent switches and 3) antibiotic-dependent switches. There is a paucity of evidence about the maximum rates of these switches and so we postulated that they could be low or high and tested nine parameter sets for each strategy. In the first strategy tested, each cell had a constant probability to become persister or susceptible, regardless of its microenvironment. In the second strategy, persister production was triggered by the lack of substrate and reversion to the susceptible state was triggered by its presence. In the third strategy, persister production was triggered by the presence of antibiotic and the reversion to the susceptible state was triggered by its absence. These strategies were implemented in a two-dimensional (2D) individual-based biofilm model. Persisters were non-growing dormant cells much less affected by antibiotics than actively growing susceptible cells. Population dynamics and structures of treated biofilms were obtained from simulations. Strategies were compared at three time points, pre-treatment, post-treatment and post-recovery, to assess the capacity of the biofilms to grow, survive and recover (Figure 4.1). A local sensitivity analysis was also carried out to assess the influence of the model parameters on the different switching strategies.

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

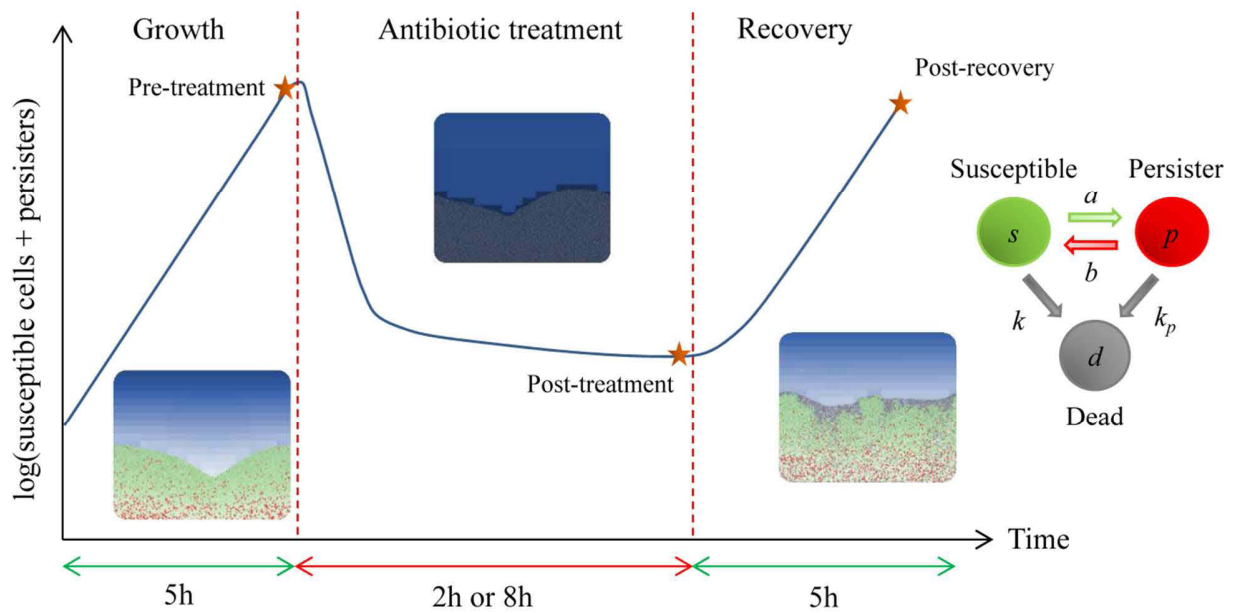


Figure 4.1: Simulation process.

Biofilms grown for 5 hours were then treated for 2 or 8 hours and allowed to recover during another 5 hours after antibiotic removal. Cells can switch between susceptible and persister phenotypes or be killed by the antibiotic. During treatments, susceptible cells die quickly and only persisters survive ($k_n \gg k_p$). After antibiotic treatments, persisters that switch back to actively growing susceptible cells allow the biofilm to recover. To assess the effect of the switching strategies on the growth, survival and recovery of the biofilm, we focused on three time points: pre-treatment, post-treatment and post-recovery.

4.2 Results

4.2.1 Unlike stochastic switches, substrate and antibiotic-dependent switches do not impair the fitness of bacterial populations

For each strategy, nine combinations of the maximum switching rates were tested, from susceptible to persister, a_{max} , and from persister to susceptible, b_{max} . With stochastic switches, high a_{max} values significantly impaired the fitness of the bacterial populations. The biofilms obtained after 5 hours of formation were much smaller than without switches (Figure 4.2). With this strategy, the switching rates were always maximum regardless of environmental conditions, and susceptible cells became non-growing persisters instead of dividing. As a result, the maximum switching rate a_{max} had to be low to not impair the fitness of the bacterial population. With substrate-dependent switches, persister formation was maximum in substrate-deprived zones. Susceptible bacteria intended to become persisters had slow growth rates and did not participate in the overall growth of the biofilms. Consequently, high a_{max} values led to high quantities of persisters within the biofilms without affecting overall growth (Figure 4.2). In contrast, a gradient of substrate concentrations was needed to create substrate-deprived zones and to facilitate the formation of persisters. Hence, there were almost no persisters within young biofilms (< 3 hours, supplementary Figure 7.13 and Figure 7.14). With antibiotic-dependent switches, persister formation was induced by the antibiotic itself. There was no effect therefore on the fitness of the bacterial population since there was no phenotypic switch in the absence of antibiotic. The capacity to sense environmental conditions, i.e. to sense substrate or antibiotic concentrations, allowed bacterial biofilms to have high maximum rates of persister formation (a_{max}) without affecting their overall growth rate.

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

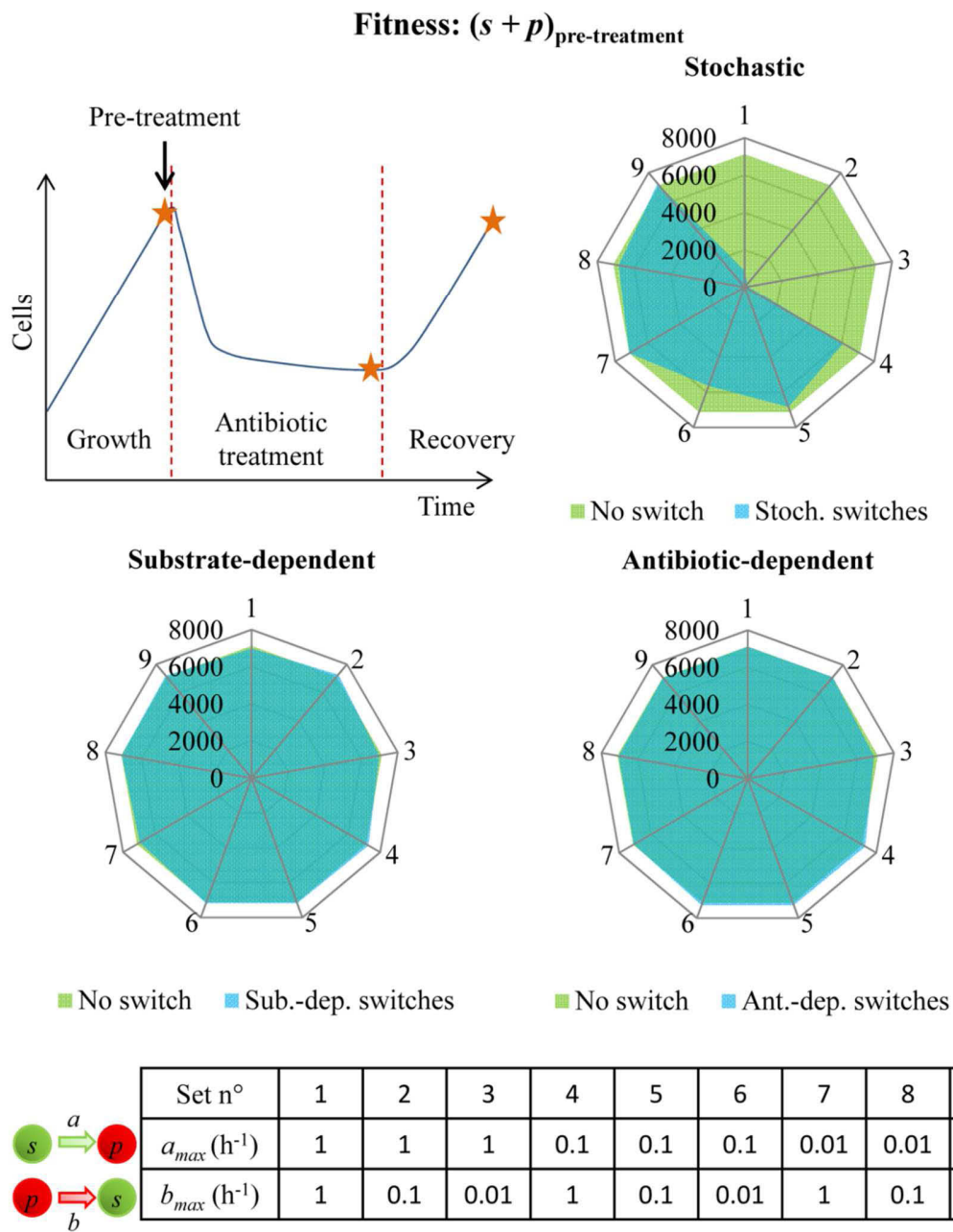


Figure 4.2: Live cells (susceptible cells s + persisters p) after 5 hours of biofilm formation, with and without phenotypic switches.

The numbers around the radar graphs represent the nine parameter sets tested. a_{max} is the maximum switching rate from the susceptible state to the non-growing persister state. b_{max} is the maximum switching rate from the persister state to the susceptible state.

4.2 Results

4.2.2 Only antibiotic-dependent switches prevent the wake-up and death of persisters during treatments

We simulated biofilm formation for 5 hours, and then applied antibiotic treatment for 2 and 8 hours. Without persisters, the biofilms were eradicated within 2 hours after the addition of antibiotic. The stochastic and substrate-dependent strategies were both greatly affected by the treatment duration, particularly when b_{max} was high. With stochastic switches, persisters switched their phenotype regardless of their environment and woke up despite the presence of antibiotics. With substrate-dependent switches, susceptible cells died quickly during treatment and substrate consumption fell. As a result, the substrate concentration in the biofilms increased and triggered the wake-up of persisters. With these two strategies, when $b_{max}=1$, the biofilms recovered from the 2-hour treatments but all persisters woke up and died during the 8-h treatments. b_{max} had to be small for these two strategies to limit the wake-up and death of persisters during treatments. With antibiotic-dependent switches, the antibiotic inhibited the wake-up of persisters. High b_{max} values could be used without affecting the survivability of the biofilm cells undergoing antibiotic treatment. Thus, the biofilms were not much affected by the duration of the treatments. The death of persisters was mainly caused by direct killing by the antibiotic (parameter k_p).

We considered the fraction of survivors as the fraction of the population (susceptible and persisters) able to survive an antibiotic treatment (Figure 4.3). For the stochastic and substrate-dependent strategies, the best fractions of survivors were obtained with high a_{max} and small b_{max} values, which maximized the production of persisters and limited their wake-up during treatment. The stochastic strategy led to better survival because, although high values of a_{max} impaired growth they led to high proportions of persisters in the biofilms. Consequently, stochastic switches with high a_{max} values led to small biofilms with a high proportion of persisters. With antibiotic-dependent switches, susceptible cells must become persisters otherwise they die during treatment. Thus, the fraction of survivors depended on how fast susceptible cells became persisters. The highest fractions of survivors were obtained with the highest a_{max} values and, as stated previously, were not much affected by b_{max} .

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

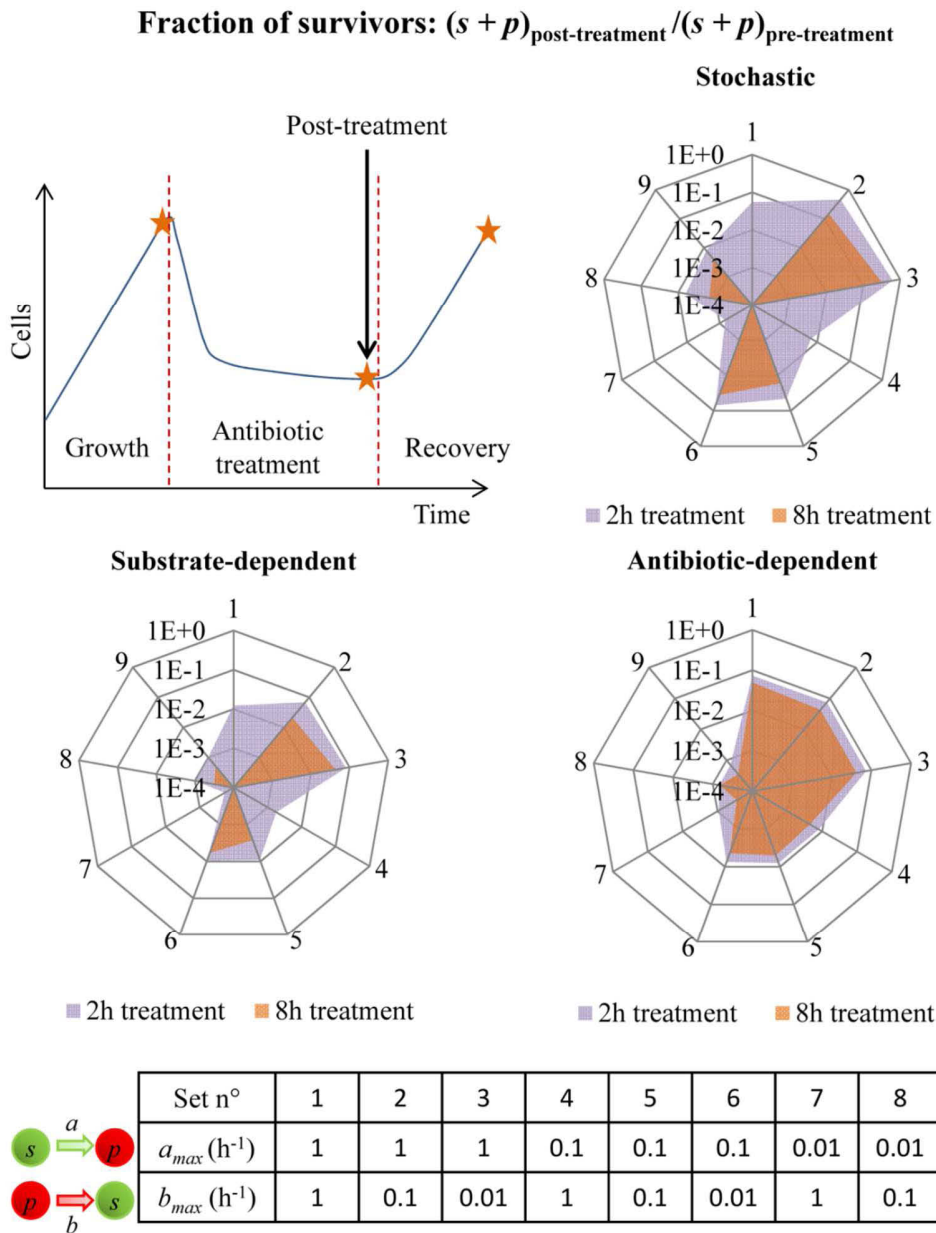


Figure 4.3: Fraction of the populations surviving after 2- and 8h-long antibiotic treatments for the three switching strategies.

Cells reverting to the susceptible state during treatments died quickly. The populations post-treatment were composed solely of persisters: $(s + p)_{\text{post-treatment}} \approx p_{\text{post-treatment}}$. The numbers around the radar graphs represent the nine parameter sets tested. a_{max} is the maximum switching rate from the susceptible state to the non-growing persister state. b_{max} is the maximum switching rate from the persister state to the susceptible state.

4.2 Results

4.2.3 Recovery efficiency depends on the number of persister switches after antibiotic removal

After the antibiotic treatments (2 or 8 hours long), the virtual biofilms were allowed to regenerate for 5 hours. To achieve fast recovery, a great number of persisters had to switch back to the actively growing susceptible state immediately after treatment. This event depends thus on the number of persisters and on their switching rate post-treatment (Supplementary Figure 7.4). For stochastic and substrate-dependent switches, a compromise was needed between persister switches after and during treatment to achieve a high recovery (Figure 4.4). With antibiotic-dependent switches, persister switches were inhibited during treatment and induced by the removal of the antibiotic. Therefore, high b_{max} values did not lead to any counter-effect and allowed a quick recovery after treatment. On the other hand, a slow wake-up rate (i.e. low b_{max} values) allowed the pool of persisters formed during treatment to be maintained for a long time after the stress. Details regarding the population dynamics with the different strategies and parameter sets are available in the supplementary information of this article (Supplementary Figure 7.5 to Figure 7.10).

Altogether, the results showed that an increase in the duration of the treatments limited the recovery of the biofilms for stochastic and substrate-dependent strategies. In all cases, limiting growth by lowering substrate concentrations could be used to limit the recovery speed of the biofilms. However, for the substrate-dependent strategy, substrate depletion induced persister formation. With this strategy, the presence of substrate increased the efficacy of antibiotic treatments. This increase was not greatly effective with low b_{max} values. For the antibiotic-dependent strategy, the wake-up of persisters was triggered by the absence of antibiotic. Thus, frequent short antibiotic pulses should efficiently induce persister switches into the susceptible state in the intervals between treatments. That being said, it is difficult to identify an optimal treatment strategy since its efficacy would largely depend on the switching strategy and its parameter set.

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

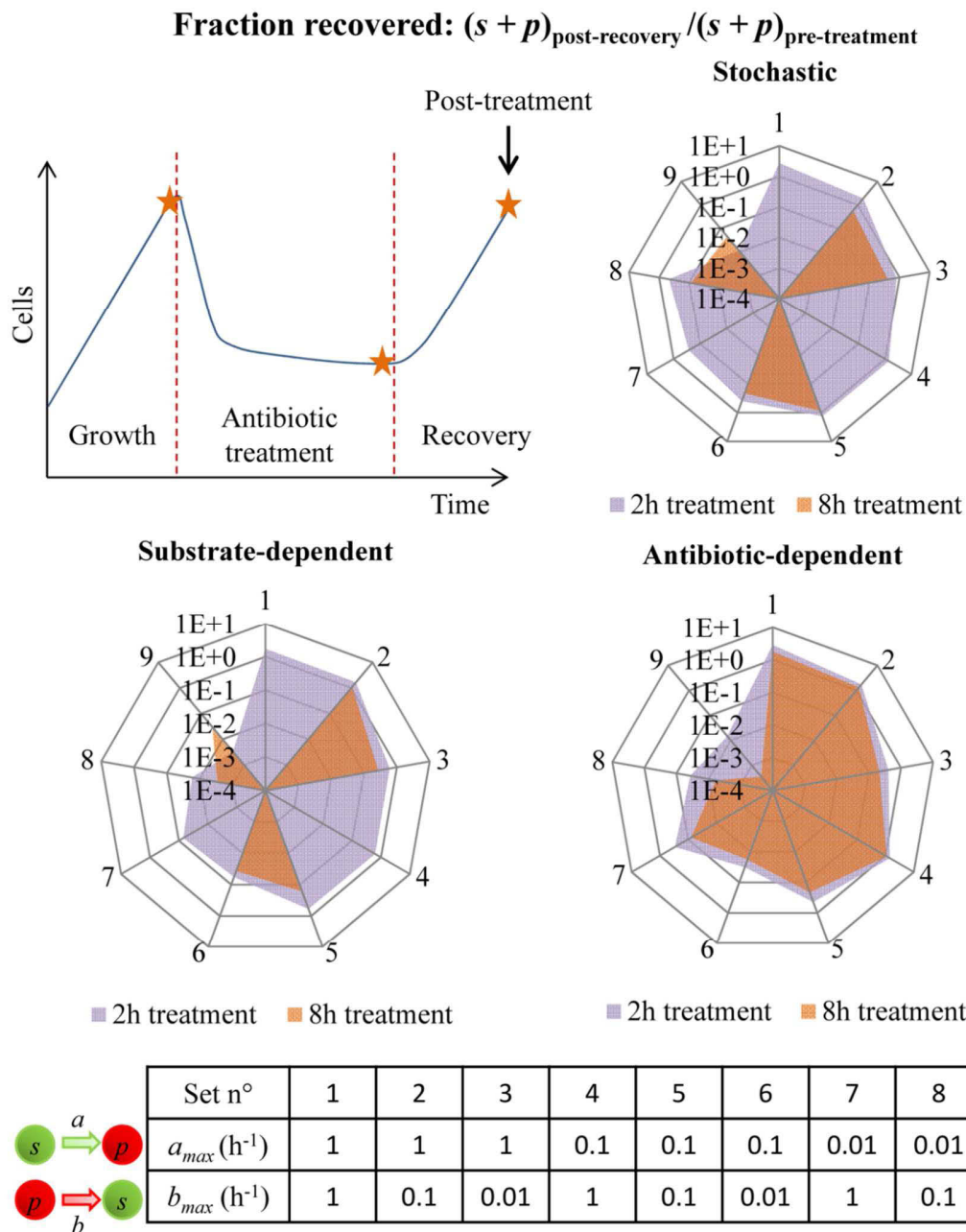


Figure 4.4: Populations recovered 5 hours after the treatment compared to the pre-treatment populations for the three switching strategies.

The numbers around the radar graphs represent the nine parameter sets tested. a_{max} is the maximum switching rate from the susceptible state to the non-growing persister state. b_{max} is the maximum switching rate from the persister state to the susceptible state.

4.2 Results

4.2.4 Post-recovery structural patterns of biofilms depend on the spatial distribution of persisters

As seen in the previous paragraph, recovery efficiency depended on the number of persisters able to switch back to the growing susceptible state after treatment. However, the structures of the resulting biofilms were different, even with similar recovery rates, and depended on the spatial position of the persisters. Figure 4.5 shows biofilms with identical recovery time (5 hours) but with different structures. When a few persisters woke up after treatment, only a few colonies were formed and the majority of the biofilms was composed of dead cells after the 5-hour recovery period (Figure 4.5AD). If many persisters woke up post-treatment, the 5 hours of recovery were sufficient to obtain thick biofilms (Figure 4.5CF). With a homogeneous distribution of persisters, colonies formed post-treatment pushed against the dead cells around them and colonies encountering each other left characteristic strips of dead cells between them (Figure 4.5BC). If persisters were mainly distributed in the bottom of the biofilms, colonies formed post-treatment pushed against dead cells above them and created a shell of dead cells above the biofilms (Figure 4.5EF).

New-formed colonies near to the top of the biofilms were closer to the substrate source and were thus at an advantage compared to the colonies at the bottom. Although the spatial distribution of persisters did not affect the recovery efficiency of the biofilms in our simulations, it could be a competitive advantage in multi-species biofilms to form colonies in strategical spatial positions such as the top of the biofilms. With the substrate-dependent strategy, persisters were formed in substrate-depleted zones at the bottom of the biofilms. With the stochastic and antibiotic-dependent strategies, persisters were homogeneously distributed, thereby increasing the probability to form colonies near the biofilm surface. All the post-recovery biofilms for the different strategies and parameter sets are presented in the supplementary information of this article (Supplementary Figure 7.11 to Figure 7.16).

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

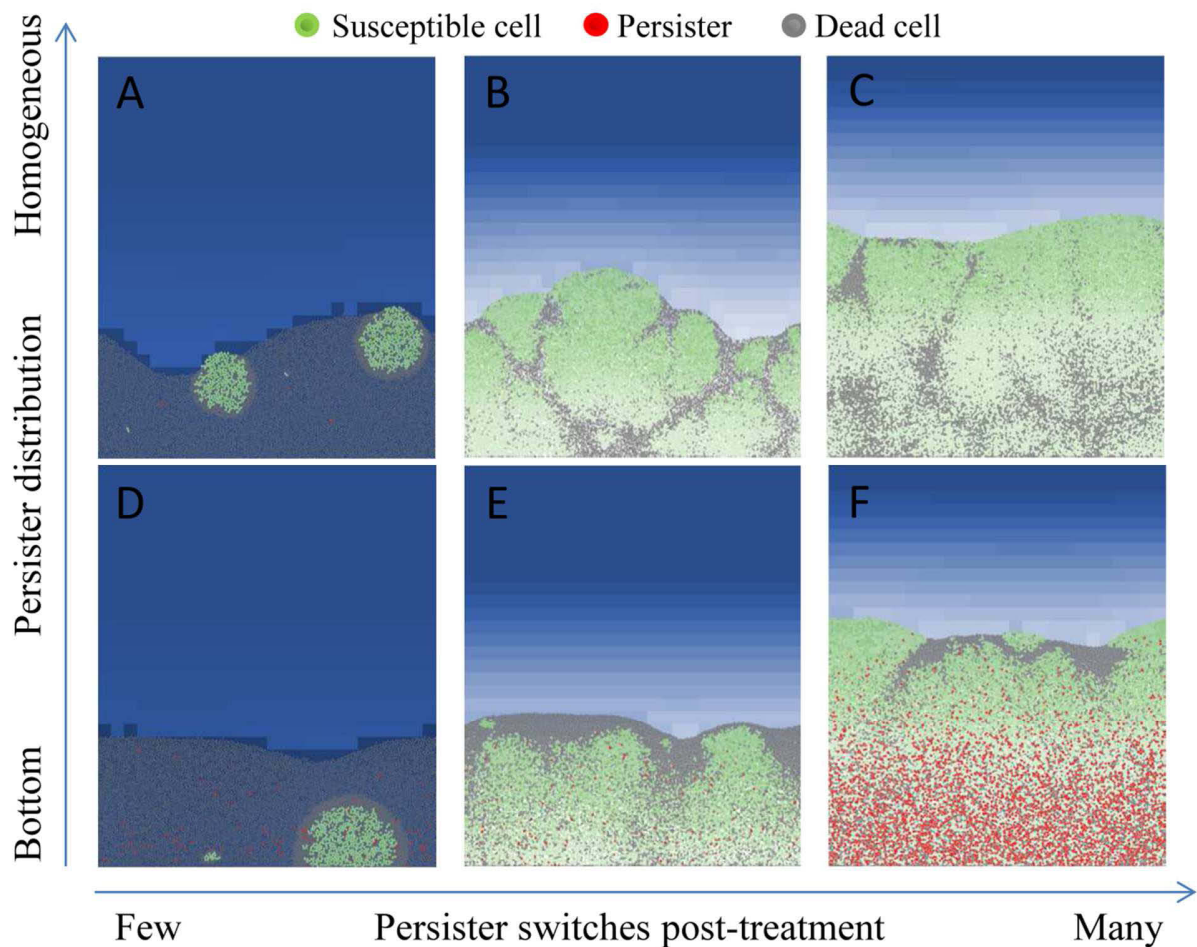


Figure 4.5: Structural patterns of the recovered biofilms 5 hours after the treatment. The efficiency of the recovery depends on the number of persisters that have been able to switch to actively growing cells at the end of the treatment. This event depends on the number of persisters able to survive the treatment and on their switching rate b . A high rate of persister switches post-treatment leads to a fast recovery and thick biofilms after the five hours of recovery. When persisters wake up at the bottom of the biofilms, the resulting colonies push against dead cells above them and form a shell of dead cells above the biofilms. When persisters wake up randomly in the biofilms, the colonies push against dead cells around them and two colonies that encounter each other form characteristic strips of dead cells.

4.3 Discussion

4.2.5 Increasing the maximal growth rate disproportionally affects substrate-concentration gradients in biofilms and hence survival with substrate-dependent switches

A local sensitivity analysis showed that the maximal growth rate, μ_{max} , was the parameter that affected the most the outputs of the simulations (Supplementary Figure 7.17). Increasing the maximal growth rate by 20% increased the total cells pre-treatment by 60% with all switching strategies. However, it increased the fraction of survivors up to 320% for the substrate-dependent strategy (with the parameter set 2: $a_{max}=1$ and $b_{max}=0.1$), while μ_{max} did not much affect the fraction of survivors with the stochastic and antibiotic-dependent strategies. This enhanced survivability was directly related to the formation of higher proportions of persisters pre-treatment. μ_{max} affected the growth rate of susceptible cells and their substrate consumption. With an increased μ_{max} , cells grew and consumed substrate faster, leading to thicker biofilms but without any increase in the number of actively growing cells, owing to the limitation of substrate availability. As a result, the proportion of starving cells in the biofilms increased with μ_{max} . Since persister formation was maximum in substrate-depleted zones with substrate-dependent switches, higher proportions of persisters were obtained pre-treatment and hence better biofilm survival.

4.3 Discussion

Bacterial persistence is ubiquitous in many bacterial species able to form biofilm such as *Escherichia coli* (Wu *et al.*, 2015), *Staphylococcus aureus* (Lechner *et al.*, 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (Mulyukin *et al.*, 2015) and *Klebsiella pneumoniae* (Carvalho *et al.*, 2017). Given the ephemeral nature of persisters, their heterogeneity and the diversity of their formation mechanisms, it is difficult to relate the dynamics of persister populations within biofilms to their capacity to grow, survive and recover from biocide shocks such as antibiotic treatments. The simulations unveiled a variety of possible population dynamics according to the switching strategy between susceptible and persister cells and the parameter set used.

The diversity of persister dynamics observed made it difficult to generalize a treatment strategy to eradicate biofilms. The presence of persisters allowed the survival and recovery of biofilms with most of the parameter sets used. Environment-dependent switches, compared to stochastic switches, were more effective in achieving biofilm

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

recovery (Supplementary Figure 7.5 to Figure 7.10). Devising a treatment strategy depends on the switching strategy but also on the maximum switching rates. For example, with substrate-dependent switches, substrate can be added with the antibiotic to enhance the efficacy of treatments but it would have a limited effect if the maximum switching rate from persister to susceptible were low and would on the contrary favor biofilm growth, concentration gradients and persister formation. Thus, treatment strategies must be adapted to the persistence mechanisms and dynamics. The use of molecules able to target persisters directly seems inevitable and this strategy has already been proven to improve treatment efficacy.(Barraud *et al.*, 2013; Conlon *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015) Several methods can combat persister cells, either by inhibiting their formation, waking them up or by killing them directly.(Kyle R Allison *et al.*, 2011; Sultana *et al.*, 2016; Wood, 2016b) However, the appropriateness of these methods depends on the mechanisms of persister formation and persister type.

The resistance and resilience of the composition and function of microbial communities subject to–disturbance are recurrent themes in microbial ecology, in which persister population dynamics could play an important role.(Shade, Peter, *et al.*, 2012) Persisters are tolerant to various stresses in addition to antibiotics such as low pH and heat,(Wang *et al.*, 2015) and interspecies differences in persister population dynamics could explain shifts in natural biofilm community composition after disturbances. The population dynamics observed in our simulations were diverse, depending on the switching strategy and parameter set used (Supplementary Figure 7.5 to Figure 7.10). Efficient recovery and strategic spatial positions such as the top of the biofilm, close to the nutrient source, could give a competitive advantage after removal of stress. Colonies recovered on the top also detach easily and by subsequently colonizing other surfaces gain a fitness advantage.(Nadell and Bassler, 2011) However, multi-species biofilms may also share protection mechanisms that add to the complexity of their response to disturbances.(Burmølle *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2014)

Phenotypic heterogeneity allows bacterial populations to adopt a bet-hedging strategy to increase their fitness in fluctuating environments.(Beaumont *et al.*, 2009) Via phenotypic switches, sub-populations can arise with phenotypes adapted to new environmental conditions. Bacterial persistence may be a particular instance of this phenomenon, in which the phenotypic variants are tolerant to antibiotics. The rates of phenotypic switches can evolve within a few generations of cells and could be complementary to permanent phenotypic changes.(Fridman *et al.*, 2014) Individual-based models are well-designed to represent cell individuality and are useful to simulate the phenotypic and spatial

4.4 Methods

heterogeneity of cell populations. Because of the difficulty in observing individual cells, these models are emerging as a valuable complement to current experiments.

4.4 Methods

4.4.1 Overview of the individual-based biofilm model

The model constructed derives from previously developed individual-based biofilm models.(Alpkvist *et al.*, 2006; Lardon *et al.*, 2011) Cells grow, divide and push against one another to generate a biofilm. Dissolved substrate and antibiotic diffuse and react with the cells in a diffusion-reaction fashion. They diffuse from a bulk liquid above the biofilm, where concentrations are maintained constant, across a boundary layer toward the biofilm (Supplementary Figure 7.3). In the model, bacteria can be susceptible, persister or dead. Unlike in a few previous models,(Xavier *et al.*, 2005; Lardon *et al.*, 2011) detachment, cell maintenance, shrinking of the biofilm and EPS production are not taken into account. (Chihara *et al.*, 2015) The simulated time is assumed to be low enough to limit the effect of these factors. The computational model developed is available on NetLogo.com. Although the computation time is long when there are many cells, the graphical interface of NetLogo makes the model easy to manage and to modify.

4.4.2 Simulation process

At the start of a simulation, ten susceptible bacteria are set up randomly on the surface ($y=0$). The initial concentration of substrate in all the computational domain is equal to the concentration in the bulk, $C_{S,bulk}$. The diffusion-reaction dynamics and cell dynamics operate at different time scales and we assume that diffusion-reaction is at steady state when cells are updated.(Picioreanu *et al.*, 1999; Xavier *et al.*, 2005) The default value of the time step of cell update (Δt_{cell}) is one minute. Results presented are the means of four simulations with different random seeds.

4.4.3 Cell growth

Cell growth follows a Monod kinetic model. There is only one growth-limiting substrate that each susceptible cell i consumes to increase its mass m_i . We assume that persister cells do not grow or consume substrate. m_i varies according to equation 1.(Kreft *et al.*, 1998; Picioreanu *et al.*, 2004) C_S is the substrate concentration, μ_{max} is the maximal specific

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

growth rate and K_S is the half-saturation constant for substrate S . Cells are cylinders of length Δl and diameter d_i that depends on cell mass and density ρ (equation 2).

$$\frac{dm_i}{dt} = m_i \cdot \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{C_S + K_S} \quad (31)$$

$$d_i = \sqrt{\frac{4 \times m_i}{\rho \times \Delta l \times \pi}} \quad (32)$$

Cell division is triggered by a threshold mass m_{max} . (Lardon *et al.*, 2011; Robert *et al.*, 2014) To avoid division synchronization, daughter cells randomly receive 40 to 60 percent of the mass of their mother cell from a uniform distribution. (Ghanbari *et al.*, 2016) The sum of the mass of the two daughter cells is equal to that of their mother. Their centers are randomly set opposite each other on the edge of the mother cell, without overlapping.

4.4.4 Shoving algorithm

Cellular growth and division may create overlaps between cells. These overlaps are relaxed by a shoving algorithm. (Kreft *et al.*, 2001; Xavier *et al.*, 2005; Lardon *et al.*, 2011) If a bacterium overlaps one or more neighbors, it moves by a vector directed from the center of the overlapping neighbor to its own center. The shoving vector of a cell i ($u_{S,i}$) is calculated by equation 3 with a_i the radius of the cell, a_h the radius of the neighbor h , d_h the distance between the center of the two overlapping cells and u_h a unitary vector directed from the center of neighbor h to the center of cell i . The shoving algorithm is run until less than five percent of the cells are still moving or if it reaches a maximum number of iterations. To avoid heavy computation time, this maximum is set at one thousand iterations per cell update.

$$u_{S,i} = \sum_{h=1}^N \frac{a + a_h - d_h}{2} \cdot u_h \quad (33)$$

4.4.5 Antibiotic treatment

At the start of the antibiotic treatments, the antibiotic concentration in the bulk is set to $C_{A,bulk}$ and the antibiotic diffuses toward the biofilm. At the end of the antibiotic treatments, the antibiotic is set to zero in the bulk and leaves the biofilm by diffusion. High concentrations of antibiotics are used so that they quickly diffuse into the biofilms and kill susceptible cells. If the antibiotic concentration C_A is greater than the minimum inhibitory concentration (MIC), the killing rate k of the susceptible population is determined by

4.4 Methods

equation 4. The killing rate of the persister population k_p is determined by equation 5. k_{max} is the maximum killing rate of susceptible cells and k_{maxp} is the maximum killing rate of persisters. K_A is a constant so that $k(C_A=MIC)=\mu_{max}$. Hence, when $C_A \geq MIC$, the growth rate of the population cannot exceed its killing rate, which would contradict the definition of the MIC.

$$k(C_A) = k_{max} \cdot \frac{C_A}{C_A + K_A} \quad (34)$$

$$k_p(C_A) = k_{maxp} \cdot \frac{C_A}{C_A + K_A} \quad (35)$$

Persisters have a better survivability than susceptible cells because $k_{max} \gg k_{maxp}$. To convert these killing rates into individual probabilities of dying, at each time step Δt_{cell} , a random number between 0 and 1 is produced. If the number is below $\Delta t_{cell} \cdot k(C_A)$ or $\Delta t_{cell} \cdot k_p(C_A)$, the cell dies. The cells have different probabilities of dying depending on their phenotype and local antibiotic concentration. Dead cells become inactive and remain in the computational domain for the remainder of the simulation.(Chambless *et al.*, 2006) They continue to participate in the shoving algorithm but their diameter is reduced by twenty percent compared to growing cells and persisters to take into account their shrinking. There is little feedback from previous models on the fate of dead cells in treated biofilms.(Chambless *et al.*, 2006; Fagerlind *et al.*, 2012) We chose to have the treated biofilms keep their structure intact despite being dead.(Zrelli *et al.*, 2013) Lardon *et al.* (2011) hypothesized that dead cells progressively convert their mass into substrate and this approach was used in a few planktonic batch models,(Teng *et al.*, 2009; Lardon *et al.*, 2011; Takano *et al.*, 2017) In our model, dead cells are lysed at a rate L_{DS} . If their size goes under a minimal threshold, they are removed, the effect of this process on mass conservation being small.

4.4.6 Diffusion-reaction of solutes

The solutes, namely the substrate and the antibiotic, diffuse in the environment. The general mass balance for a component n of concentration C_n is set up by a partial differential equation (equation 6).

$$\frac{dC_n}{dt} = D_n \cdot \nabla \cdot C_n + r_n \quad (36)$$

$\nabla = \vec{i} \frac{d}{dx} + \vec{j} \frac{d}{dy}$ is the vector gradient operator. x and y are spatial coordinates. D_n is the diffusion coefficient of component n . r_n is the consumption (negative) or production

4 Comment les taux de transitions entre cellules sensibles et persisters dépendants de l'environnement affectent-ils la dynamique de biofilms soumis à un traitement antibiotique ?

(positive) of component n . This equation is resolved by discretizing the computational space.(Alpkvist *et al.*, 2006; Mabrouk *et al.*, 2010; Lardon *et al.*, 2011) Diffusion-reaction occurs on a grid with voxels of length Δl (see supplementary information). We assumed the diffusion inside the biofilm is constant although limited. The diffusion coefficient inside the biofilm is D_n^b . We set $D_n^b = 0.8 * D_n$.(Lardon *et al.*, 2011) A few antibiotics such as ciprofloxacin have been reported to diffuse quickly in biofilms and we assumed that limited penetration does not protect the biofilms.(Anderl *et al.*, 2000) In addition, we used high antibiotic doses in our simulations. Lateral boundaries of the computational domain are periodic. Cells and solutes cannot penetrate the surface under the biofilm. Concentrations are kept constant in the bulk. The consumption of substrate on a grid cell is the sum of the uptake of each bacterium in it.(Kreft *et al.*, 1998) It is defined by equation 6. $X_{x,y}$ is the biomass of growing cells on the grid cell located at $(x;y)$ and Y_{XS} is the biomass yield. $X_{x,y}^d$ is the mass of dead cells on the grid cell located at $(x;y)$ and L_{DS} is the lysis rate of dead biomass. We assumed that antibiotic consumption is zero ($r_A=0$).

$$r_S = -X_{x,y} \times \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{C_S + K_S} \times \frac{1}{Y_{XS}} + X_{x,y}^d \times L_{DS} \quad (37)$$

4.4.7 Phenotypic switches between susceptible and persister cells

We derived three switching strategies from the switching models of Carvalho *et al.*(Carvalho *et al.*, 2017) The switching models are defined by the equations 8 to 13 where a_{max} , b_{max} , K and K' are constants. For the default parameters, we chose $K=K_S$ and $K'=MIC$. $a(C_S)$ is maximum when $C_S \ll K$ and close to zero when $C_S \gg K$, inversely for $b(C_S)$. $a(C_A)$ is maximum when $C_A \gg K'$ and close to zero when $C_A \ll K'$, inversely for $b(C_A)$. The switching rates a and b are converted to individual switching probabilities for simulations.

- Strategy St, stochastic switches:

$$a = a_{max} \quad (38)$$

$$b = b_{max} \quad (39)$$

- Strategy Sd, substrate-dependent switches:

$$a(C_S) = a_{max} \times \left(1 - \frac{C_S}{C_S + K}\right) \quad (40)$$

$$b(C_S) = b_{max} \times \left(\frac{C_S}{C_S + K}\right) \quad (41)$$

- Strategy Ad, antibiotic-dependent switches:

4.5 Acknowledgments

$$a(C_A) = a_{max} \times \left(\frac{C_A}{C_A + K'} \right) \quad (42)$$

$$b(C_A) = b_{max} \times \left(1 - \frac{C_A}{C_A + K'} \right) \quad (43)$$

4.4.8 Local sensibility analysis

The default parameters used for the simulations are presented in supplementary table S1. To analyze the sensibility of the model to the different parameters, we separately decreased or increased each parameter by twenty percent and compared total live cells pre-treatment, post-treatment and post-recovery with the default results (Supplementary Figure 7.17). For each strategy, the switching rate parameters used were those that gave the most live cells after recovery with the default parameters: $a_{max}=0.1$ and $b_{max}=0.1$ for stochastic switches, $a_{max}=1$ and $b_{max}=0.1$ for substrate-dependent switches, $a_{max}=1$ and $b_{max}=1$ for antibiotic-dependent switches.

4.5 Acknowledgments

We thank the Région Auvergne, France, for financing this work.

5 Discussion générale

5.1 Bilan

Il est constaté dans la littérature que, soumises à des traitements antibiotiques, les populations bactériennes sont capables de survivre et de se régénérer. Cela est d'autant plus vrai pour les biofilms, qui sont capables de surmonter des perturbations létales pour des bactéries planctoniques (Bernier *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2015; Flemming *et al.*, 2016). L'ambition de cette thèse était d'établir les bases de la résilience aux antibiotiques de biofilms bactériens à travers des approches conceptuelles, expérimentales et de modélisation.

Nous avons posé des bases conceptuelles pour formaliser la résilience aux antibiotiques des populations bactériennes, planctoniques et en biofilms. Cette formalisation tient en quatre étapes : (i) définir le cadre spatial et temporel du système étudié, (ii) choisir une propriété d'intérêt par rapport à laquelle la résilience et la résistance seront considérées, (iii) choisir les perturbations à prendre en compte, en type, intensité, durée et fréquence, (iv) sélectionner les mécanismes qui influencent la résilience et la résistance de la propriété d'intérêt considérée vis-à-vis des perturbations définies dans les contraintes du système défini. Cette méthode impose de définir ce qui est considéré comme résilient ou résistant, par rapport à quoi et dans quel contexte.

Afin de formaliser la problématique de résilience aux antibiotiques d'une population bactérienne, nous avons considéré une biomasse minimale comme propriété d'intérêt à titre illustratif. La simplicité de cette propriété d'intérêt laisse le système libre d'évoluer, en changeant de composition ou de fonctions. Contrairement à l'écologie microbienne, en bactériologie clinique, l'objectif principal concerne l'éradication de la population bactérienne. L'indicateur utilisé, la mesure de la biomasse, est représentatif de l'objectif souhaité. Considérant une biomasse minimale comme propriété d'intérêt, une population résistante conserve ou augmente sa biomasse malgré la présence de l'antibiotique. Une population résiliente survie partiellement puis reprend sa croissance à la suite du traitement. La résilience dépend alors de la capacité brute du système à survivre et à se régénérer et est liée à de nombreux mécanismes biologiques tels que l'hétérogénéité génétique, phénotypique et spatiale de la population étudiée. Ces hétérogénéités sont des caractéristiques très présentes dans les biofilms.

5.1 Bilan

L'hétérogénéité phénotypique est activement entretenue au travers du phénomène de persistance bactérienne. Ce phénomène repose sur des transitions phénotypiques entre les cellules sensibles, se divisant activement, et les persisters, tolérants aux antibiotiques mais ne se divisant pas ou peu. Ces transitions sont influencées par les conditions environnementales. Pour étudier la persistance bactérienne dans les biofilms, nous avons donc tout d'abord développé des modèles numériques liant ces transitions aux concentrations en substrat et en antibiotique. Ces modèles ont été calibrés à partir de données expérimentales. Nous avons ensuite développé un modèle individu-centré (IC) de biofilm intégrant ces modèles de transition phénotypique. Nous avons déterminé les paramètres de transition d'une seule souche de *K. pneumoniae*. Afin d'anticiper le comportement d'autres souches nous avons utilisé le modèle IC pour tester l'influence de différentes stratégies et paramètres de transition entre cellules sensibles et persisters sur la capacité des biofilms à croître, survivre et se régénérer. Cette capacité rejoint la résilience d'une biomasse minimale aux antibiotiques.

L'apport conceptuel sur la résilience apporté par cette thèse permet de formaliser clairement la problématique de la résilience aux antibiotiques de biofilms bactériens. Cependant, nous proposons bien une démarche pour formaliser la résilience et non une définition figée. La propriété d'intérêt, les perturbations prises en compte ainsi que les limites spatiales et temporelles du système étudié sont susceptibles de varier selon les études. Ceci donne une certaine flexibilité au concept.

Les contributions de cette thèse sur la persistance bactérienne augmentent notre compréhension de l'influence de ce phénomène sur la dynamique des biofilms soumis à des antibiotiques. En considérant la résilience aux antibiotiques comme la capacité à retrouver un certain niveau de biomasse après un traitement, la persistance bactérienne soutient la résilience en permettant la survie partielle puis la régénération d'une population de bactéries. Comme montré au chapitre 4, l'efficacité de cette régénération est largement influencée par les stratégies de formation des persisters. Néanmoins, notre compréhension de la persistance bactérienne reste incomplète. Bien que des mécanismes biologiques soient clairement identifiés comme étant impliqués dans ce phénomène, la persistance bactérienne émerge parfois de la simple hétérogénéité des populations bactériennes. Cette hétérogénéité est d'autant plus marquée quand ces populations forment un biofilm. Distinguer la part de cette hétérogénéité activement entretenue par les bactéries et la part purement aléatoire reste un défi. En effet, la résilience aux antibiotiques repose également sur la diversité des réponses individuelles des bactéries

face aux traitements, une diversité seulement en partie entretenue par les mécanismes de la persistance bactérienne.

5.2 Résultats préliminaires d'expériences en cours

5.2.1 Obtenir des données à comparer aux simulations du modèle individu-centré de biofilm par des expériences *in vitro*

Pour valider le modèle individu-centré (IC), il est essentiel de confronter les résultats de simulations (*in silico*) aux résultats de modèles expérimentaux (*in vitro/in vivo*). Dans ce but, nous avons initié des expériences en *flow cell* associée à la microscopie confocale et à des mesures par cytométrie en flux.

Le système expérimental de *flow cell*, couplé à la microscopie confocale, permet d'observer le développement d'un biofilm sur une lamelle en verre tout en maintenant un flux de milieu nutritif. D'après les résultats de simulation présentés dans le chapitre 4 de cette thèse, la dynamique de régénération des biofilms est caractéristique de la dynamique de formation et de réveil des persisters. L'évolution de la structure spatiale d'un biofilm se développant en *flow cell* pendant et après un traitement antibiotique pourrait être comparée aux résultats de simulations pour valider ou montrer les limites actuelles du modèle IC. Dans le but d'obtenir de telles données, la souche de *K. pneumoniae* utilisée au chapitre 3, génétiquement modifiée pour exprimer de façon constitutive une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP), a été cultivée en *flow cell* et la formation de biofilm observée au microscope confocal en fonction du temps. Le protocole expérimental et des résultats préliminaires non publiés sont disponibles en annexe 7.3.

Les résultats obtenus lors des deux expériences de régénération – un biofilm âgé de 12 heures traité pendant 12 heures à la ciprofloxacine puis observé pendant 12 heures sans antibiotique - avec deux *flow cells* différentes, se sont avérés non reproductibles. Pour une expérience, les biofilms sont restés stables pendant les 12 heures d'observation après le traitement. Pour l'autre expérience, les cellules ont repris leur croissance en formant des filaments. La formation de filaments, c'est-à-dire que les bactéries s'allongent sans pour autant se diviser, a déjà été rapportée suite à des traitements à la ciprofloxacine chez *E.coli* et lors de l'induction de la réponse SOS (Bos *et al.*, 2015; Vedyaykin *et al.*, 2017). Il est possible que la concentration en ciprofloxacine reste trop élevée dans la *flow cell* pour que les biofilms puissent se régénérer dans les 12 heures qui suivent le traitement. Le débit de

5.2 Résultats préliminaires d'expériences en cours

milieu pourrait être augmenté pour lessiver plus rapidement l'antibiotique, le temps d'observation pourrait être allongé ou encore du $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ pourrait être utilisé pour neutraliser la ciprofloxacine (Marques *et al.*, 2005). Les résultats préliminaires obtenus ne peuvent pas être comparés en l'état aux résultats de simulations car la position des cellules survivantes (les persisters) dans les biofilms traités ne peut pas être déterminée.

Afin de compléter les expériences en *flow cell*, un protocole permettant de quantifier la proportion de cellules sensibles, de persisters et de cellules mortes par cytométrie en flux est en développement. Un triple marquage au DAPI (marqueur de toutes les cellules), au ChemChrome V6 (CV6, marqueur d'activité esthérasique) et à l'Iodure de Propidium (IP, marqueur de cellules dont la membrane est endommagée) permettrait une telle différenciation à partir de suspensions de cellules issues de biofilms dispersés. Les différents types de cellules seraient donc marqués comme suit :

- Cellules actives (Sensibles) : DAPI + CV6
- Cellules inactives (Persisters) : DAPI
- Cellules lysées (Mortes) : DAPI + IP

Lors de la mise au point, le marquage au CV6 a fait apparaître une population active, fortement réduite pour les cultures traitées à l'ampicilline par rapport aux populations témoins (non traitées). Cependant, l'IP n'a marqué aucune cellule bien que l'ampicilline cible la paroi bactérienne. Il n'a donc pas été possible de différencier les persisters des cellules mortes. La souche de *K. pneumoniae* utilisée, la même qu'au chapitre 3, est encapsulée et il est possible que les cellules non viables restent imperméables à l'IP en raison des polysaccharides capsulaires à la surface des cellules.

Il est raisonnable de penser que les persisters ont une activité réduite par rapport aux cellules sensibles. Cependant, une activité réduite n'est pas une garantie de persistance (Orman and Brynildsen, 2013). La suite de la mise au point de cette méthode implique de réitérer l'expérience avec un mutant non capsulé et de comparer la fraction de cellules inactives avant-traitement et la fraction de survivants après-traitement.

5.2.2 Cartographier la persistance bactérienne

La souche de *K. pneumoniae* utilisée au chapitre 3 produit de nombreux persisters à la ciprofloxacine. Or, la persistance bactérienne a été peu étudiée dans cette espèce bactérienne. Etablir une cartographie de la persistance bactérienne chez un ensemble de

5 Discussion générale

souches de différentes origines dont des souches cliniques donnerait une vision plus globale et plus pertinente de ce phénomène.

Nous avons débuté un tel projet en sélectionnant des souches de *K. pneumoniae* de quatre types : environnementales, isolées de porteurs sains, multi-résistantes et hyper-virulentes (Blin *et al.*, 2017). Des cultures de chaque souche ont été traitées en phase de latence, exponentielle et stationnaire avec des concentrations de ciprofloxacine 100 fois supérieures à la CMI. Les fractions de survivants après 26 heures de traitement sont présentées dans la Figure 5.1. Les CMI et les courbes de traitement sont disponibles en annexes.

Ces résultats préliminaires montrent que la plupart des souches se comportent de manière similaire. La fraction de survivants est minimum en phase exponentielle et est maximum en phase stationnaire, même si ce profil est plus ou moins marqué selon les souches. Cependant, deux des souches hyper-virulentes se comportent différemment. Ainsi, pour les souches 1487 et 1493, la fraction de survivants en phase exponentielle est supérieure à celle obtenue en phase de latence. Reproduire l'expérience s'avère nécessaire, notamment parce que la souche 1493 croît difficilement dans le milieu de culture utilisé (voir annexes) et ce défaut de croissance pourrait expliquer un tel résultat.

Par ailleurs, seulement trois échantillons par culture ont été traités (à 0 ;3 et 24 heures) contre onze au chapitre 3 (à 0 ;1,5 ;3 ;4 ;5 ;6 ;7 ;8 ;9 ;10 et 24 heures). Cela allège sensiblement le protocole expérimental. Cependant, la calibration des modèles du chapitre 3 doit être adaptée pour utiliser ces données réduites.

5.2 Résultats préliminaires d'expériences en cours

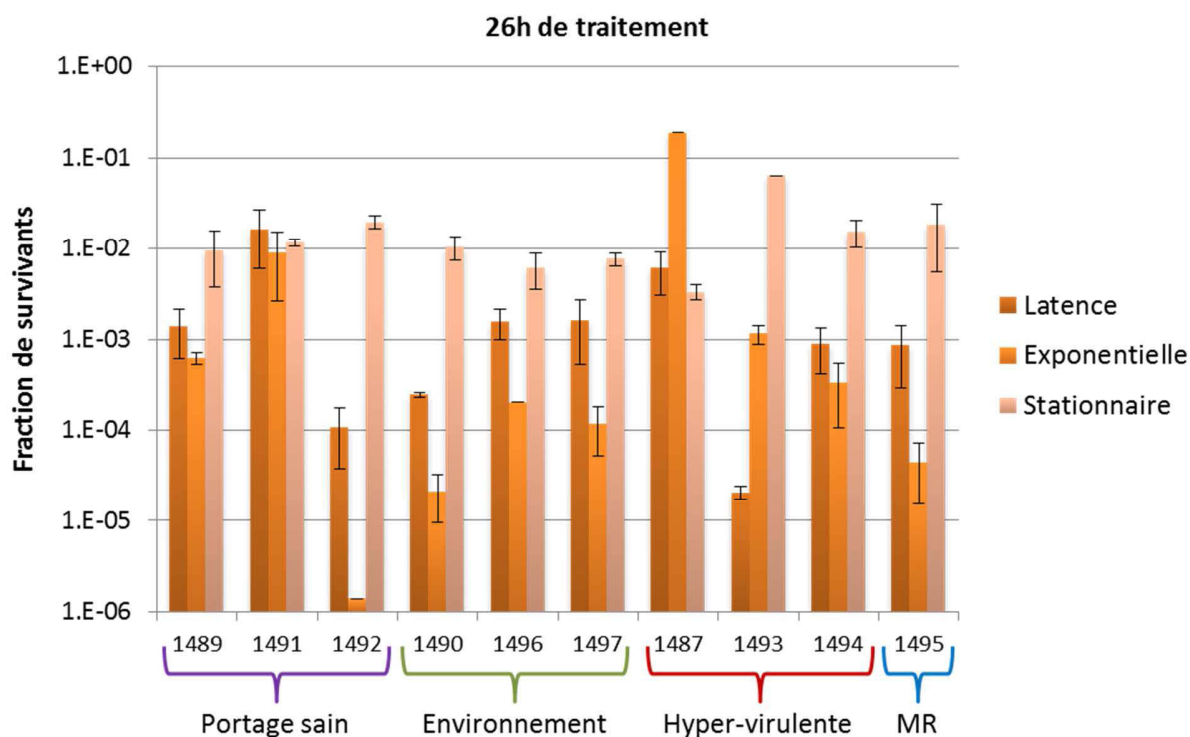


Figure 5.1 : Fraction de cellules survivantes après 26 heures de traitement antibiotique.

Les échantillons traités sont issus de cultures en phase de latence, exponentielle ou stationnaire. Les souches sont traitées à la ciprofloxacine à une concentration égale à 100 fois leur CMI. Les souches sont issues de porteurs sains, de l'environnement, ou ont été isolées en clinique et classées en hyper-virulentes ou multi-résistante (MR). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de deux mesures (sauf pour les échantillons 1487 exponentielle, 1493 stationnaire et 1496 exponentielle, une seule mesure).

5.3 Perspectives

5.3.1 Vers des mesures de la résilience aux antibiotiques en bactériologie clinique

La résilience et la résistance aux antibiotiques sont deux concepts liés, deux aspects de la réponse d'un système biologique aux traitements antibiotiques. La résilience aux antibiotiques, comprenant les mécanismes de tolérance et de persistance bactérienne, précède et favorise le développement de résistances (Levin-reisman *et al.*, 2017; Lewis and Shan, 2017). L'utilisation du concept de résilience en bactériologie clinique repose sur sa clarification mais aussi sur sa mise en pratique. Pour rendre le concept de résilience utilisable en bactériologie clinique, il faut relier la théorie à des expériences concrètes.

Prédire le comportement d'un isolat clinique par rapport à un antibiotique donné implique de déterminer la Concentration Minimal Inhibitrice (CMI) et à comparer cette concentration à des données préalablement établies à partir de panels de souches. La CMI est couramment utilisée et est la concentration minimale d'antibiotique suffisant à inhiber toute croissance visible de la souche bactérienne testée. D'autres mesures permettant de qualifier l'impact de l'antibiotique sur la souche bactérienne peuvent être déterminées comme la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), qui est la concentration capable d'éliminer $\geq 99.9\%$ des bactéries en environ 12 heures (Hall and Mah, 2017). Toutes ces mesures sont adaptées à des populations planctoniques. Pour les biofilms, une Concentration Minimale d'Eradication du Biofilm (MBEC) a été définie comme la concentration en antibiotique capable d'éradiquer un biofilm cultivé sur un support immergé (Hall and Mah, 2017). Cependant, il n'y a actuellement pas de mesure simple de la résilience aux antibiotiques, quelle que soit la forme bactérienne. Le développement d'un indicateur de la résilience permettrait d'enrichir la caractérisation du comportement des souches vis-à-vis des antibiotiques, en définissant notamment leur capacité à se régénérer à la suite d'un traitement.

La volonté de développer un tel indicateur rejoint les efforts de Brauner *et al.* (2016) qui proposent une démarche expérimentale simple pour distinguer les populations sensibles, résistantes, tolérantes et persistantes. Cette démarche est basée sur la mesure de la CMI et la mesure du Temps Minimal d'Eradication (MDK), qui est le temps nécessaire d'exposition à un antibiotique pour éradiquer une population bactérienne. Cependant, deux critiques peuvent être émises quant à cette proposition : la mesure peut être influencée par la phase de croissance des bactéries et le protocole ne donne pas d'indication sur l'efficacité avec

5.3 Perspectives

laquelle les populations traitées se régénèrent. Il est donc nécessaire de proposer un compromis fournissant des données à la fois simples et complètes sur la capacité d'une souche bactériennes à être résiliente à un traitement antibiotique.

5.3.2 Intégrer l'aspect évolutif des populations bactériennes dans des modèles individu-centrés

Nous avons vu au cours de cette thèse que l'hétérogénéité des populations bactériennes leur confère un avantage face aux traitements antibiotiques (Sánchez-Romero and Casadesús, 2014). L'hétérogénéité des taux de mutation (Alexander *et al.*, 2016) et des taux de croissance (Hashimoto *et al.*, 2016) confèrent aussi des avantages en terme de fitness. Cette hétérogénéité émerge de la capacité d'une population à varier, à générer de la diversité. Quand elle est composée de phénotypes adaptés à différents environnements, cette diversité constitue la base de la capacité des populations à évoluer (Kirschner, 2013).

La persistance bactérienne évolue en seulement quelques cycles de traitements et de régénérations (Fridman *et al.*, 2014). Quelle durée de validité ont alors les paramètres des modèles proposés au chapitre 3 ? Plusieurs modèles mathématiques ont été utilisés pour optimiser la fréquence des traitements antibiotiques dans le but d'éradiquer les persisters (Cogan *et al.*, 2013; Imran and Smith, 2014). Cependant, ces modèles émettent l'hypothèse que les paramètres des transitions entre cellules sensibles et persisters restent fixes au cours d'une série de traitements. Afin d'étudier l'évolution de ces transitions, il faut leur permettre de varier au cours même d'une simulation.

Les modèles individu-centrés (IC) sont appropriés pour représenter une telle variation individuelle des bactéries et donc l'évolution d'une population (Hellweger *et al.*, 2016). Des modèles IC évolutifs ont été utilisés pour étudier l'évolution des traits de populations microbiennes marines (Clark *et al.*, 2011, 2013), l'évolution de stratégies de réponse au stress en fonction de signaux environnementaux peu fiables (Arnoldini *et al.*, 2012) et la coévolution de phages et du système anti-phage CRISPR-Cas présent chez certaines bactéries (Iranzo *et al.*, 2013). Le passage d'un modèle IC classique à un modèle IC évolutif nécessite de changer certains paramètres en variables, tels que les transitions phénotypiques, le taux de croissance ou la sensibilité aux antibiotiques. Il est alors nécessaire d'implémenter un algorithme régissant les variations individuelles des cellules. Ce type de modèle pourrait représenter plus fidèlement l'hétérogénéité phénotypique et génétique des populations bactériennes et ouvrir de nouvelles perspectives quant à leur résilience.

6 Références bibliographiques

- Van Acker, H., Van Dijck, P., and Coenye, T. (2014) Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol.* **22**: 326–333.
- Adam, M., Murali, B., Glenn, N.O., and Potter, S.S. (2008) Epigenetic inheritance based evolution of antibiotic resistance in bacteria. *BMC Evol. Biol.* **8**: 52.
- Alexander, H.K., Mayer, S.I., and Bonhoeffer, S. (2016) Population heterogeneity in mutation rate increases the frequency of higher-order mutants and reduces long-term mutational load. *Mol. Biol. Evol.* **34**: 419–436.
- Allison, K.R., Brynildsen, M.P., and Collins, J.J. (2011) Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 593–598.
- Allison, K.R., Brynildsen, M.P., and Collins, J.J. (2011) Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* **473**: 216–220.
- Allison, S.D. and Martiny, J.B.H. (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 11512–11519.
- Alpkvist, E., Picioreanu, C., Van Loosdrecht, M.C.M., and Heyden, A. (2006) Three-Dimensional Biofilm Model With Individual Cells and Continuum EPS Matrix. *Wiley InterScience*.
- Amato, S.M. and Brynildsen, M.P. (2014) Nutrient transitions are a source of persisters in *Escherichia coli* biofilms. *PLoS One* **9**: e93110.
- Amato, S.M., Fazen, C.H., Henry, T.C., Mok, W.W.K., Orman, M. a, Sandvik, E.L., et al. (2014) The role of metabolism in bacterial persistence. *Front. Microbiol.* **5**: 70.
- Amato, S.M., Orman, M.A., and Brynildsen, M.P. (2013) Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* **50**: 475–87.
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., and Stewart, P.S. (2000) Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1818–1824.
- Arnoldini, M., Mostowy, R., Bonhoeffer, S., and Ackermann, M. (2012) Evolution of Stress Response in the Face of Unreliable Environmental Signals. *PLoS Comput. Biol.* **8**: e1002627.
- Ayati, B.P. and Klapper, I. (2012) Models of microbial dormancy in biofilms and planktonic

6 Références bibliographiques

- cultures. *Commun. Math. Sci.* **10**: 493–511.
- Ayrapetyan, M., Williams, T.C., and Oliver, J.D. (2014a) Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends Microbiol.* **23**: 7–13.
- Ayrapetyan, M., Williams, T.C., and Oliver, J.D. (2014b) Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 2478–2483.
- Baho, D.L., Peter, H., and Tranvik, L.J. (2012) Resistance and resilience of microbial communities - Temporal and spatial insurance against perturbations. *Environ. Microbiol.* **14**: 2283–2292.
- Balaban, N.Q. (2011) Persistence: Mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**: 768–775.
- Balaban, N.Q., Gerdes, K., Lewis, K., and McKinney, J.D. (2013) A problem of persistence: still more questions than answers? *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 587–591.
- Balaban, N.Q., Merrin, J., Chait, R., Kowalik, L., and Leibler, S. (2004) Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science* **305**: 1622–1625.
- Baquero, F., Tedim, A.P., and Coque, T.M. (2013) Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front. Microbiol.* **4**:
- Barraud, N., Buson, A., Jarolimek, W., and Rice, S. a. (2013) Mannitol enhances antibiotic sensitivity of persister bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One* **8**: 1–13.
- Barth, V.C., Rodrigues, B.A., Bonatto, G.D., Gallo, S.W., Pagnussatti, V.E., Ferreira, C.A.S., and De Oliveira, S.D. (2013) Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* **8**:
- Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011) The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**: 189–213.
- Beaumont, H.J.E., Gallie, J., Kost, C., Ferguson, G.C., and Rainey, P.B. (2009) Experimental evolution of bet hedging. *Nature* **462**: 90–93.
- van den Bergh, B., Fauvart, M., and Michiels, J. (2017) Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**: 219–251.
- Bernier, S.P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A.S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J.Y., et al. (2013) Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin. *PLoS Genet.* **9**:
- Blin, C., Passet, V., Touchon, M., Rocha, E.P.C., and Brisse, S. (2017) Metabolic diversity of

6 Références bibliographiques

- the emerging pathogenic lineages of *Klebsiella pneumoniae*. *Environ. Microbiol.* **19**: 1881–1898.
- Bobay, L.-M., Traverse, C.C., and Ochman, H. (2015) Impermanence of bacterial clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 8893–8900.
- Boles, B.R. and Singh, P.K. (2008) Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 12503–12508.
- Bonnet, R., Bru, J.-P., Caron, F., Cattoir, V., Chardon, H., Courvalin, P., et al. (2015) Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- Bos, J., Zhang, Q., Vyawahare, S., Rogers, E., Rosenberg, S.M., and Austin, R.H. (2015) Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 178–183.
- Botton, S., van Heusden, M., Parsons, J.R., Smidt, H., and van Straalen, N. (2006) Resilience of microbial systems towards disturbances. *Crit. Rev. Microbiol.* **32**: 101–112.
- Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H.J., and Coenye, T. (2011) Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 2655–2661.
- Brand, F.S. and Jax, K. (2007) Focusing the Meaning(s) of Resilience : Resilience as a Descriptive Concept and a Boundary Object. *Ecol. Soc.* **12**: 23.
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L., and Kolter, R. (2005) Biofilms: The matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**: 20–26.
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., and Balaban, N.Q. (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 320–330.
- Brias, A., Mathias, J.D., and Deffuant, G. (2016) Accelerating viability kernel computation with CUDA architecture: application to bycatch fishery management. *Comput. Manag. Sci.* **13**: 371–391.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., and Dubois-Brissonnet, F. (2011) Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* **27**: 1017–1032.
- Bridier, a., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.C., Naïtali, M., and Briandet, R. (2014) Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.* **45**: 167–178.
- Burmølle, M., Webb, J.S., Rao, D., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., and Kjelleberg, S. (2006) Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3916–23.

6 Références bibliographiques

- Carpenter, S., Walker, B., Anderies, J.M., and Abel, N. (2001) From Metaphor to measurement: Resilience of What to What? *Ecosystems* **4**: 765–781.
- Carvalho, G., Guilhen, C., Balestrino, D., Forestier, C., and Mathias, J.-D. (2017) Relating switching rates between normal and persister cells to substrate and antibiotic concentrations: a mathematical modeling approach supported by experiments. *Microb. Biotechnol.* **0**: 1–12.
- Chambless, J.D., Hunt, S.M., and Stewart, P.S. (2006) A Three-Dimensional Computer Model of Four Hypothetical Mechanisms Protecting Biofilms from Antimicrobials. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2005–2013.
- Chambless, J.D. and Stewart, P.S. (2007) A three-dimensional computer model analysis of three hypothetical biofilm detachment mechanisms. *Biotechnol. Bioeng.* **97**: 1573–1584.
- Chihara, K., Matsumoto, S., Kagawa, Y., and Tsuneda, S. (2015) Mathematical modeling of dormant cell formation in growing biofilm. *Front. Microbiol.* **6**: 1–8.
- Choi, K.-H. and Schweizer, H.P. (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc.* **1**: 153–161.
- Christensen, S.K. and Gerdes, K. (2003) RelE toxins from Bacteria and Archaea cleave mRNAs on translating ribosomes, which are rescued by tmRNA. *Mol. Microbiol.* **48**: 1389–1400.
- Claessen, D., Rozen, D.E., Kuipers, O.P., Søggaard-Andersen, L., and van Wezel, G.P. (2014) Bacterial solutions to multicellularity: a tale of biofilms, filaments and fruiting bodies. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**: 115–24.
- Clark, J.R., Daines, S.J., Lenton, T.M., Watson, A.J., and Williams, H.T.P. (2011) Individual-based modelling of adaptation in marine microbial populations using genetically defined physiological parameters. *Ecol. Modell.* **222**: 3823–3837.
- Clark, J.R., Lenton, T.M., Williams, H.T.P., and Daines, S.J. (2013) Environmental selection and resource allocation determine spatial patterns in picophytoplankton cell size. *Limnol. Oceanogr.* **58**: 1008–1022.
- Cogan, N.G. (2006) Effects of persister formation on bacterial response to dosing. *J. Theor. Biol.* **238**: 694–703.
- Cogan, N.G., Brown, J., Darres, K., and Petty, K. (2012) Optimal control strategies for disinfection of bacterial populations with persister and susceptible dynamics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 4816–4826.
- Cogan, N.G., Szomolay, B., and Dindos, M. (2013) Effect of periodic disinfection on persisters in a one-dimensional biofilm model. *Bull. Math. Biol.* **75**: 94–123.

6 Références bibliographiques

- Cohen, N.R., Lobritz, M.A., and Collins, J.J. (2013) Microbial Persistence and the Road to Drug Resistance. *Cell Host Microbe* **13**: 632–642.
- Conlon, B.P., Nakayasu, E.S., Fleck, L.E., LaFleur, M.D., Isabella, V.M., Coleman, K., et al. (2013) Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* **503**: 365–70.
- Crombach, A. and Hogeweg, P. (2008) Evolution of evolvability in gene regulatory networks. *PLoS Comput. Biol.* **4**: e1000112.
- Crusz, S.A., Popat, R., Rybtke, M.T., Cámara, M., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., et al. (2012) Bursting the bubble on bacterial biofilms: a flow cell methodology. *Biofouling* **28**: 835–842.
- Darmon, E. and Leach, D.R.F. (2014) Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **78**: 1–39.
- Das, T., Sehar, S., and Manefield, M. (2013) The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environ. Microbiol. Rep.* **5**: 778–86.
- Davidson, C.J. and Surette, M.G. (2008) Individuality in Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 253–68.
- Davies, J. and Davies, D. (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **74**: 417–433.
- Deffuant, G. and Gilbert, N. (2011) Viability and Resilience of Complex Systems Springer: Deffuant,G. and Gilbert,N. (eds) Springer.
- Dethlefsen, L. and Relman, D. a (2011) Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl**: 4554–4561.
- Dörr, T., Lewis, K., and Vulic, M. (2009) SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **5**:
- Dörr, T., Vulić, M., and Lewis, K. (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* **8**: 29–35.
- Emerenini, B.O., Hense, B.A., Kuttler, C., and Eberl, H.J. (2015) A mathematical model of quorum sensing induced biofilm detachment. *PLoS One* **10**: 1–25.
- Esser, D.S., Leveau, J.H.J., and Meyer, K.M. (2015) Modeling microbial growth and dynamics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**: 8831–8846.
- Fagerlind, M.G., Webb, J.S., Barraud, N., McDougald, D., Jansson, A., Nilsson, P., et al. (2012) Dynamic modelling of cell death during biofilm development. *J. Theor. Biol.* **295**: 23–

6 Références bibliographiques

36.

- Fasani, R. and Savageau, M. (2013) Molecular mechanisms of multiple toxin-antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: E2528–E2537.
- Feng, J., Kessler, D.A., Ben-jacob, E., and Levine, H. (2013) Growth feedback as a basis for persister bistability. *PNAS* **111**: 544–549.
- Ferenci, T. and Maharjan, R. (2015) Mutational heterogeneity: A key ingredient of bet-hedging and evolutionary divergence? *BioEssays* **37**: 123–130.
- Fernandez, L., Mercader, J.M., Planas-fèlix, M., and Torrents, D. (2014) Adaptation to environmental factors shapes the organization of regulatory regions in microbial communities. *BMC Genomics* **15**: 877.
- Ferrer, J., Prats, C., and López, D. (2008) Individual-based modelling: An essential tool for microbiology. *J. Biol. Phys.* **34**: 19–37.
- Fisher, R.A., Gollan, B., and Helaine, S. (2017) Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat. Rev. Microbiol.*
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S.A., and Kjelleberg, S. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 563–575.
- Flood, S. and Schechtman, J. (2014) The rise of resilience: Evolution of a new concept in coastal planning in Ireland and the US. *Ocean Coast. Manag.* **102**: 19–31.
- Folke, C. (2006) Resilience: The emergence of a perspective for social-ecological systems analyses. *Glob. Environ. Chang.* **16**: 253–267.
- Folke, C., Carpenter, S.R., Walker, B., Scheffer, M., Chapin, T., and Rockström, J. (2010) Resilience Thinking: Integrating Resilience, Adaptability and Transformability. *Ecol. Soc.* **15**: 20.
- Fridman, O., Goldberg, A., Ronin, I., Shores, N., and Balaban, N.Q. (2014) Optimization of lag time underlies antibiotic tolerance in evolved bacterial populations. *Nature* **513**: 418–421.
- Galhardo, R.S., Hastings, P.J., and Rosenberg, S.M. (2007) Mutation as a Stress Response and the Regulation of Evolvability. *Crit rev Biochem Mol Biol.* **42**: 399–435.
- Gallopín, G.C. (2006) Linkages between vulnerability, resilience, and adaptive capacity. *Glob. Environ. Chang.* **16**: 293–303.
- Gefen, O. and Balaban, N.Q. (2009) The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 704–717.

6 Références bibliographiques

- Gelens, L., Hill, L., Vandervelde, A., Danckaert, J., and Loris, R. (2013) A general model for toxin-antitoxin module dynamics can explain persister cell formation in *E. coli*. *PLoS Comput. Biol.* **9**: e1003190.
- Gerhart, J. and Kirschner, M. (2007) The theory of facilitated variation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 8582–8589.
- Gestel, J.V. a N., Vlamakis, H., and Kolter, R. (2015) Division of Labor in Biofilms : the Ecology of Cell Differentiation. *Microbiol. Spectr.* **3**: 1–24.
- Ghanbari, A., Dehghany, J., Schwebs, T., Müsken, M., Häussler, S., and Meyer-Hermann, M. (2016) Inoculation density and nutrient level determine the formation of mushroom-shaped structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci. Rep.* **6**: 1–12.
- Ghosh, P., Ben-Jacob, E., and Levine, H. (2013) Modeling cell-death patterning during biofilm formation. *Phys. Biol.* **10**: 66006.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., and Glover, L. a. (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ. Microbiol.* **7**: 301–313.
- Gorochoowski, T.E. (2016) Agent-based modelling in synthetic biology. *Essays Biochem.* **60**: 325–336.
- Griffiths, B.S. and Philippot, L. (2013) Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 112–129.
- Grimbergen, A.J., Siebring, J., Solopova, A., and Kuipers, O.P. (2015) Microbial bet-hedging: the power of being different. *Curr. Opin. Microbiol.* **25**: 67–72.
- Grimm, V. and Wissel, C. (1997) Babel, or the ecological stability discussions: An inventory and analysis of terminology and a guide for avoiding confusion. *Oecologia* **109**: 323–334.
- Guilhen, C., Iltis, A., Forestier, C., and Balestrino, D. (2015) Genome Sequence of a Clinical *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 6 Strain. *Genome Announc.* **3**:
- Hall, A.M., Gollan, B., and Helaine, S. (2017) Toxin–antitoxin systems, reversible toxicity. *Curr. Opin. Microbiol.* **36**: 102–110.
- Hall, C.W. and Mah, T.-F. (2017) Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**: 276–301.
- Hansen, M.C., Palmer, R.J., Udsen, C., White, D.C., Molin, S., Palmer Jr, R.J., et al. (2001) Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. *Microbiology* **147**: 1383–1391.
- Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2016) Mechanisms of bacterial persistence

6 Références bibliographiques

- during stress and antibiotic exposure. *Science (80-.)*. **354**: aaf4268.
- Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2016) Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science (80-.)*. **354**: aaf4268.
- Hashimoto, M., Nozoe, T., Nakaoka, H., Okura, R., Akiyoshi, S., Kaneko, K., et al. (2016) Noise-driven growth rate gain in clonal cellular populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 3251–3256.
- Hauryliuk, V., Atkinson, G.C., Murakami, K.S., Tenson, T., and Gerdes, K. (2015) Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 298–309.
- Helaine, S. and Kugelberg, E. (2014) Bacterial persisters: Formation, eradication, and experimental systems. *Trends Microbiol.* **22**: 417–424.
- Hellweger, F.L., Clegg, R.J., Clark, J.R., Plugge, C.M., and Kreft, J.-U. (2016) Advancing microbial science by agent-based modelling. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 461–471.
- Hermesen, R., Deris, J.B., and Hwa, T. (2012) On the rapidity of antibiotic resistance evolution facilitated by a concentration gradient. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 10775–80.
- Hershkovitz, Y. and Gasith, A. (2013) Resistance, resilience, and community dynamics in mediterranean-climate streams. *Hydrobiologia* **719**: 59–75.
- Heydorn, A., Nielsen, a. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B.K., and Molin, S. (2000) Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**: 2395–2407.
- Holling, C.S. (1996) Engineering resilience versus ecological resilience. In, Schulze, P.C. (ed), *Engineering within ecological constraints*. National Academy Press, Washington D.C., pp. 31–44.
- Holling, C.S. (1973) Resilience and Stability of Ecological Systems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **4**: 1–23.
- Hosseini, S., Barker, K., and Ramirez-Marquez, J.E. (2016) A review of definitions and measures of system resilience. *Reliab. Eng. Syst. Saf.* **145**: 47–61.
- Hunt, D.E. and Ward, C.S. (2015) A network-based approach to disturbance transmission through microbial interactions. *Front. Microbiol.* **6**: 1–8.
- Imran, M. and Smith, H.L. (2014) A model of optimal dosing of antibiotic treatment in biofilm. *Math. Biosci. Eng.* **11**: 547–71.
- Iranzo, J., Lobkovsky, A.E., Wolf, Y.I., and Koonin, E. V. (2013) Evolutionary dynamics of the prokaryotic adaptive immunity system CRISPR-Cas in an explicit ecological context. *J.*

6 Références bibliographiques

- Bacteriol.* **195**: 3834–3844.
- Javid, B., Sorrentino, F., Toosky, M., Zheng, W., Pinkham, J.T., Jain, N., et al. (2014) Mycobacterial mistranslation is necessary and sufficient for rifampicin phenotypic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 1132–7.
- Jøers, A., Kaldalu, N., and Tenson, T. (2010) The frequency of persisters in *Escherichia coli* reflects the kinetics of awakening from dormancy. *J. Bacteriol.* **192**: 3379–3384.
- Jolivet-Gougeon, A. and Bonnaure-Mallet, M. (2014) Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov. today Technol.* **11**: 49–56.
- Jørgensen, P.S., Wernli, D., Carroll, S.P., Dunn, R.R., Harbarth, S., Levin, S.A., et al. (2016) Use antimicrobials wisely. *Nature* **537**: 159–61.
- Kahiluoto, H., Kaseva, J., Hakala, K., Himanen, S.J., Jauhiainen, L., Rötter, R.P., et al. (2014) Cultivating resilience by empirically revealing response diversity. *Glob. Environ. Chang.* **25**: 186–193.
- Kaldalu, N., Hauryliuk, V., and Tenson, T. (2016) Persisters—as elusive as ever. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 6545–6553.
- Kaplan, J.B., Izano, E.A., Gopal, P., Levels, L., Antibiotics, L., Extracellular, I., et al. (2012) Low Levels of β -Lactam Antibiotics Induce Extracellular DNA Release and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*.
- Keren, I., Kaldalu, N., Spoering, A., Wang, Y., and Lewis, K. (2004) Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.* **230**: 13–18.
- Kint, C.I., Verstraeten, N., Fauvart, M., and Michiels, J. (2012) New-found fundamentals of bacterial persistence. *Trends Microbiol.* **20**: 577–85.
- Kirschner, M. (2013) Beyond Darwin: evolvability and the generation of novelty. *BMC Biol.* **11**: 110.
- Kitano, H. (2007) Towards a theory of biological robustness. *Mol. Syst. Biol.* **3**: 137.
- Klima, J. and Psenner, R. (1998) Determination of Bacterial Cell Dry Mass by Transmission Electron Microscopy and Densitometric Image Analysis Determination of Bacterial Cell Dry Mass by Transmission Electron Microscopy and Densitometric Image Analysis. **64**: 688–694.
- Kone, C.T., De Sousa, G., and Mathias, J.-D. (2017) Adaptive management of energy consumption, reliability and delay of wireless sensor node: application to ieee 802.15.4 wireless sensor node. *PLoS One* **In press**:
- Kong, E.F., Tsui, C., Kucharíková, S., and Andes, D. (2016) Commensal Protection of *Staphylococcus aureus* against Antimicrobials by *Candida albicans* Biofilm Matrix.

6 Références bibliographiques

MBio **7**: 1–12.

- König, S., Worrlich, A., Centler, F., Wick, L.Y., Miltner, A., Astner, M.K., et al. (2016) Modelling functional resilience of microbial ecosystems: analysis of governing processes. *Environ. Model. Softw.* **89**: 31–39.
- Konopka, A., Lindemann, S., and Fredrickson, J. (2015) Dynamics in microbial communities: unraveling mechanisms to identify principles. *ISME J.* **9**: 1488–1495.
- Kreft, J.U., Booth, G., and Wimpenny, J.W.T. (1998) BacSim, a simulator for individual-based modelling of bacterial colony growth. *Microbiology* **144**: 3275–3287.
- Kreft, J.U., Picioreanu, C., Wimpenny, J.W.T., and Van Loosdrecht, M.C.M. (2001) Individual-based modelling of biofilms. *Microbiology* **147**: 2897–2912.
- Lardon, L. a., Merkey, B. V., Martins, S., Dötsch, A., Picioreanu, C., Kreft, J.U., and Smets, B.F. (2011) iDynoMiCS: Next-generation individual-based modelling of biofilms. *Environ. Microbiol.* **13**: 2416–2434.
- Laspidou, C.S., Kungolos, A., and Samaras, P. (2010) Cellular-automata and individual-based approaches for the modeling of biofilm structures: Pros and cons. *Desalination* **250**: 390–394.
- Laspidou, C.S., Liakopoulos, A., and Spiliotopoulos, M.G. (2012) A 2D cellular automaton biofilm detachment algorithm. *Lect. Notes Comput. Sci.* **7495**: 415–424.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., et al. (2013) Antibiotic resistance—the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* **13**: 1057–1098.
- Lechner, S., Patra, P., Klumpp, S., and Bertram, R. (2012) Interplay between Population Dynamics and Drug Tolerance of *Staphylococcus aureus* Persister Cells. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 381–391.
- Lee, K.W.K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., and Rice, S. a (2014) Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J.* **8**: 894–907.
- Leslie, P. and McCabe, J.T. (2013) Response Diversity and Resilience in Social-Ecological Systems. *Curr. Anthropol.* **54**: 114–143.
- Levin-reisman, I., Ronin, I., Gefen, O., Braniss, I., Shoresh, N., and Balaban, N.Q. (2017) Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science (80-.).* **355**: 826–830.
- Levin, B.R. and Udekwu, K.I. (2010) Population Dynamics of Antibiotic Treatment: a Mathematical Model and Hypotheses for Time-Kill and Continuous-Culture Experiments. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**: 3414–3426.

6 Références bibliographiques

- Levy, S.B. and Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* **10**: S122–S129.
- Lewis, K. and Shan, Y. (2017) Why tolerance invites resistance. *Science (80-.)*. **355**: 796–796.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., and Faucher, S.P. (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* **5**: 258.
- Lozupone, C. a., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., and Knight, R. (2012) Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **489**: 220–230.
- Lv, C., Li, X., Li, F., and Li, T. (2014) Constructing the energy landscape for genetic switching system driven by intrinsic noise. *PLoS One* **9**: e88167.
- Mabrouk, N., Deffuant, G., Tolker-Nielsen, T., and Lobry, C. (2010) Bacteria can form interconnected microcolonies when a self-excreted product reduces their surface motility: evidence from individual-based model simulations. *Theory Biosci.* **129**: 1–13.
- Marques, C.N.H., Salisbury, V.C., Greenman, J., Bowker, K.E., and Nelson, S.M. (2005) Discrepancy between viable counts and light output as viability measurements, following ciprofloxacin challenge of self-bioluminescent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**: 665–671.
- Martin, S. (2004) The cost of restoration as a way of defining resilience: A viability approach applied to a model of lake eutrophication. *Ecol. Soc.* **9**: 8.
- Martin, S., Deffuant, G., and Calabrese, J.M. (2011) Defining resilience mathematically: From attractors to viability. In, *Viability and resilience of complex systems*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 15–36.
- Martinez, J.L. (2009) Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* **157**: 2893–2902.
- Martins, A., Hunyadi, A., and Amaral, L. (2013) Mechanisms of resistance in bacteria: an evolutionary approach. *Open Microbiol. J.* **7**: 53–8.
- Mathias, J.-D., Anderies, J.M., and Janssen, M.A. (2017) On our rapidly shrinking capacity to comply with the planetary boundaries on climate change. *Sci. Rep.* **7**..
- Mathias, J.-D., Bonté, B., Cordonnier, T., and de Morogues, F. (2015) Using the Viability Theory to Assess the Flexibility of Forest Managers Under Ecological Intensification. *Environ. Manage.* **56**: 1170–1183.
- Mathias, J.-D., Lade, S., and Galaz, V. (2017) Multi-level policies and adaptive social networks - a conceptual modeling study for maintaining a polycentric governance. *Int. J. Commons* **In press**:

6 Références bibliographiques

- Mathieu, A., Fleurier, S., Frénoy, A., Dairou, J., Bredeche, M.-F., Sanchez-Vizueté, P., et al. (2016) Discovery and Function of a General Core Hormetic Stress Response in *E. coli* Induced by Sublethal Concentrations of Antibiotics. *Cell Rep.* **17**: 46–57.
- Meola, M., Lazzaro, A., and Zeyer, J. (2014) Diversity, resistance and resilience of the bacterial communities at two alpine glacier forefields after a reciprocal soil transplantation. *Environ. Microbiol.* **16**: 1918–1934.
- Michiels, J.E., Van den Bergh, B., Verstraeten, N., and Michiels, J. (2016) Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resist. Updat.* **29**: 76–89.
- Mitri, S., Xavier, J.B., and Foster, K.R. (2011) Social evolution in multispecies biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl**: 10839–10846.
- Möker, N., Dean, C.R., and Tao, J. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J. Bacteriol.* **192**: 1946–1955.
- Monds, R.D. and O'Toole, G. a. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* **17**: 73–87.
- Mulyukin, A.L., Kozlova, A.N., Sorokin, V. V., Suzina, N.E., Cherdyntseva, T.A., Kotova, I.B., et al. (2015) Surviving forms in antibiotic-treated *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **84**: 751–763.
- Nadell, C.D. and Bassler, B.L. (2011) A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 14181–14185.
- Nadell, C.D., Bucci, V., Drescher, K., Levin, S. a, Bassler, B.L., and Xavier, J.B. (2013) Cutting through the complexity of cell collectives. *Proc. Biol. Sci.* **280**: 20122770.
- Nadell, C.D., Foster, K.R., and Xavier, J.B. (2010) Emergence of spatial structure in cell groups and the evolution of cooperation. *PLoS Comput. Biol.* **6**: e1000716.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B., Levin, S. a., and Foster, K.R. (2008) The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. *PLoS Biol.* **6**: 0171–0179.
- Nichol, D., Robertson-Tessi, M., Jeavons, P., and Anderson, A.R.A. (2016) Stochasticity in the Genotype-Phenotype Map: Implications for the Robustness and Persistence of Bet-Hedging. *Genetics* **204**: 1523–1539.
- Olsen, I. (2015) Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**: 877–886.
- Orman, M. a and Brynildsen, M.P. (2013) Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**: 3230–9.

6 Références bibliographiques

- Parter, M., Kashtan, N., and Alon, U. (2007) Environmental variability and modularity of bacterial metabolic networks. *BMC Evol. Biol.* **7**: 169.
- Parthuisot, N., Catala, P., Lemarchand, K., Baudart, J., and Lebaron, P. (2000) Evaluation of ChemChrome V6 for bacterial viability assessment in waters. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 370–380.
- Penesyán, A., Gillings, M., and Paulsen, I.T. (2015) Antibiotic Discovery: Combatting Bacterial Resistance in Cells and in Biofilm Communities. *Molecules* **20**: 5286–5298.
- Piciooreanu, C., Kreft, J., Van, M.C.M., Piciooreanu, C., Kreft, J., and Loosdrecht, M.C.M. Van (2004) Particle-Based Multidimensional Multispecies Biofilm Model. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3024–3040.
- Piciooreanu, C., Van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (1999) Discrete-differential modelling of biofilm structure. *Water Sci. Technol.* **39**: 115–122.
- Podlesek, Z., Butala, M., Šakanović, A., and Žgur-Bertok, D. (2016) Antibiotic induced bacterial lysis provides a reservoir of persisters. *Antonie Van Leeuwenhoek* **109**: 523–528.
- Poole, K. (2012) Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**: 2069–2089.
- Radzikowski, J.L., Vedelaar, S., Siegel, D., Ortega, A.D., Schmidt, A., and Heinemann, M. (2016) Bacterial persistence is an active σ S stress response to metabolic flux limitation. *Mol. Syst. Biol.* **12**:
- Rainey, P.B., Rainey, P.B., Travisano, M., and Travisano, M. (1998) Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**: 69–72.
- Richard, M. and Yvert, G. (2014) How does evolution tune biological noise ? *Front. Genet.* **5**: 374.
- Rittershaus, E.S.C., Baek, S.-H., and Sassetti, C.M. (2013) The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. *Cell Host Microbe* **13**: 643–51.
- Robert, L., Hoffmann, M., Krell, N., Aymerich, S., Robert, J., and Doumic, M. (2014) Division in *Escherichia coli* is triggered by a size-sensing rather than a timing mechanism. *BMC Biol.* **12**: 17.
- Roberts, M.E. and Stewart, P.S. (2005) Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells. *Microbiology* **151**: 75–80.
- Römling, U. and Balsalobre, C. (2012) Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J. Intern. Med.* **272**: 541–61.
- Rosenberg, S.M., Shee, C., Frisch, R.L., and Hastings, P.J. (2012) Stress-induced mutation via

6 Références bibliographiques

- DNA breaks in *Escherichia coli*: A molecular mechanism with implications for evolution and medicine. *BioEssays* **34**: 885–892.
- Rougé, C., Mathias, J.-D., and Deffuant, G. (2013) Extending the viability theory framework of resilience to uncertain dynamics, and application to lake eutrophication. *Ecol. Indic.* **29**: 420–433.
- Rougé, C., Mathias, J.-D., and Deffuant, G. (2014) Relevance of control theory to design and maintenance problems in time-variant reliability: The case of stochastic viability. *Reliab. Eng. Syst. Saf.* **132**: 250–260.
- Rougé, C., Mathias, J.-D., and Deffuant, G. (2015) Vulnerability: from the conceptual to the operational using a dynamical system perspective. *Environ. Model. Softw.* **73**: 218–230.
- Ryall, B., Eydallin, G., and Ferenci, T. (2012) Culture History and Population Heterogeneity as Determinants of Bacterial Adaptation : the Adaptomics of a Single Environmental Transition. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 597–625.
- Sánchez-Romero, M.A. and Casadesús, J. (2014) Contribution of phenotypic heterogeneity to adaptive antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 355–60.
- Sandoval-Motta, S. and Aldana, M. (2016) Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **8**: 253–267.
- Shade, A. and Gilbert, J. a (2015) Temporal patterns of rarity provide a more complete view of microbial diversity. *Trends Microbiol.* **23**: 335–340.
- Shade, A., Jones, S.E., Caporaso, J.G., Handelsman, J., Knight, R., Fierer, N., and Gilbert, J. a (2014) Conditionally rare taxa disproportionately contribute to temporal changes in microbial diversity. *MBio* **5**: e01371-14.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L., Berga, M., Bürgmann, H., et al. (2012) Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front. Microbiol.* **3**: 417.
- Shade, A., Read, J.S., Youngblut, N.D., Fierer, N., Knight, R., Kratz, T.K., et al. (2012) Lake microbial communities are resilient after a whole-ecosystem disturbance. *ISME J.* **6**: 2153–2167.
- Skoneczny, S. (2015) Cellular automata-based modelling and simulation of biofilm structure on multi-core computers. *Water Sci. Technol.* **72**: 2071–2081.
- Smith, W.P.J., Davit, Y., Osborne, J.M., Kim, W., Foster, K.R., and Pitt-Francis, J.M. (2017) Cell morphology drives spatial patterning in microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: E280–E286.
- Song, H.S., Renslow, R.S., Fredrickson, J.K., and Lindemann, S.R. (2015) Integrating

6 Références bibliographiques

- ecological and engineering concepts of resilience in microbial communities. *Front. Microbiol.* **6**: 1–7.
- Suhaimi, H., Wang, S., and Das, D.B. (2015) Glucose diffusivity in cell culture medium. *Chem. Eng. J.* **269**: 323–327.
- Sultana, S.T., Call, D.R., Beyenal, H., Flemming, H.-C., Wingender, J., Stewart, P., et al. (2016) Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and persister cells using an electrochemical scaffold and enhanced antibiotic susceptibility. *npj Biofilms Microbiomes* **2**..
- Szekely, T. and Burrage, K. (2014) Stochastic simulation in systems biology. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **12**: 14–25.
- Szomolay, B. and Cogan, N.G. (2015) Modelling mechanical and chemical treatment of biofilms with two phenotypic resistance mechanisms. *Environ. Microbiol.* **17**: 1870–1883.
- Takano, S., Pawlowska, B.J., Gudelj, I., Yomo, T., and Tsuru, S. (2017) Density-Dependent Recycling Promotes the Long-Term Survival of Bacterial Populations during Periods of Starvation. *MBio* **8**: e02336-16.
- Teng, Z., Gao, R., Rehim, M., and Wang, K. (2009) Global behaviors of Monod type chemostat model with nutrient recycling and impulsive input. *J. Math. Chem.* **47**: 276–294.
- Todman, L.C., Fraser, F.C., Corstanje, R., Deeks, L.K., Harris, J.A., Pawlett, M., et al. (2016) Defining and quantifying the resilience of responses to disturbance: a conceptual and modelling approach from soil science. *Nat. Publ. Gr.* **6**: 1–12.
- Tsimring, L.S. (2014) Noise in biology. *Rep. Prog. Phys.* **77**: 26601.
- Vedyaykin, A.D., Sabantsev, A.V., Vishnyakov, I.E., Morozova, N.E., and Khodorkovskii, M.A. (2017) Recovery of division process in bacterial cells after induction of SulA protein which is responsible for cytokinesis arrest during SOS-response. *Cell tissue biol.* **11**: 89–94.
- Vega, N.M. and Gore, J. (2014) Collective antibiotic resistance: mechanisms and implications. *Curr. Opin. Microbiol.* **21**: 28–34.
- Vuotto, C., Longo, F., Balice, M.P., Donelli, G., and Varaldo, P.E. (2014) Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens* **3**: 743–58.
- Wakamoto, Y., Dhar, N., Chait, R., Schneider, K., Signorino-Gelo, F., Leibler, S., and McKinney, J.D. (2013) Dynamic Persistence of Antibiotic-Stressed Mycobacteria. *Science (80-.)*. **339**: 91–96.
- Walker, B., Holling, C.S., Carpenter, S.R., and Kinzig, A. (2004) Resilience, adaptability and

6 Références bibliographiques

- transformability in social-ecological systems. *Ecol. Soc.* **9**: 5.
- Wang, W., Chen, J., Chen, G., Du, X., Cui, P., Wu, J., et al. (2015) Transposon mutagenesis identifies novel genes associated with *Staphylococcus aureus* persister formation. *Front. Microbiol.* **6**..
- Wang, X., Kang, Y., Luo, C., Zhao, T., Liu, L., Jiang, X., et al. (2014) Heteroresistance at the single-cell level: Adapting to antibiotic stress through a population-based strategy and growth-controlled interphenotypic coordination. *MBio* **5**: e00942-13.
- Wang, X. and Wood, T.B. (2011) Toxin-antitoxin systems influence biofilm and persister cell formation and the general stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 5577–5583.
- Wood, T.K. (2016a) Combatting bacterial persister cells. *Biotechnol. Bioeng.* **113**: 476–483.
- Wood, T.K. (2016b) Combatting bacterial persister cells. *Biotechnol. Bioeng.* **113**: 476–483.
- Wu, N., He, L., Cui, P., Wang, W., Yuan, Y., Liu, S., et al. (2015) Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Front. Microbiol.* **6**..
- Xavier, J.B., Picioreanu, C., and Van Loosdrecht, M.C.M. (2005) A framework for multidimensional modelling of activity and structure of multispecies biofilms. *Environ. Microbiol.* **7**: 1085–1103.
- Yang, S., Hay, I.D., Cameron, D.R., Speir, M., Cui, B., Su, F., et al. (2015) Antibiotic regimen based on population analysis of residing persister cells eradicates *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Sci. Rep.* **5**: 18578.
- Zhang, Q., Lambert, G., Liao, D., Kim, H., Robin, K., Tung, C., et al. (2011) Acceleration of Emergence of Bacterial Antibiotic Resistance in Connected Microenvironments. *Science (80-.)*. **333**: 1764–1767.
- Zhang, Y. (2014) Persisters, persistent infections and the Yin–Yang model. *Emerg. Microbes Infect.* **3**: e3.
- Zhao, J., Seeluangsawat, P., and Wang, Q. (2016) Modeling antimicrobial tolerance and treatment of heterogeneous biofilms. *Math. Biosci.* **282**: 1–15.
- Zhurina, M. V., Gannesen, A. V., Zdorovenko, E.L., and Plakunov, V.K. (2014) Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms. *Microbiology* **83**: 713–722.
- Zrelli, K., Galy, O., Latour-Lambert, P., Kirwan, L., Ghigo, J.M., Beloin, C., and Henry, N. (2013) Bacterial biofilm mechanical properties persist upon antibiotic treatment and survive cell death. *New J. Phys.* **15**: 125026.

6 Références bibliographiques

Zucca, F. (2014) Persistent and susceptible bacteria with individual deaths. *J. Theor. Biol.* **343**: 69–78.

7 Annexes

7.1 Informations supplémentaires du chapitre 3

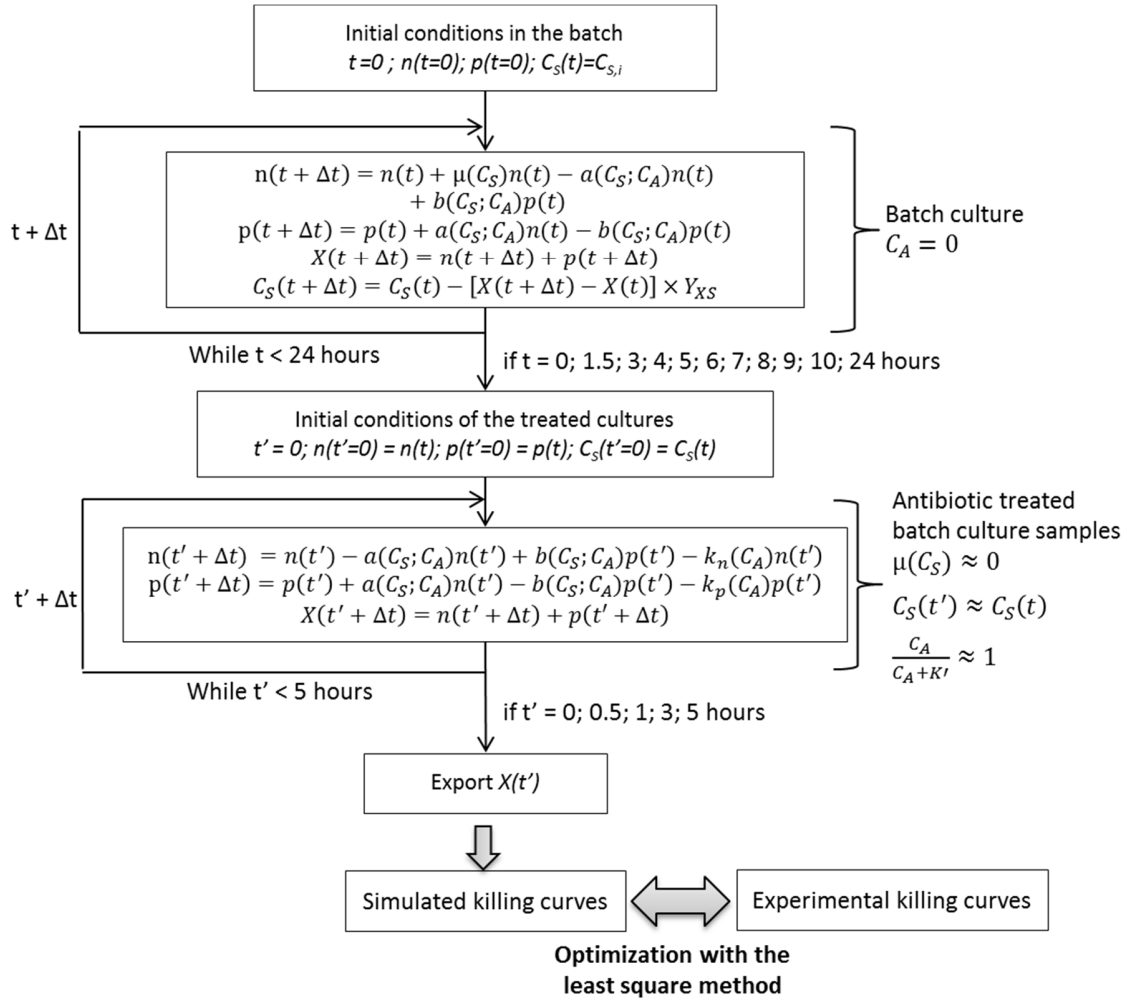


Figure 7.1 : Optimization procedure of the switching model parameters.

Simulations were discretized in time. Substrate concentration, biomass and switching rates were updated at each time step ($\Delta t = 0.001$ hour). t is the culture time of the batch and t' is the treatment time of the antibiotic-treated samples. $n(t=0)$ and $p(t=0)$ are initialized with the experimental measurements. Simulations of antibiotic treatments were initialized with the variables of the simulated batch cultures at the time of the samplings. We assume $C_A/(C_A + K') = 1$ and $dC_S/dt = 0$ during antibiotic treatments. Simulations exported sets of simulated killing curves directly comparable to the experimental ones. The parameters were optimized to obtain the best match between simulated and experimental killing curves, i.e. the smallest χ^2 possible. All parameters of the switching model selected and k_n and k_p were optimized together. 1000 optimizations with random initial conditions were tested for each model.

7 Annexes

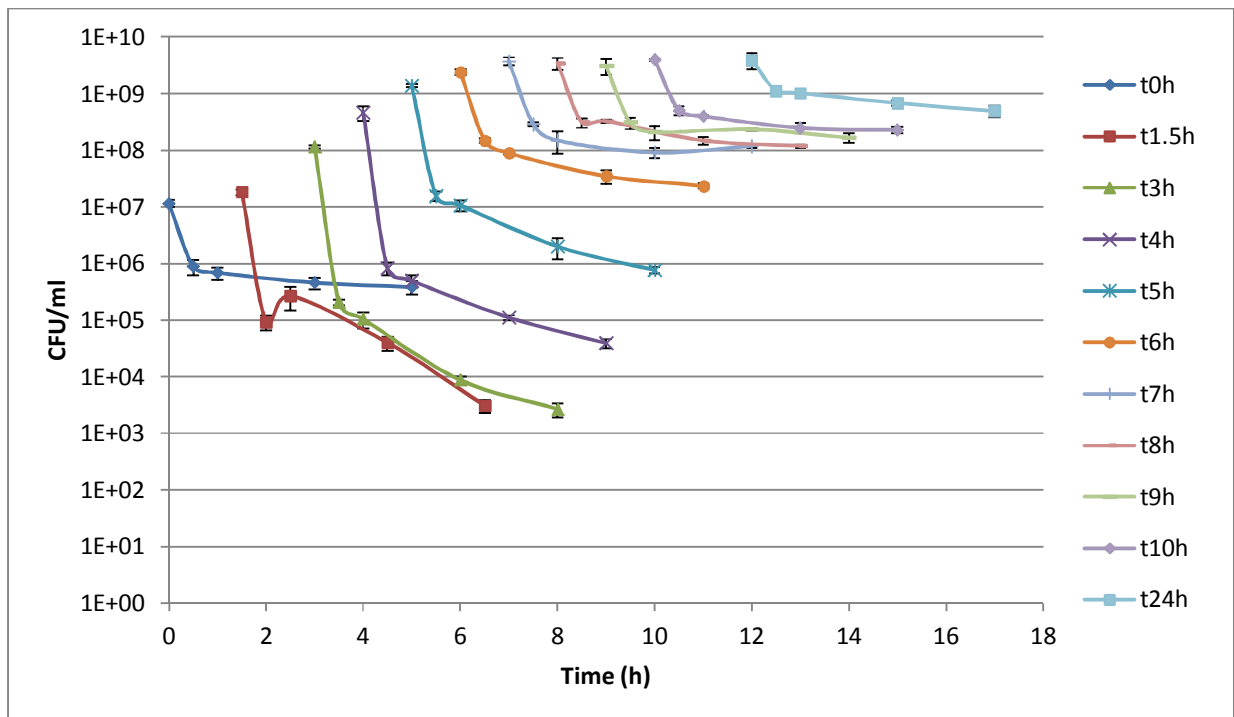


Figure 7.2 : Killing curves obtained with the different samples from the batch cultures with 4.0g/L initial glucose.

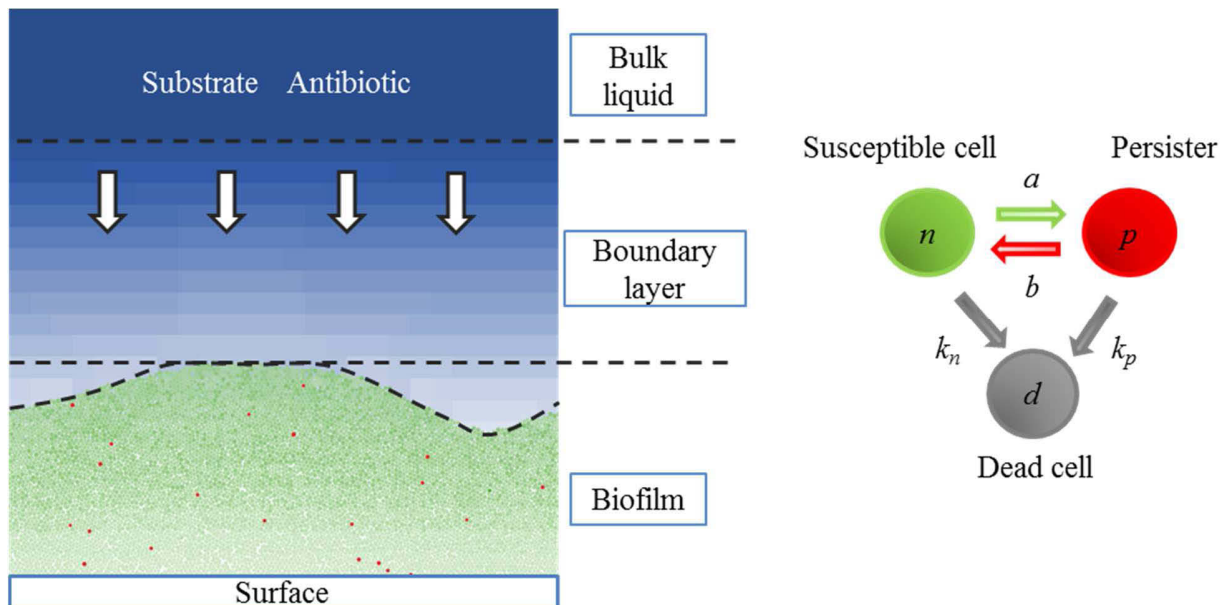
The error bars represent the standard deviations of three replicates. All killing curves are plotted on the same graph but were obtained from separate treated samples from the antibiotic-free batch culture harvested at 0, 1.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 24 hours of culture. CFUs of each treated sample were measured at 0, 0.5, 1, 3 and 5 hours of treatment. The killing curve of the sample $t0h$ has a similar pattern to that of the stationary phase killing curves, with a small decay of the persistent population. There is some lag time before the persisters of the overnight cultures start to wake up in the fresh medium.

Table 7.1 : Growth parameters optimized for the initial substrate concentration 4.0g/L.

	Symbol	Description	Value	Units
Optimized parameters	μ_{max}	Maximal growth rate	1.25	h^{-1}
	t_{lag}	Duration of the lag phase	1.13	h
	K_S	Monod half-saturation constant for the substrate S ($\mu=\mu_{max}/2$ for $C_S=K_S$).	3.5×10^{-3}	$g.L^{-1}$
	Y_{XS}	Mass of substrate consumed per cell produced	1187	$fg.cell^{-1}$

7.2 Informations supplémentaires du chapitre 4

7.2.1 Computational domain

**Figure 7.3: Scheme of the spatial organization of the computational domain.**

The model is in two spatial dimensions, width and height. Solutes diffuse from a bulk liquid above the biofilm through a boundary layer. Actively growing susceptible cells can become non-growing persisters or dead cells. Persister can switch back to susceptible cells or become dead. Substrate concentration is represented by a shade of blue. Susceptible cells are represented by a shade of green, depending on their growth rate.

7.2.2 Model parameters

Table 7.2 : Model default parameters.

Symbol	Units	Value	Description	Reference
Computational domain				
lx	μm	104	Width of the domain	This study
Δl	μm	4	Length of a grid cell (square)	This study
lb	μm	40	Length of the boundary layer	(Lardon <i>et al.</i> , 2011)
Δt_{df}	ms	3.5	Time step of the diffusion-reaction algorithm	This study
Δt_{cell}	s	60	Time step of cell update	This study
Solutes				
$C_{S,bulk}$	g.L^{-1}	0.4	Substrate concentration in the bulk	This study
D_S	$\mu\text{m}^2.\text{s}$	900	Diffusion coefficient of the substrate (glucose) in water at 37°C	(Suhaimi <i>et al.</i> , 2015)
$C_{A,bulk}$	xMIC	1000	Bulk concentration of antibiotic during treatments	This study
$C_{A,MIC}$	mg.L^{-1}	0.05	Minimal Inhibitory Concentration of the antibiotic	(Carvalho <i>et al.</i> , 2017)
D_A	$\mu\text{m}^2.\text{s}$	900	Diffusion coefficient of the antibiotic in water at 37°C	This study
D_n^b/D_n		0.8	Relative diffusion coefficient of a solute in the biofilm compared to its coefficient in water	(Lardon <i>et al.</i> , 2011)
Bacterial growth				
μ_{max}	h^{-1}	1.25	Maximal growth rate	(Carvalho <i>et al.</i> , 2017)
K_S	g.L^{-1}	3.5×10^{-5}	Half-saturation constant for the substrate S ($\mu = \mu_{max}/2$ for $C_S = K_S$)	(Carvalho <i>et al.</i> , 2017)
Y_{XS}	g.cell^{-1}	1187	Substrate consumed to produce one cell	(Carvalho <i>et al.</i> , 2017)
d_x	$\text{fg}.\mu\text{m}^{-3}$	200	Density of cells	(Klima and Psenner, 1998)
m_{div}	fg	500	Cell mass at division	(Klima and Psenner, 1998)
k_{max}	h^{-1}	10	Maximum killing rate of normal cells	This study
k_{maxp}	h^{-1}	0.1	Maximum killing rate of persisters	This study
K_k	g.L^{-1}	6.4	Half-saturation constant for the killing rates of susceptible and persister cells ($k(MIC) = \mu_{max}$)	This study

7.2.3 Diffusion-reaction algorithm

To be solved, the diffusion-reaction equation is discretized in time and space. The equation used in the model is:

$$\begin{aligned}
 & C_n^{t+\Delta t_{diff}}(x, y) \\
 &= C_n^t(x, y) \\
 &+ \frac{\Delta t_{diff}}{\Delta l^2} \left[D_n(x-1, y) \times C_n^t(x-1; y) + D_n(x+1, y) \times C_n^t(x+1; y) \right. \\
 &\quad \left. + D_n(x, y-1) \times C_n^t(x; y-1) + D_n(x, y+1) \times C_n^t(x; y+1) - N \times D_n(x, y) \times C_n^t(x; y) \right] \\
 &+ r_n(x, y) \times \Delta t_{diff}
 \end{aligned}$$

Δt_{diff} is the time step. The space is discretized in square shaped grid cells of length Δl . $C_n^t(x, y)$ is the concentration of the component n in the patch (x, y) at an instant t . N is the number of neighbors of the grid cell (x, y) . $D_n(x, y)$ is the diffusion coefficient of the component n in the grid cell (x, y) . $r_n(x, y)$ is the set of reactions occurring in the grid cell (x, y) for the component n .

7.2.4 Relation between the number of persisters and b post-treatment and the recovery efficiency

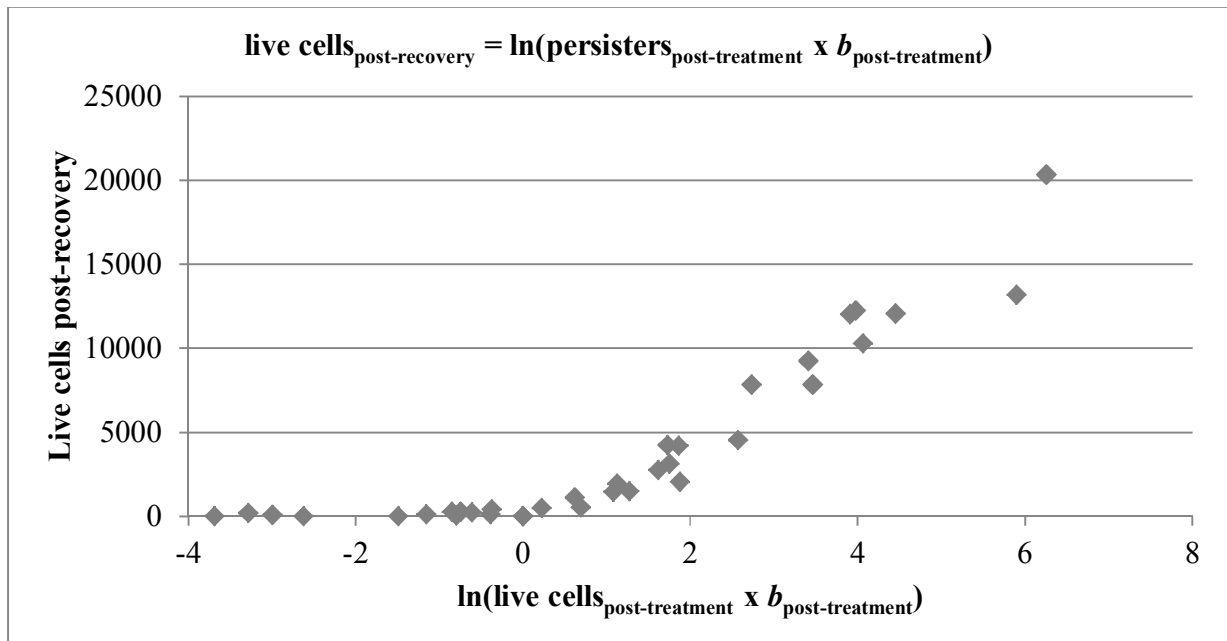


Figure 7.4 : Correlations.

Live cells post-recovery depends on the number of live cells post-treatment (only persisters) and the post-treatment wake up rate b when the switching strategy does not impair growth (substrate-dependent and antibiotic-dependent strategies).

7.2.5 Population dynamics

7.2.5.1 Stochastic switches

Set n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$a_{max} (h^{-1})$	1	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.01
$b_{max} (h^{-1})$	1	0.1	0.01	1	0.1	0.01	1	0.1	0.01

2 hours treatment

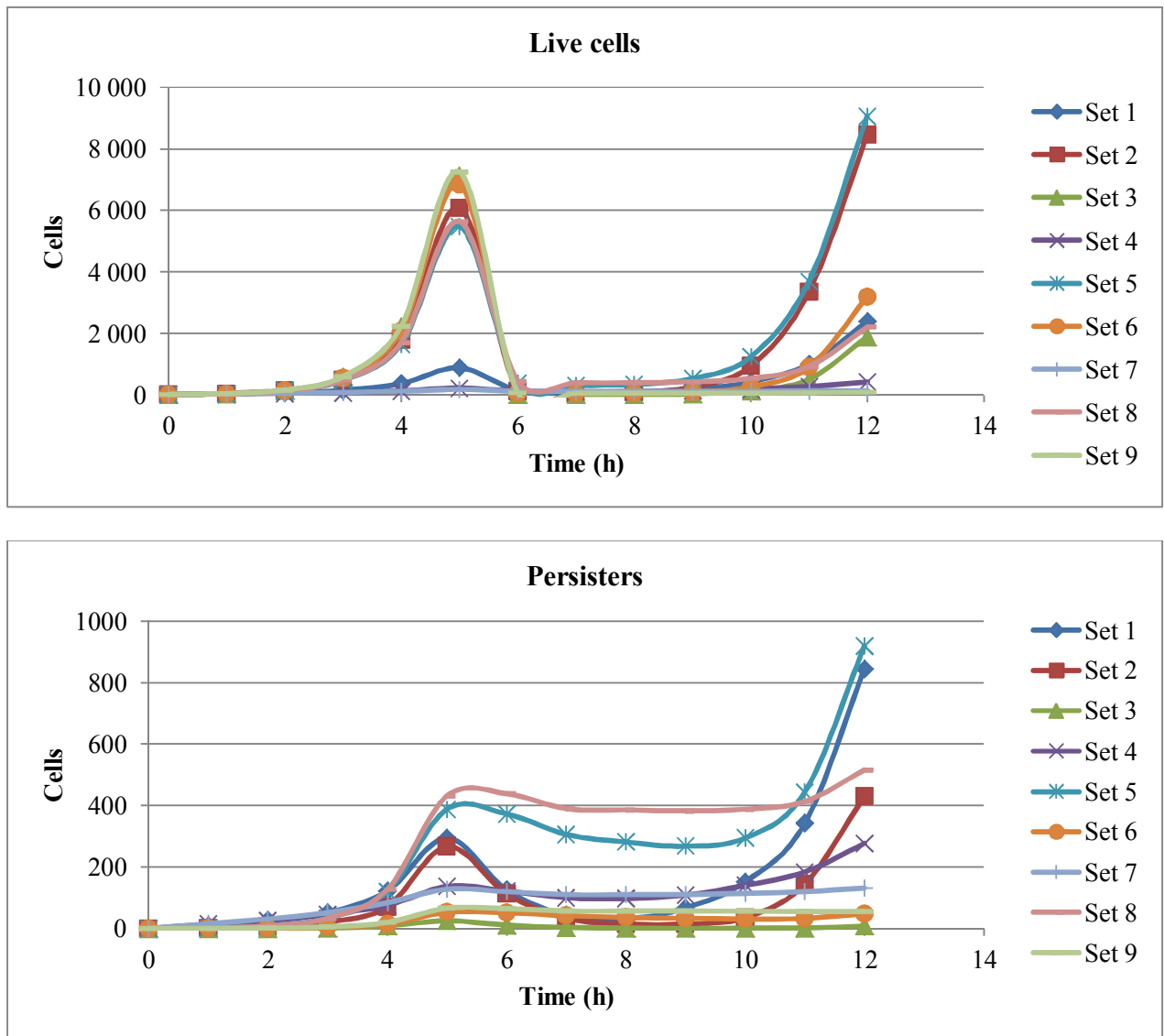


Figure 7.5 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with stochastic switches, two hours treatment (means of four simulations).

8 hours treatment

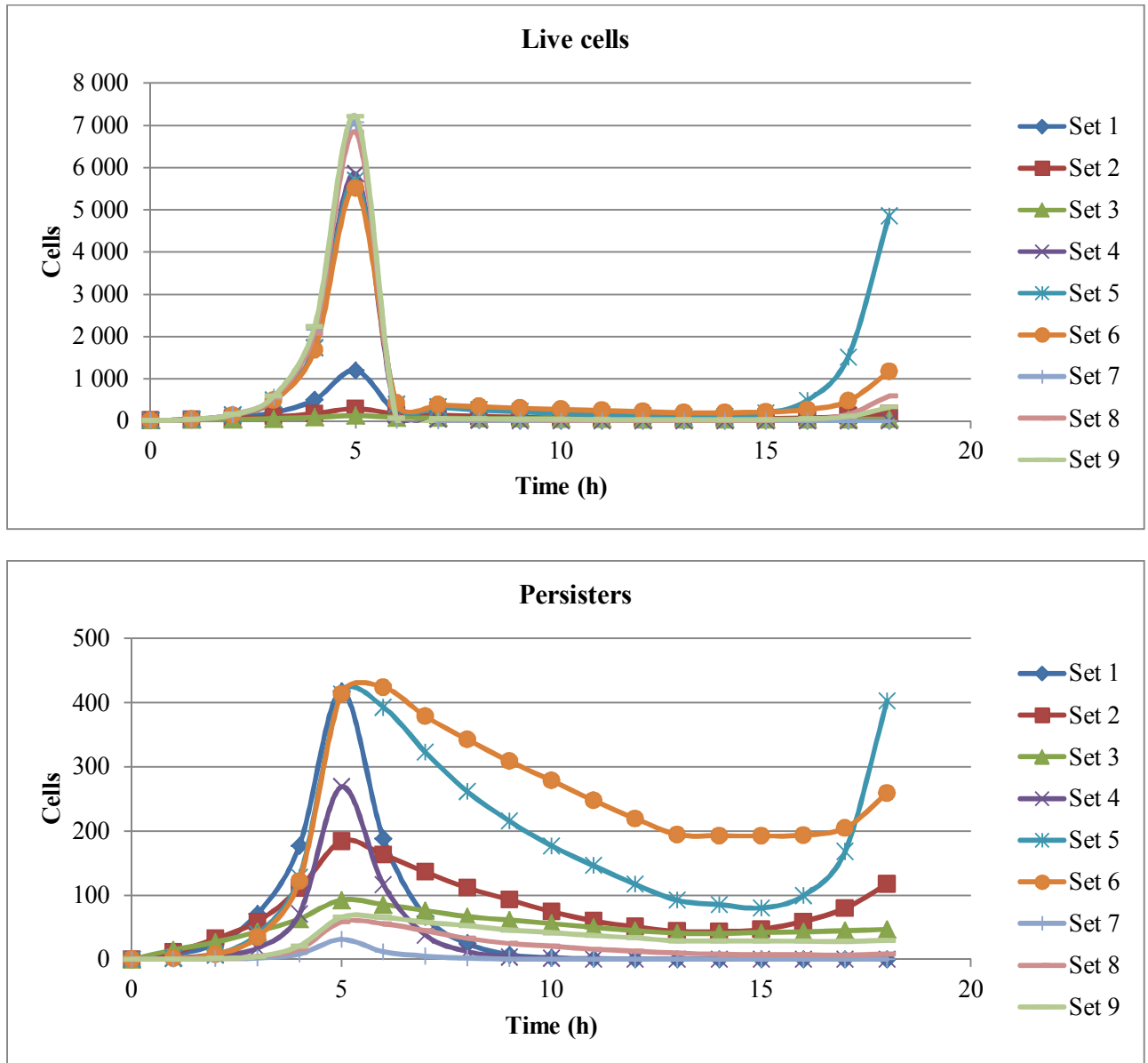


Figure 7.6 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with stochastic switches, eight hours treatment (means of four simulations).

7.2.5.2 Substrate-dependent switches

Set n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$a_{max} (h^{-1})$	1	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.01
$b_{max} (h^{-1})$	1	0.1	0.01	1	0.1	0.01	1	0.1	0.01

2 hours treatment

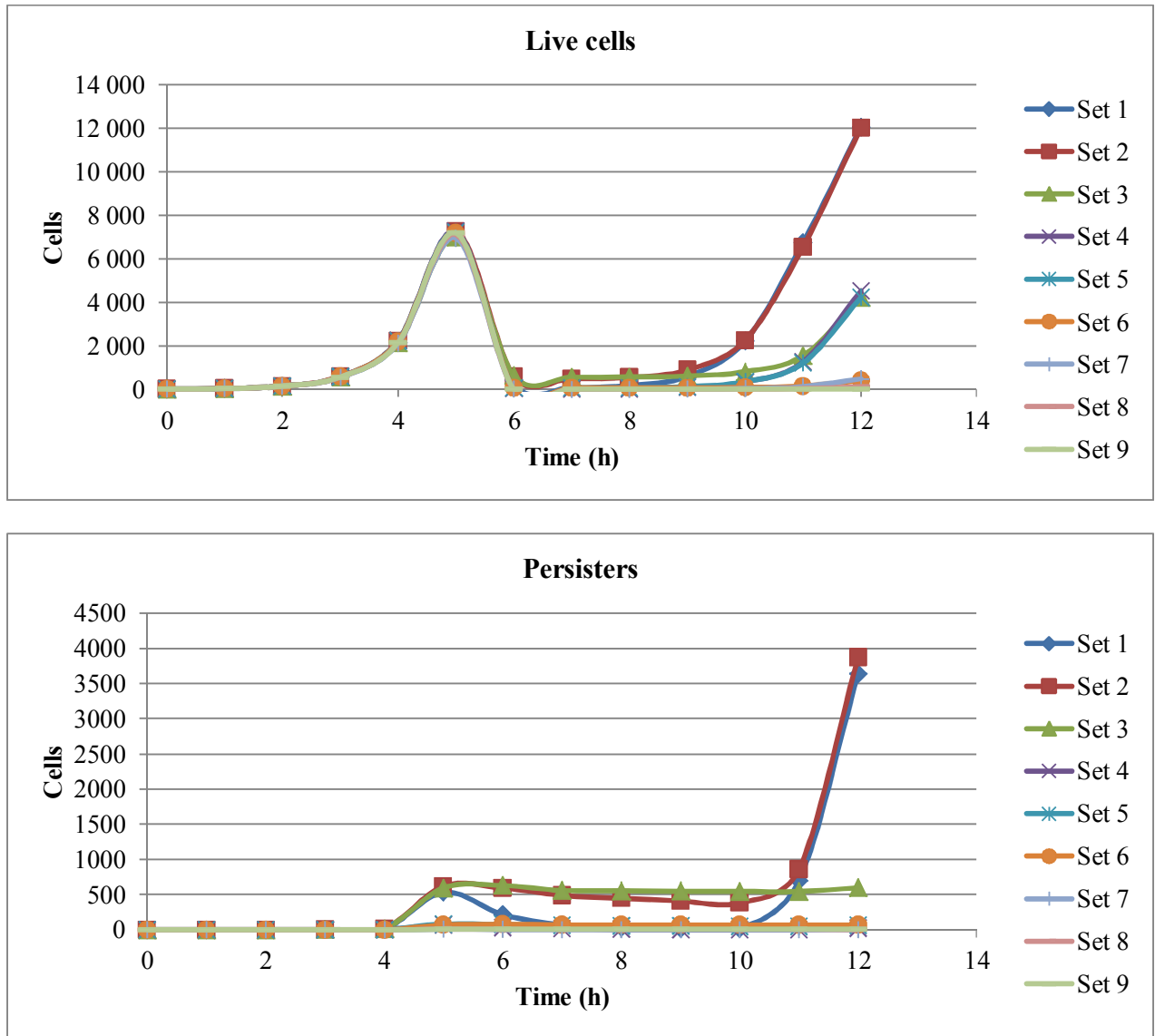


Figure 7.7 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with substrate-dependent switches, two hours treatment (means of four simulations).

8 hours treatment

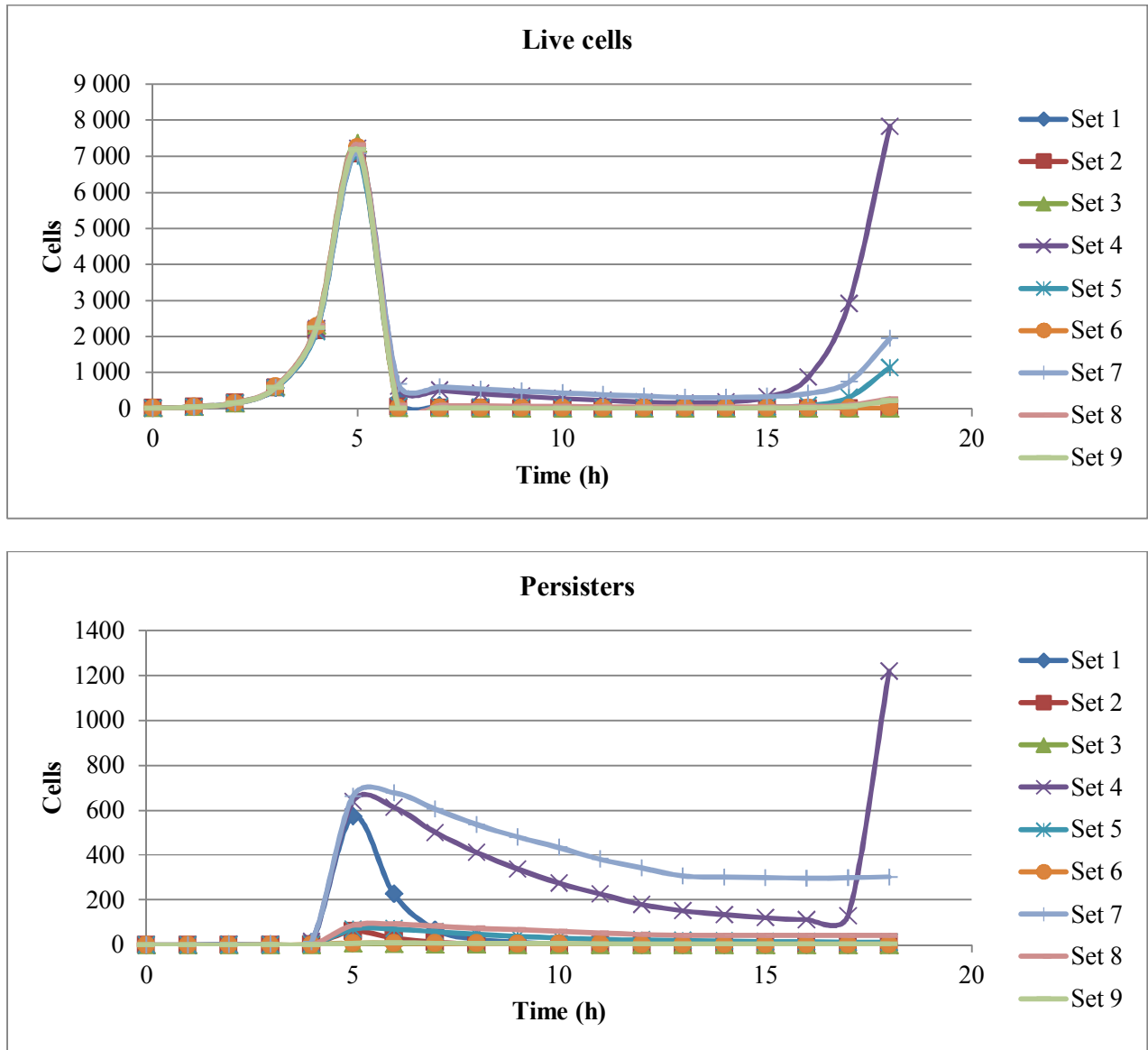
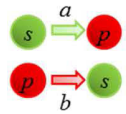


Figure 7.8 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with substrate-dependent switches, eight hours treatment (means of four simulations).

7.2.5.3 Antibiotic-dependent switches

Set n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$a_{max} (h^{-1})$	1	1	1	0.1	0.1	0.1	0.01	0.01	0.01
$b_{max} (h^{-1})$	1	0.1	0.01	1	0.1	0.01	1	0.1	0.01



2 hours treatment

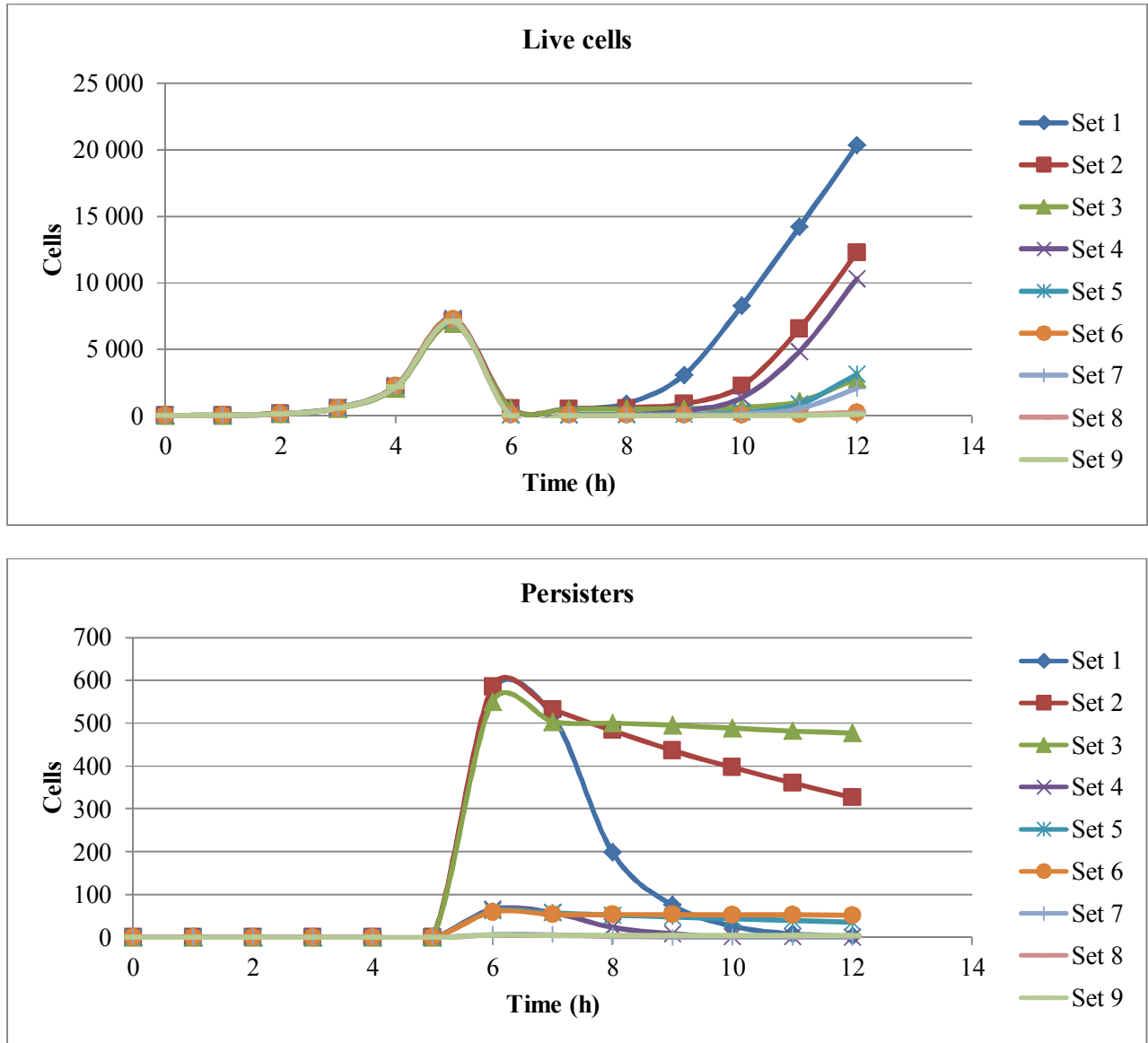


Figure 7.9 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with antibiotic-dependent switches, two hours treatment (means of four simulations).

8 hours treatment

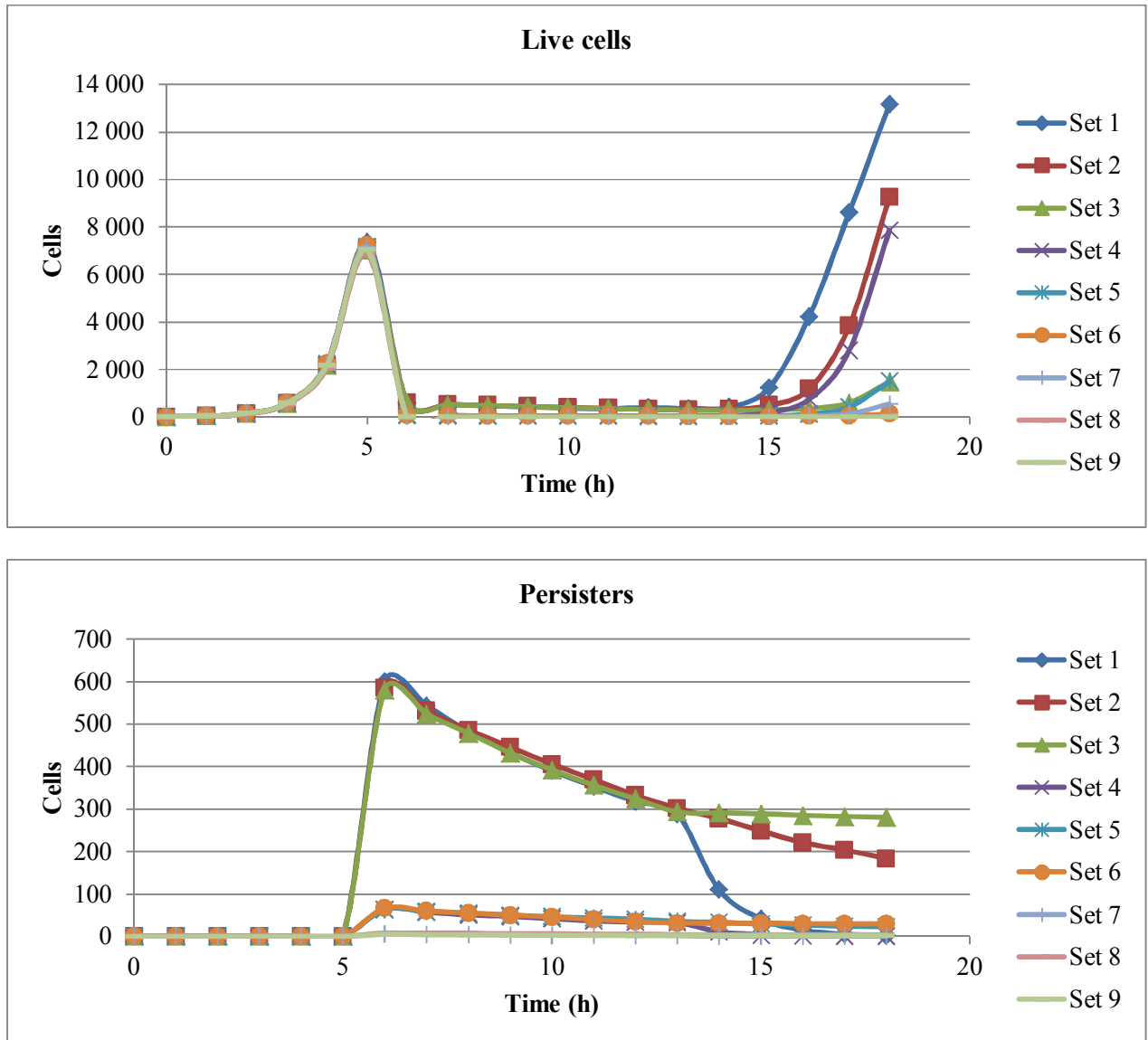


Figure 7.10 : Population dynamics of live cells (susceptible and persister cells) and persister cells only with antibiotic-dependent switches, eight hours treatment (means of four simulations).

7.2.6 Images of regenerated biofilms (5 hours post treatment)

7.2.6.1 Stochastic switches

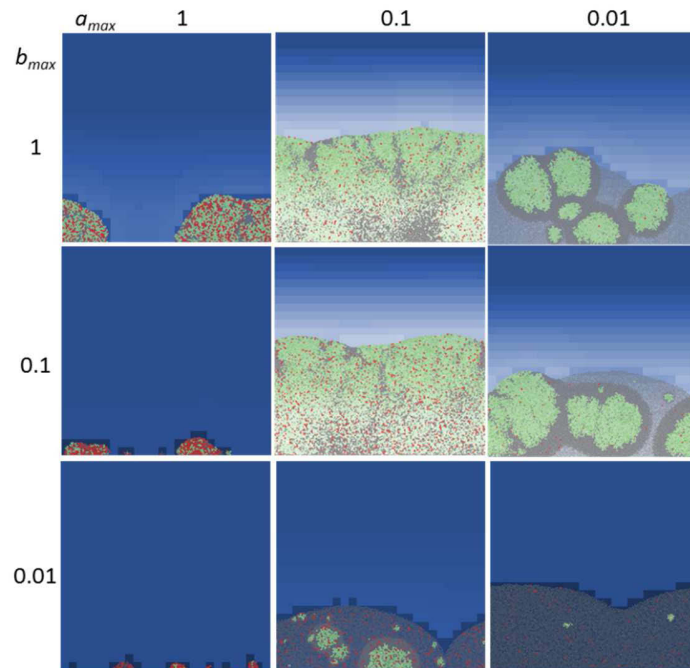


Figure 7.11 : Biofilms initially treated during two hours, stochastic switches.

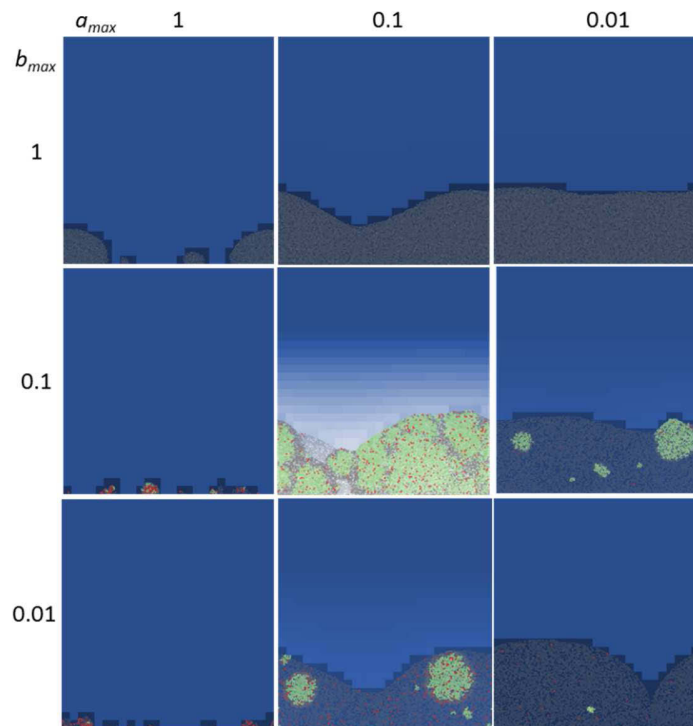


Figure 7.12 : Biofilms initially treated during eight hours, stochastic switches.

7.2.6.2 Substrate-dependent switches

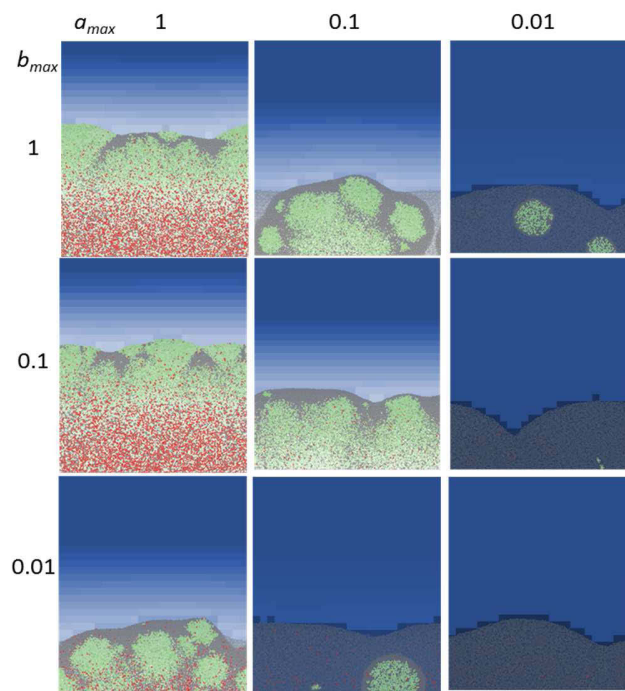


Figure 7.13: Biofilms initially treated during two hours, substrate-dependent switches.

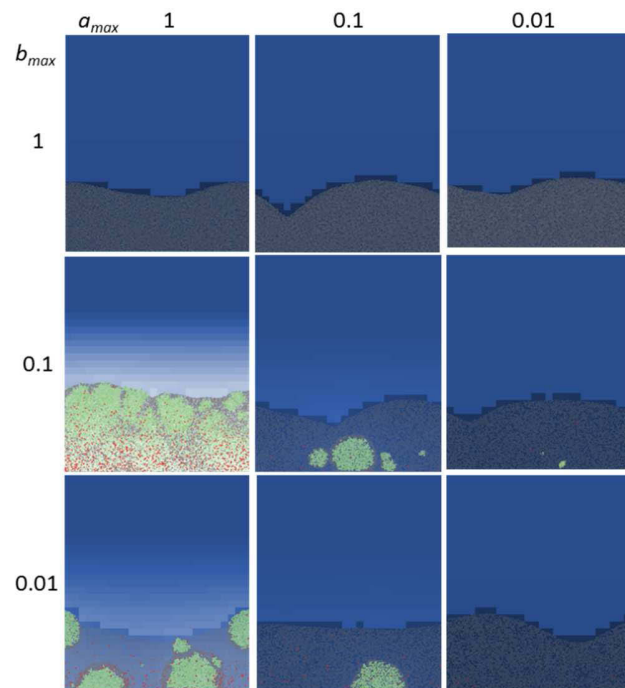


Figure 7.14: Biofilms initially treated during eight hours, substrate-dependent switches.

7.2.6.3 Antibiotic-dependent switches

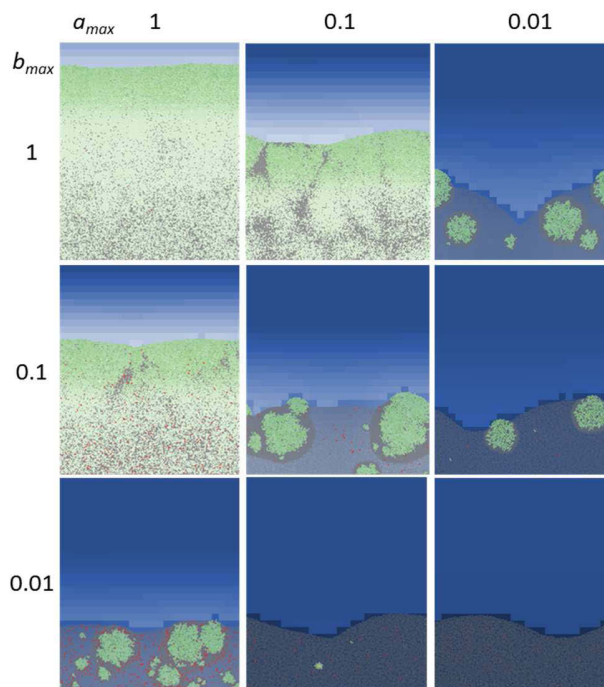


Figure 7.15: Biofilms initially treated during two hours, antibiotic-dependent switches.

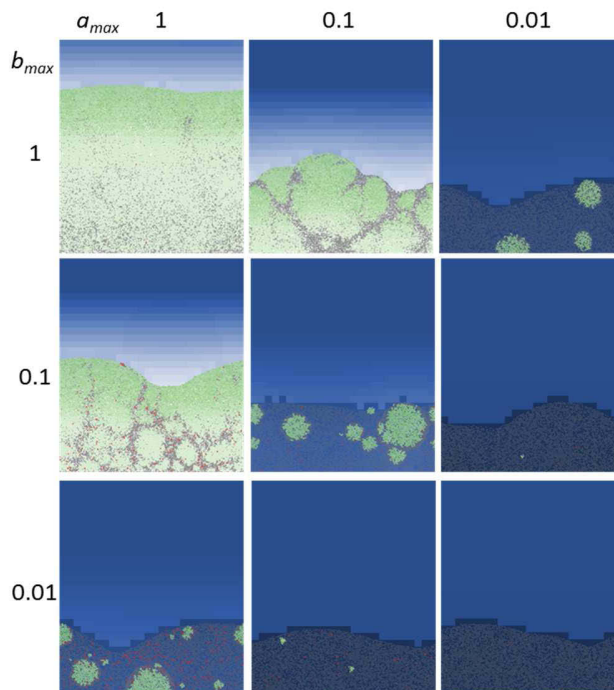


Figure 7.16: Biofilms initially treated during eight hours, antibiotic-dependent switches.

7.2.7 Local sensibility analysis

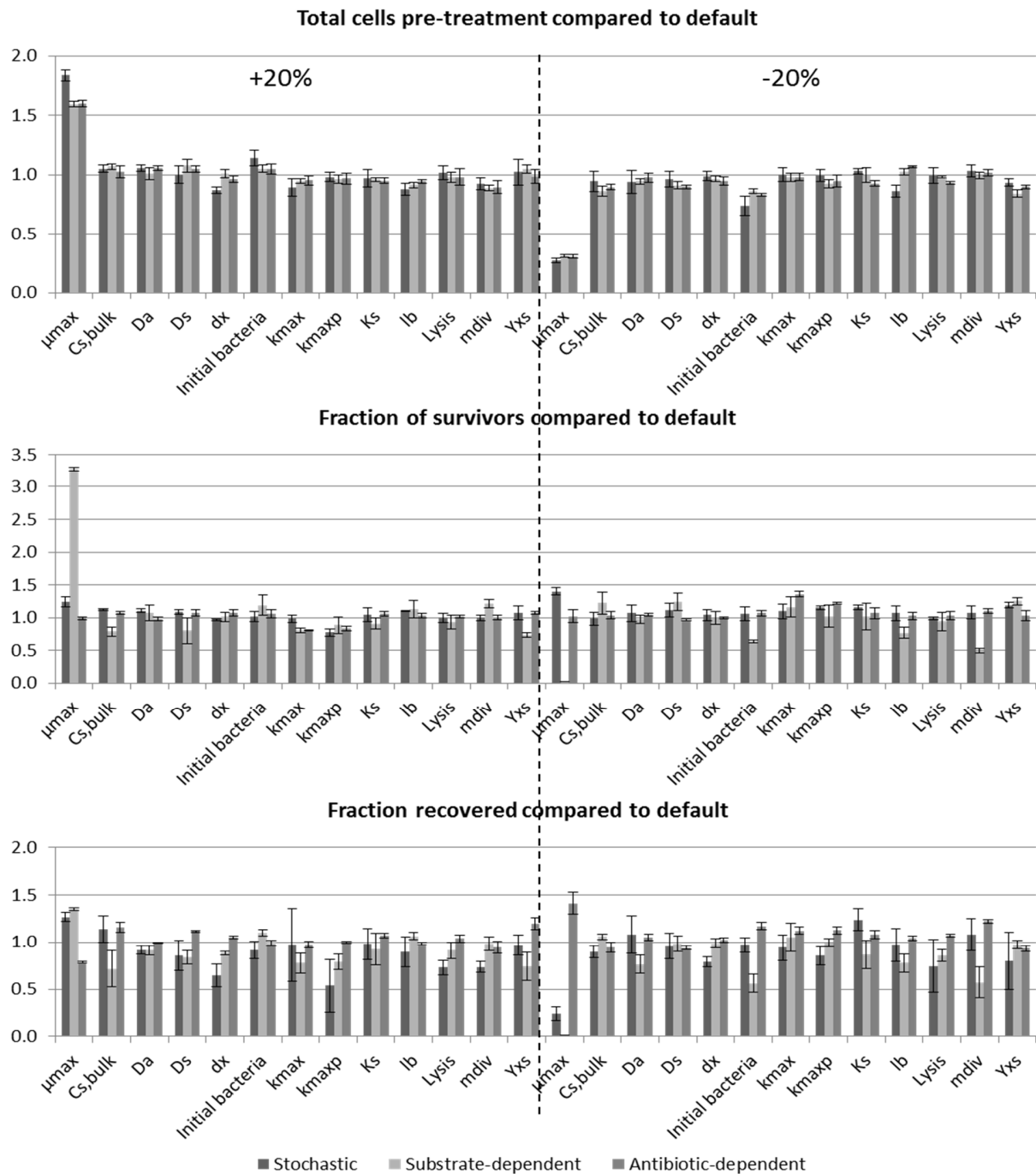


Figure 7.17 : Local sensibility analysis.

Ratios of the total cells before treatment, fraction of survivors and fraction recovered compared to the default values (parameters in table S1). Each parameter has been separately increased or decreased by twenty percent compared to its default value. Results are the mean and standard deviation of three simulations.

7.3 Expérience en *flow cell* couplée à la microscopie confocale : protocole et résultats préliminaires

La *flow cell* utilisée est en quartz et possède trois canaux de dimensions 1x5x35mm. Une lamelle de microscopie en verre est fixée sur la *flow cell* à l'aide d'une colle silicone transparente (3M™) et sert de support au développement des biofilms. La *flow cell* est connectée à des tuyaux en silicone de diamètre interne 1mm et le milieu de culture circule à l'aide d'une pompe péristaltique. Afin de limiter la formation de bulles, les bouteilles de milieu de culture sont retournées et la pompe est placée en aval de la *flow cell*, comme suggéré par Crusz *et al.* (2012). La *flow cell* est placée dans une enceinte maintenue à 37°C par un thermostat. Le schéma de montage du système est représenté dans la Figure 7.18. Le circuit est stérilisé en place en faisant circuler de la javel 10% durant 45min, de l'éthanol 100% durant 30min puis du milieu de culture durant 3 heures, à un débit de 25ml.h⁻¹.canal⁻¹. Le débit de milieu est ensuite réduit à 3,3ml.h⁻¹.canal⁻¹. Le milieu utilisé est du M63B1 supplémenté avec 0,4g.L⁻¹ de glucose et, le cas échéant, 1000 fois la CMI de ciprofloxacine. Le temps de trajet (t) du liquide entre la bouteille de milieu et la *flow cell* est calculé par la formule :

$$t = l \times \frac{\pi \times d^2}{4 \times Q}$$

l est la longueur de tube séparant la bouteille de milieu de la *flow cell*. d est le diamètre interne du tube et Q est le débit imposé par la pompe péristaltique.

La souche utilisée est CH1440, la même que celle du chapitre 3. Les canaux des *flow cells* sont ensemencés par injection, à l'aide d'une seringue, d'une solution de bactérie de DO₆₂₀ 0.015 suivi d'une phase d'adhésion d'1 heure avant de relancer le flux de milieu. Pour l'observation au microscope confocal (TCS SP5 Leica®), la *flow cell* est placée sur la platine du microscope et 9 positions, 3 pour chaque canal de la *flow cell*, sont sélectionnées et suivies au cours du temps. Ces positions sont espacées de 5 à 8mm et éloignées d'au moins 7mm des extrémités des canaux. Lors des traitements antibiotiques, un canal témoin n'est pas traité. Le microscope est programmé pour observer chaque position une fois par heure. Un laser argon est utilisé (standby 25%, intensité 5%) et le microscope est réglé sur 700Hz.

Le développement initial d'un biofilm observé au microscope confocal, de 0 à 12 heures, est présenté dans la Figure 7.19. L'évolution de la biomasse - mesurée par le logiciel Comstat 2 - lors de ce développement initial est présentée dans la Figure 7.20. L'intensité de la fluorescence des biofilms diminue après environ 5 heures de culture, lorsque le biofilm devient mature. La fluorescence diminue et le bruit de fond augmente, rendant le

traitement des séries temporelles d'images difficile. La maturation de la GFP nécessite de l'oxygène, qui devient limitant dans les biofilms matures, ce qui pourrait expliquer la diminution de fluorescence (Hansen *et al.*, 2001).

Des biofilms cultivés en *flow cell* pendant 12 heures ont ensuite été traités à 1000 fois la CMI de ciprofloxacine pendant 12 heures puis ont été observés au microscope confocal pendant 12 heures après l'arrêt du traitement, soit trois phases de 12 heures : croissance, traitement et régénération. La Figure 7.21 et la Figure 7.22 présentent les résultats de deux expériences identiques de la régénération de biofilms. A la fin du traitement, les biofilms traités n'ont pas présenté de différence significative avec les biofilms témoins. Les cellules des biofilms traités restent visibles pendant plusieurs heures après les traitements. Un test de marquage fluorescent à l'iodure de propidium (IP), pénétrant les cellules dont la membrane est endommagée et habituellement utilisé pour distinguer les cellules mortes, a marqué peu de cellules et n'a pas mis en évidence de différence significative avec les biofilms non traités. Des dénombrements d'UFC au cours du temps de biofilms formés en micro-puits et traités à la ciprofloxacine à 1000 fois la CMI ont pourtant mis en évidence l'élimination de plus de 95% des bactéries en 12h. Il est possible que la ciprofloxacine ne permet pas de lyser rapidement les cellules, laissant la structure des biofilm intacte après le traitement.

Conseils lors de l'utilisation du système *flow cell* :

- Stériliser le milieu de culture (M63B1) à l'autoclave produit des précipités pouvant nuire au bon écoulement du milieu dans le circuit de la *flow cell* et dégrade une partie du glucose.
- Utilisé des concentrations élevée en glucose – par exemple 4,0g/L peut conduire à la formation de nombreuses bulles dans la *flow cell* lors de la croissance du biofilm.
- Lorsque l'enceinte thermostatée du microscope confocal est utilisée, veiller à placer la sonde de température du thermostat proche de la *flow cell* car la température n'est pas homogène dans toute l'enceinte.
- Afin de limiter les mouvements de la *flow cell* lorsqu'elle est placée au microscope confocal, une bande de téflon – de type utilisé pour l'étanchéité des canalisations – ou un autre type d'antidérapant peut être placé aux bords de la *flow cell* pour éviter les glissements et la perte des positions mémorisées par le microscope.
- Augmenter la fréquence des observations augmente aussi la dégradation de la GFP due au phénomène de *bleaching*.

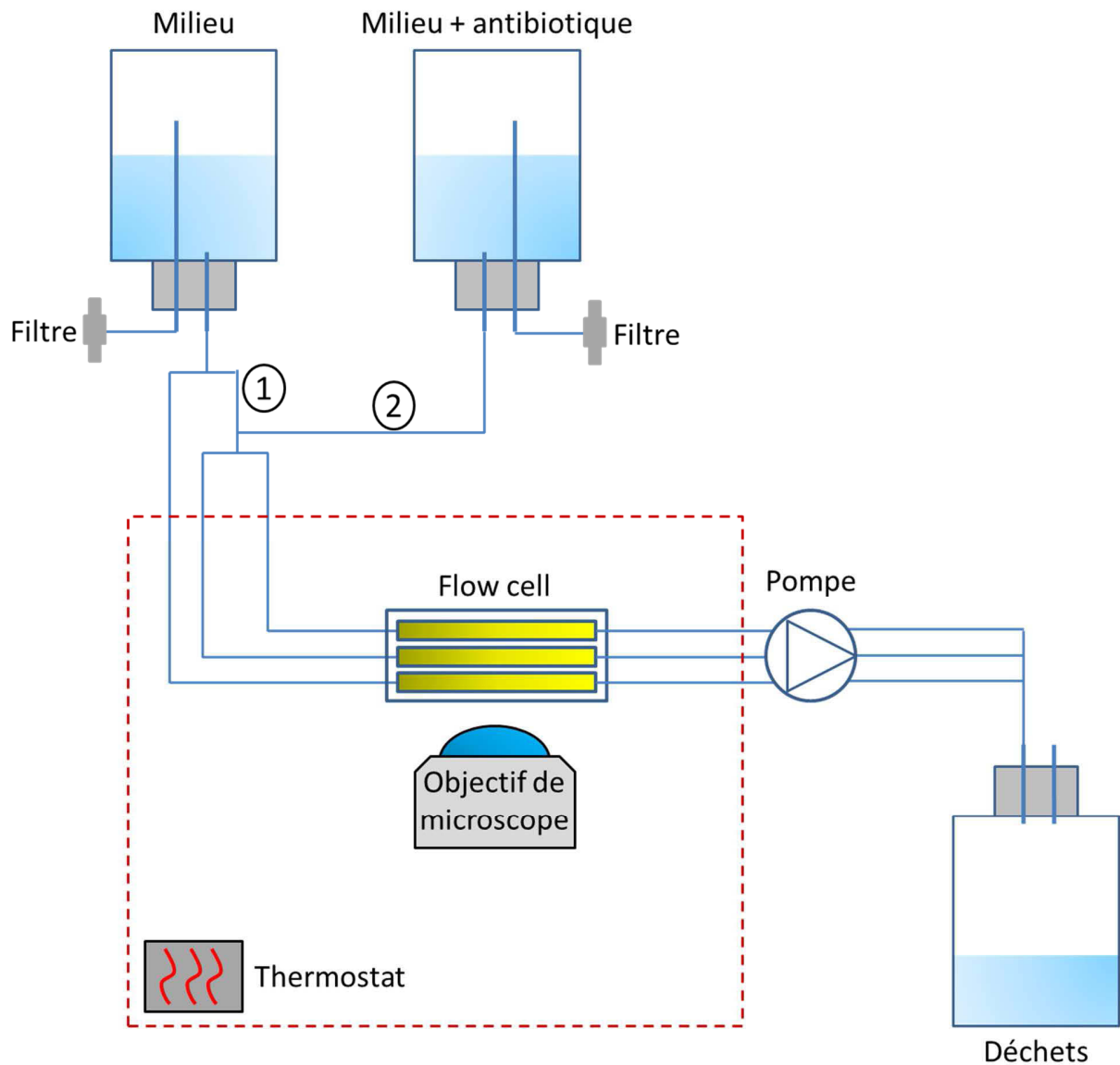


Figure 7.18 : Schéma de montage du système *flow cell*.

Les bouteilles de milieu sont maintenues retournées et en hauteur par rapport à la *flow cell* à l'aide d'une potence et une pompe péristaltique est placée en aval de la *flow cell*. Lors de la phase de croissance et de régénération du biofilm, le circuit est clampé en (2). Pendant le traitement antibiotique, le circuit est clampé en (1). Les tubes connectés à la *flow cell* mesurent environ 2 mètres, en amont et en aval de la *flow cell*, pour pouvoir la placer au microscope confocal.

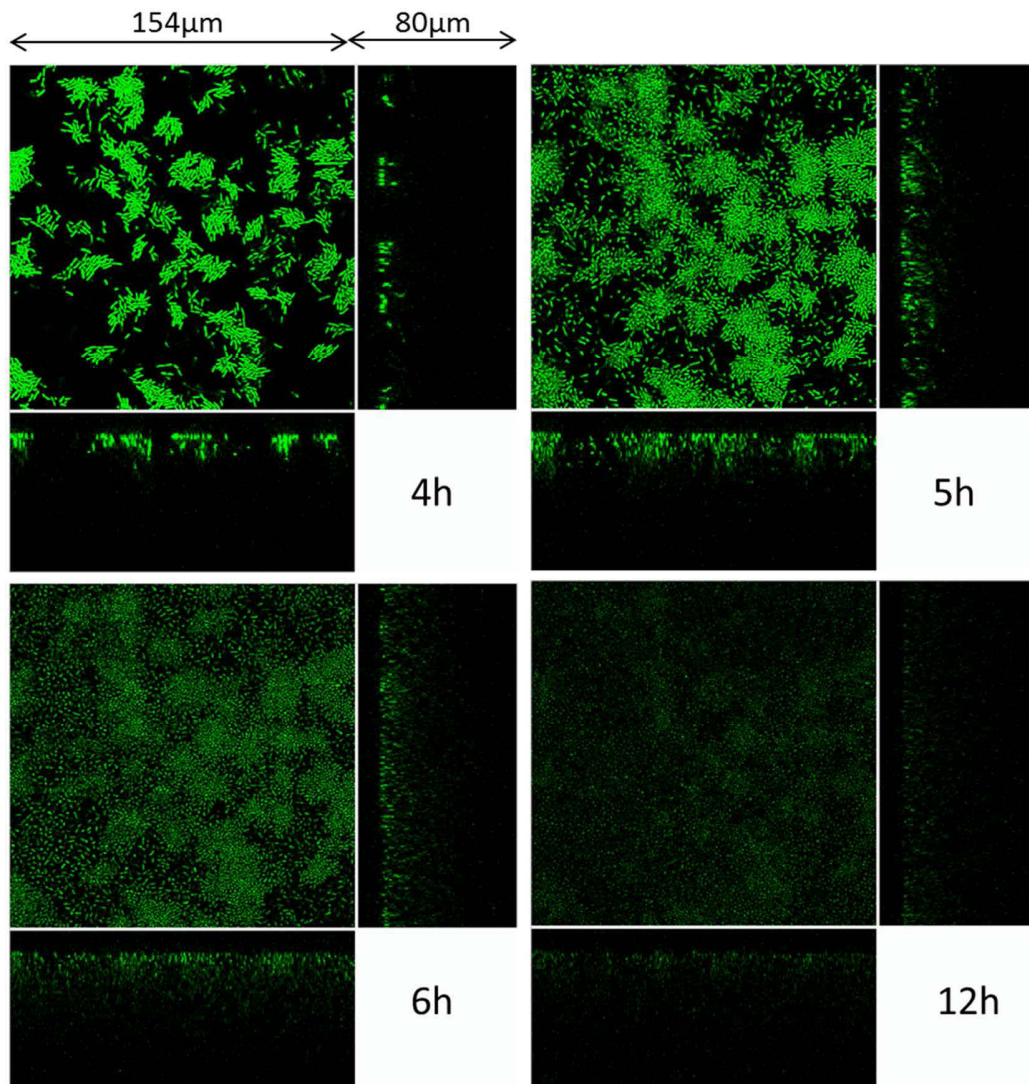


Figure 7.19 : Croissance d'un biofilm en *flow cell*.

Cette figure représente la même position suivie au cours du temps pendant 12 heures de temps de croissance du biofilm (images non traitées). Chaque image représente une coupe horizontale et deux coupes verticales du biofilm. L'intensité de la fluorescence émise par le biofilm diminue nettement lorsque celui-ci devient mature, après 6 heures de croissance.

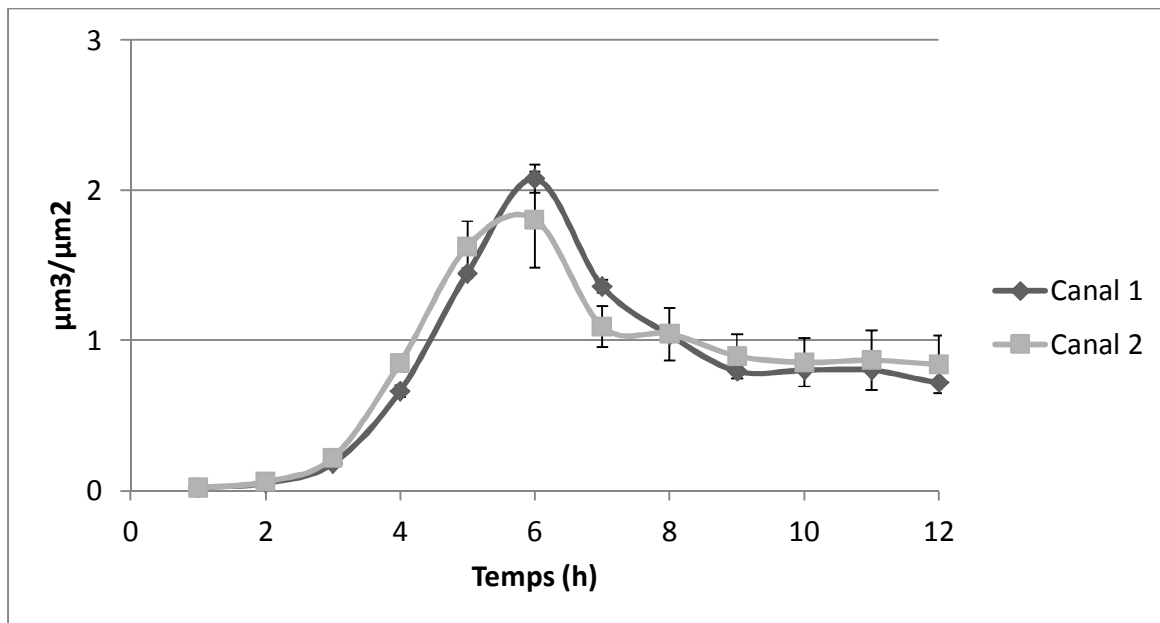


Figure 7.20 : Biomasse au cours du temps lors de la croissance d'un biofilm en *flow cell*.

Les images de microscopie confocale d'un biofilm cultivé en *flow cell* pendant 12 heures ont été traitées par la fonction *despeckle* et la méthode de seuillage Otsu à l'aide du logiciel ImageJ. Un seuil a été défini pour chaque mesure. La biomasse - le volume de biomasse rapporté à la surface observée en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ - a ensuite été mesurée par le logiciel Comstat 2 (Heydorn *et al.*, 2000). Le maximum de biomasse est obtenu à 6 heures de croissance, avant la perte de fluorescence due à la maturation du biofilm. Les données présentées sont la moyenne et l'écart-type de 3 mesures pour deux canaux de la *flow cell*.

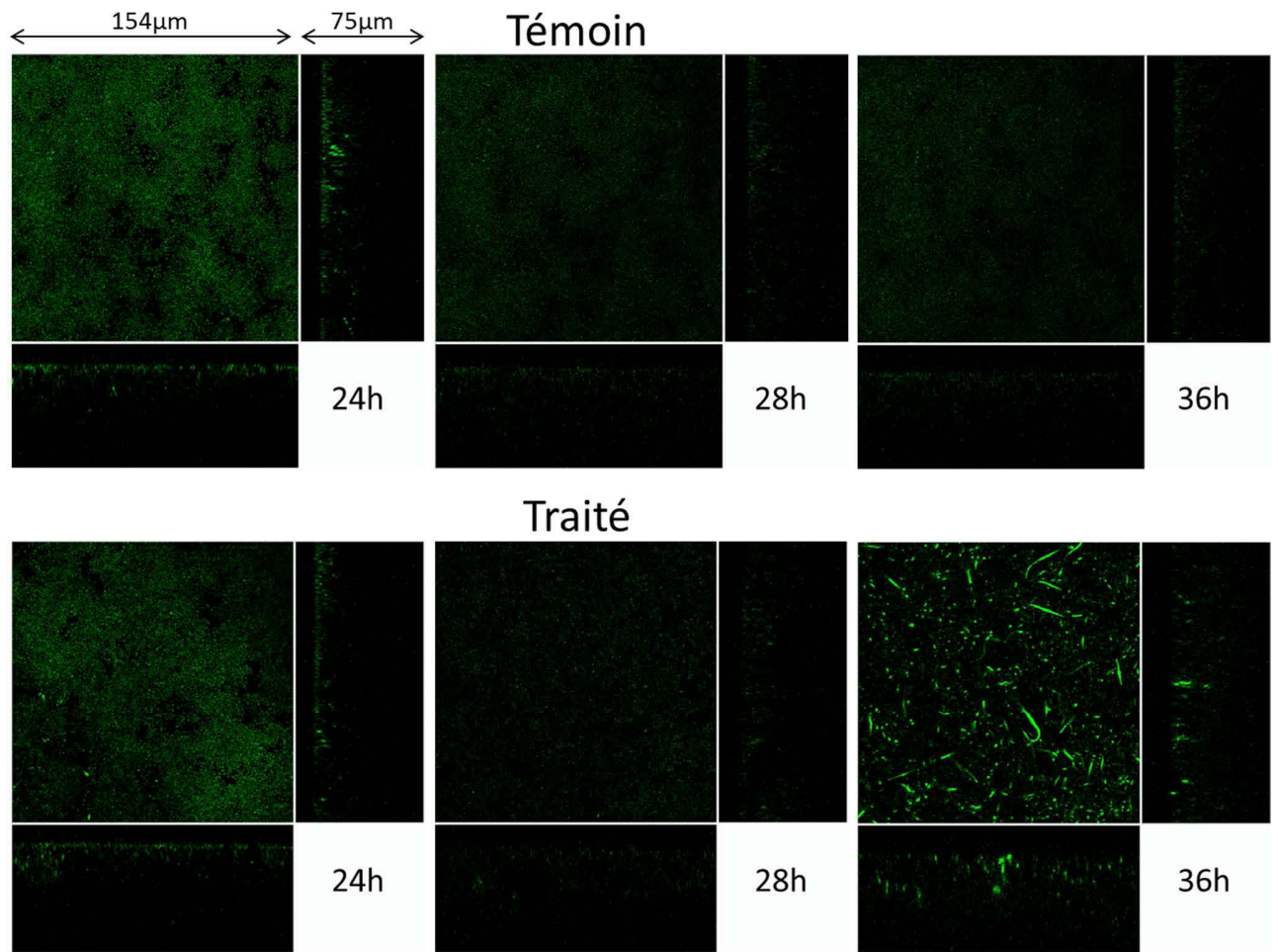


Figure 7.21 : Régénération d'un biofilm traité à la ciprofloxacine.

Des biofilms âgés de 12 heures ont été traités pendant 12 heures à la ciprofloxacine à 1000 fois la CMI puis observés au microscope confocal pendant 12 heures (soit un temps total de 36h). Les biofilms traités sont comparables aux biofilms témoins à 24h, les cellules ne sont pas lysées immédiatement par l'antibiotique. Le biofilm traité commence sa régénération entre 4 et 5 heures après le traitement sous forme de filaments puis reste stable jusqu'à 12h après le traitement. Les biofilms des deux canaux traités ont formé des filaments au même moment.

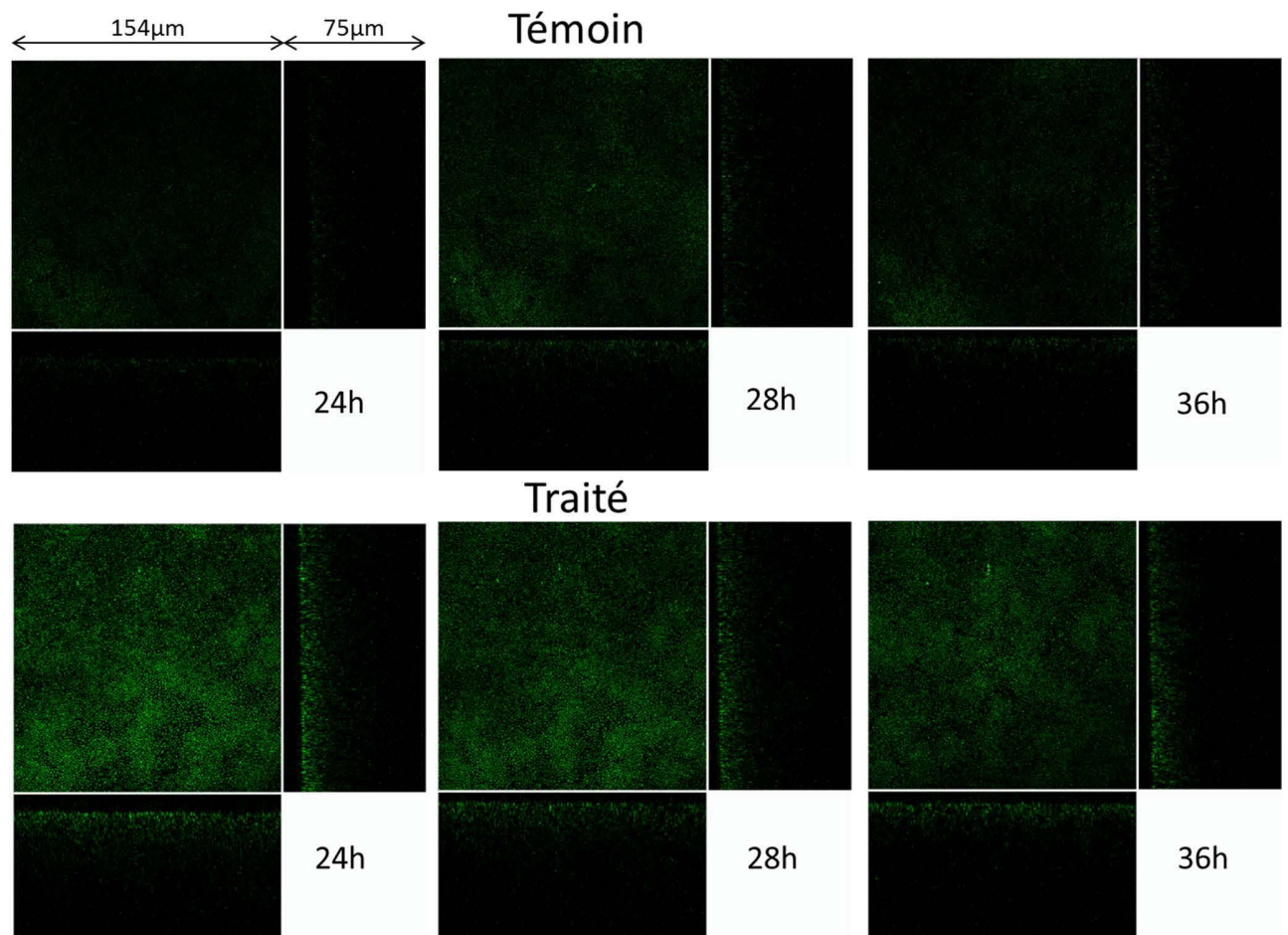


Figure 7.22 : Régénération d'un biofilm traité à la ciprofloxacine, réplica.

Cette expérience est le réplica de celle présentée dans la figure précédente. Lors de ce réplica, les biofilms traités ne se sont pas régénérés et sont restés stables pendant les 12 heures d'observation, après le traitement.

7.4 Expérience de cytométrie en flux : protocole

Cette expérience vise à quantifier la proportion de cellules sensibles, de persisters et de cellules mortes dans un échantillon. Pour cela nous réalisons un triple marquage au DAPI, au ChemChrome V6 (CV6) et à l'Iodure de Propidium (IP). Le DAPI marque toutes les cellules. Le CV6 est un marqueur d'activité esthérasique dont la fluorescence est activée quand il pénètre des cellules actives (Parthuisot *et al.*, 2000). Enfin, l'iodure de propidium (IP) pénètre seulement dans les cellules dont la membrane est endommagée, supposées mortes. La souche utilisée est *Klebsiella pneumoniae* CH1371, non productrice de GFP et sensible à l'ampicilline (CMI de 1,5µg/ml). La souche a été cultivée dans du milieu M63B1

supplémenté avec 4,0g/L de glucose. Des échantillons de cultures planctoniques en phase exponentielle (culture âgée de 3 heures) et stationnaire (culture âgée de 24 heures) ont été traités pendant 3 heures à l'ampicilline à 100 fois la CMI, puis marqués avec les différents fluorochromes et analysés au cytomètre en flux.

Avant analyse, 10 μ l de CV6 ont été ajoutés à 1ml d'échantillon puis incubé 30min à 37°C au noir (Parthuisot *et al.*, 2000). Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 6000rpm pendant 1min et les culots resuspendus dans 1ml d'eau physiologique. Le DAPI et l'IP ont été ajoutés aux échantillons quelques minutes avant analyse au cytomètre en flux.

7.5 Dynamiques de souches de *Klebsiella pneumoniae* traitées à la ciprofloxacine

Des souches de *Klebsiella pneumoniae* ont été isolées de personnes saines, de l'environnement ou cliniquement et classées en hyper-virulente ou multi-résistante (Blin *et al.*, 2017). Les souches utilisées dans Blin *et al.* (2017) ont été renommées en intégrant le LMGE, la correspondance des dénominations est disponible en Table 7.3. La CMI de ciprofloxacine a été déterminé pour chaque souche selon les recommandations de la *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI). Pour chaque souche, des cultures de densité optique initiale de 0,015 (620nm) ont été réalisées dans du milieu M63B1 supplémenté par 4,0g/L de glucose. Les cultures ont été maintenues sous agitation à 37°C durant 24h. A 0h, 3h et 24h de culture sans antibiotique, un échantillon des cultures a été prélevé et traité à la ciprofloxacine à 100 fois la CMI. Les UFC/ml de chaque échantillon traité ont été dénombrées après 0h, 1h, 4h et 26h de traitement par étalement sur gélose LB agar. Les CMI, les courbes de traitement et les courbes de croissance des différentes souches sont représentées dans les figures suivantes.

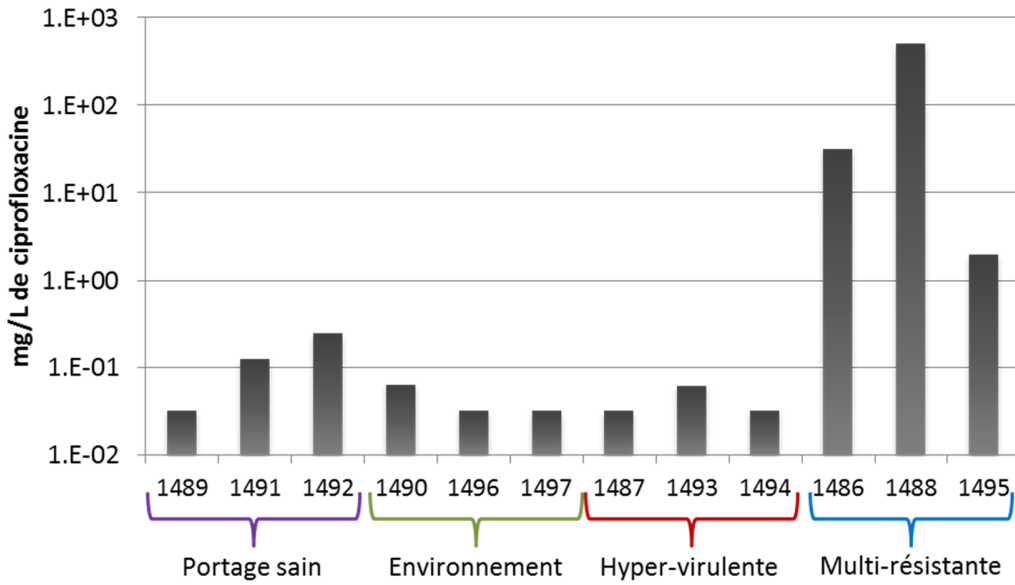


Figure 7.23 : Concentration Minimal Inhibitrice (CMI) de différentes souches de *Klebsiella pneumoniae*.

Les souches ont été isolées de personnes saines, de l'environnement ou cliniquement et classées en hyper-virulente ou multi-résistante.

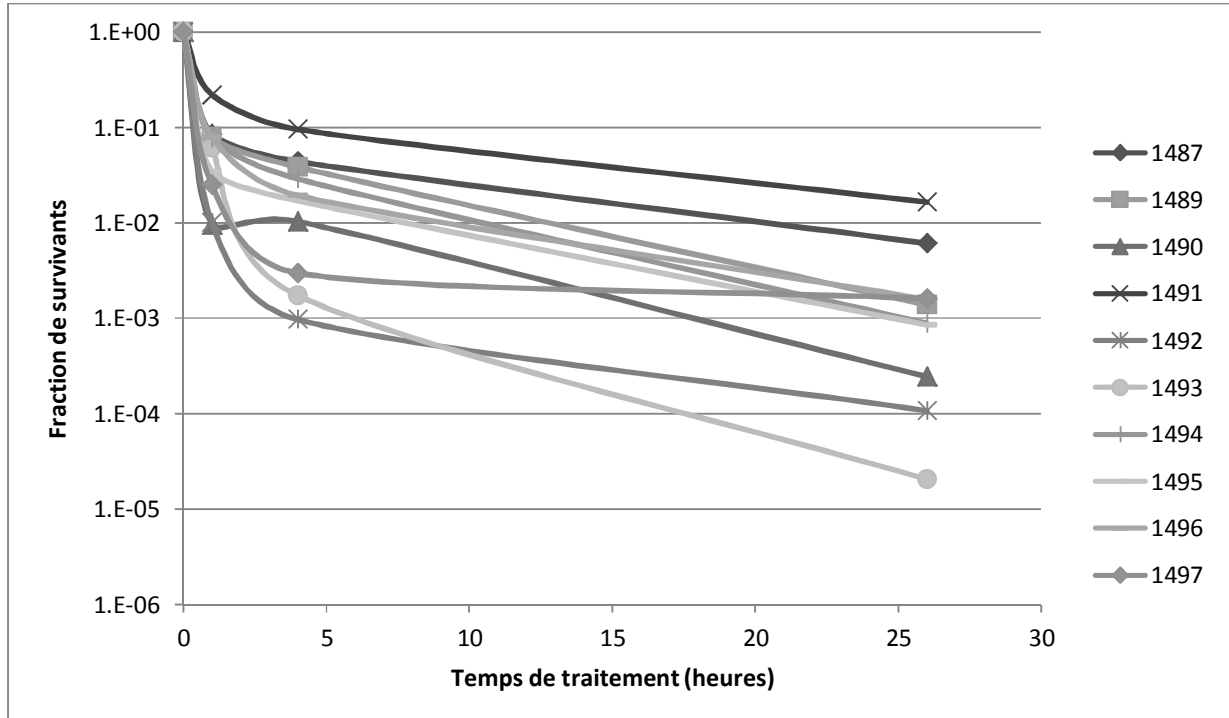


Figure 7.24 : Populations en phase de latence (à 0h de culture) traitées à 100 fois la CMI.

7 Annexes

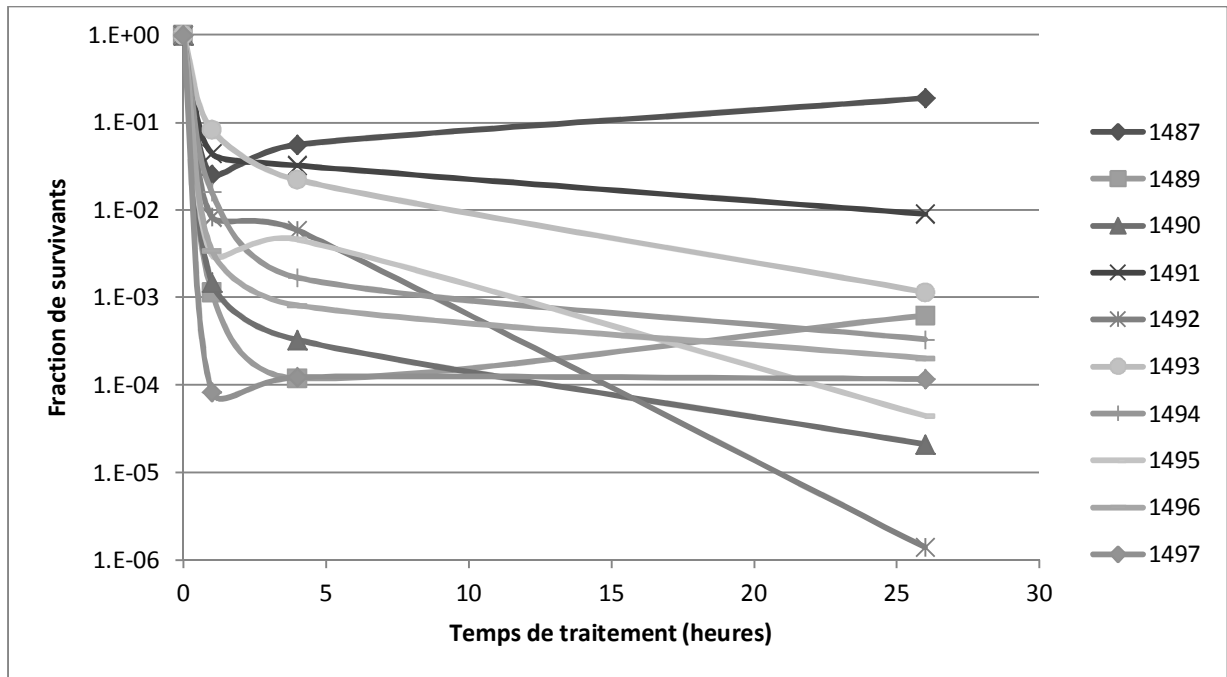


Figure 7.25 : Populations en phase exponentielle (à 3h de culture) traitées à 100 fois la CMI.

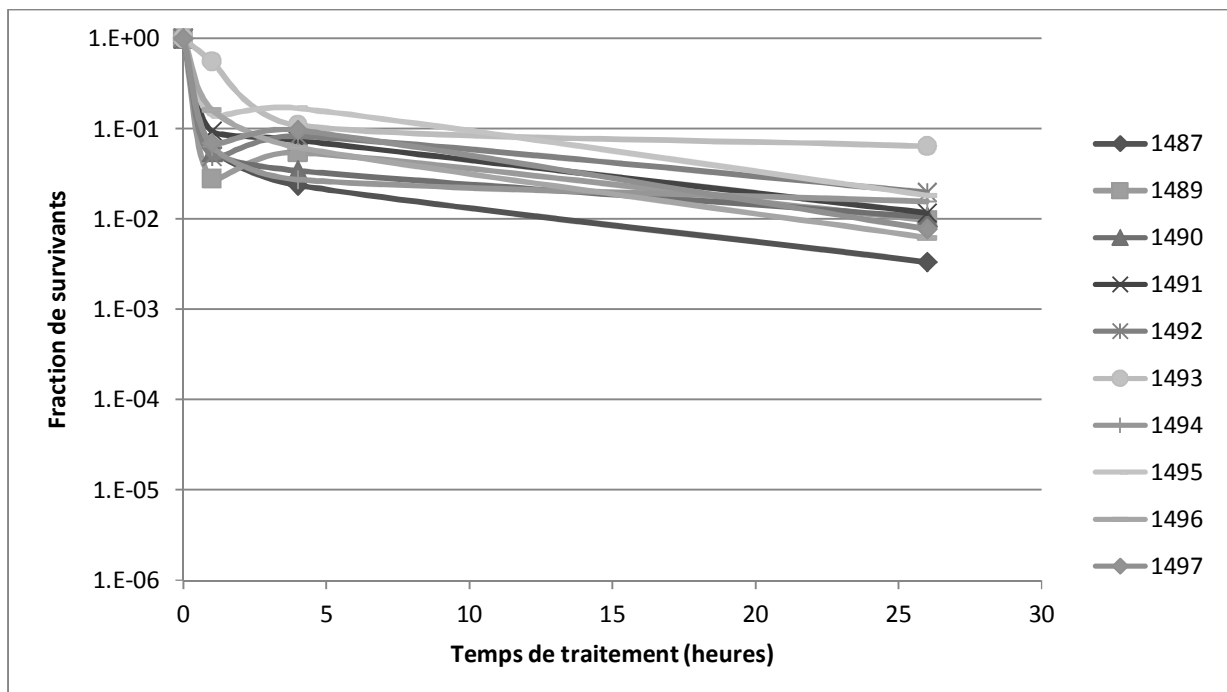


Figure 7.26 : Populations en phase stationnaire (à 24h de culture) traitées à 100 fois la CMI.

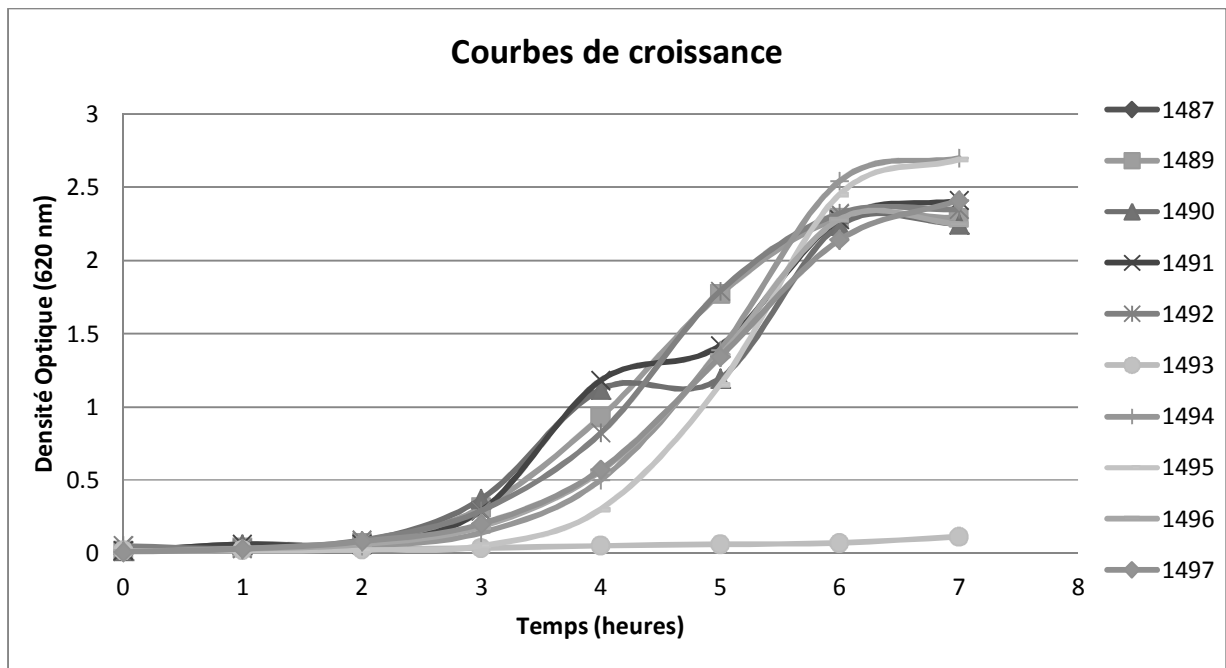


Figure 7.27 : Courbes de croissance en milieu M63B1 4g/L de glucose.

Table 7.3 : Correspondance entre les souches de *Klebsiella pneumoniae* de Blin *et al.*, (2017) et du LMGE.

	Blin <i>et al.</i> , (2017)	LMGE
Environnementales	SB617	CH1490
	SB615	CH1496
	SB612	CH1497
Isolées de patients sains	SB1139	CH1498
	SB1067	CH1491
	SB1170	CH1492
Isolées cliniquement et classées multi-résistantes	SB107 (MGH78578)	CH1486
	SB4551 (NSST258)	CH1488
	SB20 (04A025)	CH1495
Isolées cliniquement et classées hyper-virulentes	SB4454 (CG43)	CH1487
	SB3341 (CIP52145)	CH1493
	SB3928 (NTUH-K2044)	CH1494