



**HAL**  
open science

# Étude expérimentale d'un modèle de biofilm bactérien multi-espèces en vidéo-microscopie : cinétique de formation et interactions entre espèces

Amaury Monmeyran

## ► To cite this version:

Amaury Monmeyran. Étude expérimentale d'un modèle de biofilm bactérien multi-espèces en vidéo-microscopie : cinétique de formation et interactions entre espèces. Biophysique [physics.bio-ph]. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS242 . tel-02969525

**HAL Id: tel-02969525**

**<https://theses.hal.science/tel-02969525>**

Submitted on 16 Oct 2020

**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.

# Thèse de doctorat de Sorbonne Université

*Ecole doctorale 388 : Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris-Centre*

*Présentée par :*

Amaury Monmeyran

*Pour obtenir le grade de :*

Docteur de Sorbonne Université

## **Etude expérimentale d'un modèle de biofilm bactérien multi-espèces en vidéo-microscopie: Cinétique de formation et interactions entre espèces**

Thèse soutenue le 4 Novembre 2019 devant le jury composé de :

M. Stéphane Aymerich :	Examineur
M. Théodore Bouchez :	Examineur
M. Romain Briandet :	Rapporteur
M. Arnaud Gautier :	Examineur
Mme Nelly Henry :	Directrice de thèse
Mme Filipa Lopès :	Rapporteuse

Laboratoire Jean Perrin – UMR 8237



# Remerciements

Après ces plus de trois années passées au laboratoire Jean Perrin, il est venu maintenant le temps de présenter les résultats de mes recherches. Mais avant cela je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre.

Tout d'abord, je voudrais remercier ma directrice de thèse, Nelly Henry, qui m'a fait confiance pour travailler sur ce sujet passionnant, qui m'a tant appris aussi bien scientifiquement qu'en connaissances annexes de présentation, d'organisation et de rédaction. Je la remercie aussi pour sa patience, sa bienveillance et sa gentillesse tout au long de ma thèse. Merci aussi à Philippe Thomen et Maxime Deforet pour leurs conseils et discussions, ainsi que pour leurs encouragements. Merci à Arnaud Gautier pour sa collaboration et son aide sur la mise en place dans nos expériences de son système protéique fluorescent inductible FAST. Merci également à nos collaborateurs de l'INRA pour les moments d'échange que nous avons partagés et leur aide sur nos expériences faites dans le cadre d'une ANR nous regroupant : Stéphane Aymerich, Aurélie Baliarda, Mathieu Jules, Pierre Nicolas, Cyprien Guerin et Narimane Dahmane.

Je voudrais aussi remercier tous les collaborateurs du laboratoire Jean Perrin. Merci à Lydia Robert et Marina Elez pour leurs conseils en microbiologie et pour m'avoir aidé à améliorer ma soutenance de thèse. Merci à Franck Sureau et Sergei Kruglik pour leur éclairage portant sur l'optique. Merci à Anne-Florence Bitbol pour sa collaboration sur la partie théorique de nos expériences et pour nos discussions sur l'après thèse. Merci à Stéphanie Bonneau, Frédéric Joubert et Christine Vever-Bizet pour leur gentillesse et les conversations que nous avons eues. Merci aussi à Marie-Nicole Colonnelle, maintenant à la retraite, et Malika Pierrat pour le support administratif, qui m'ont permis d'économiser beaucoup de temps et d'être entièrement à ma recherche, ainsi que pour leur humanité. Merci aussi à Jean-Christophe Galas et André Estevez-Torres pour les discussions scientifiques toujours passionnantes. Merci à Thomas Panier et Raphaël Candelier pour leur aide à l'atelier et au niveau informatique. Et un grand merci pour Didier Chatenay, créateur du laboratoire et premier directeur, qui a su créer une ambiance de bonne humeur et d'émulation scientifique salvatrice, et à Georges Debrégeas, l'actuel directeur du laboratoire, pour avoir maintenu parfaitement cet environnement de travail épanouissant.

Un grand merci aussi aux précaires du laboratoire, aux autres thésards ainsi qu'aux post-doctorants, qui m'ont tous appris quelque chose de leur domaine d'expertise. Merci à Sophia Karpenko, Geoffrey Migault, Guillaume Le Goc, Benjamin Gallois, Hugo Trentesaux, Julie Lafaye, Natalia Belèn Beiza Canelo et Hippolite Moule pour leur éclairage sur le poisson zèbre et la bonne humeur de ce beau banc de thésards-zebrafish. Merci à Jean Ollion, pour sa passion de l'Amérique Latine communicative, à Georg Urtel, pour son humour germanique, à Marc Van Der Hofstadt



Serrano pour ses connaissances imposantes aussi bien scientifiques que sur l'escalade sur bloc, et à Aurore Woller, pour son calme et sa sérénité ainsi que pour nos débats sur l'histoire.

D'autre part, je voudrais écrire un immense merci aux précaires dont je suis le plus proche. Merci à Loïc Marrec, un breton rayonnant de bonne humeur toujours là pour rire et faire une pause, Laroslava Golovkova, la positivité incarnée, Anis Senoussi, pour ses trouvailles d'articles scientifiques incongrus et sa tempérance dans les débats et les moments critiques, Jean-Baptiste Thomazo, le plus ranger d'entre nous, et Wafa Ben Youssef, qui prend la suite du projet et qui j'en suis sûr fera des merveilles, ainsi qu'à ceux déjà partis : Florence Bansept, qui m'a fait renouer avec la musique classique, Alexandre Deloupy, à l'humour toujours bien dosé, et Manon Valet, avec qui parler me détendait et qui a toujours été prête pour prendre l'air dans un moment de stress.

Je voudrais maintenant remercier les personnes que j'ai rencontré avant la thèse. Merci d'une part à mes amis de master et de l'équipe iGEM 2015, Jean-Baptiste, Barthélémy, Sophie, Ewen, Mukit, Prateek, Emilie et Antoine, qui m'ont confirmé dans ma volonté de faire de la recherche et m'ont ouvert aux joies de la microbiologie et à l'humour caustique. D'autre part merci à Oscar, Aymeline, Valentin, Alice et François (parti trop tôt), pour les bons moments de danse, de rire et les discussions endiablées. Merci aussi à Jordana, Sonia, Valentine, Roxane, Marion, Alexia, Sarah, Rémy et Adrien pour leur soutien et leur amour en toutes circonstances. Et merci à Quentin et à Rémi, mes amis de toujours, des piliers fondamentaux dans ma vie depuis plus de 15 ans.

Je souhaiterai aussi remercier ma famille. Tout d'abord merci à mes parents, Danièle et Patrick, qui m'ont permis d'être ce que je suis aujourd'hui en m'entourant d'amour, en attisant ma curiosité et en m'ayant permis de choisir ma voie dans les meilleures conditions possibles. Merci à ma petite sœur Cassandra, qui est tellement plus que ça, toujours là pour moi et pour qui je serai toujours là aussi. Merci à mon frère Corentin qui a attisé dès le plus jeune âge mon amour de la mythologie, de l'histoire et des sciences.

Pour conclure cette partie de mon manuscrit, je voudrais remercier Caroline. Merci à toi d'être entrée dans ma vie au cours de ma thèse, de m'avoir donné tant de joie et de bonheur, et de m'avoir toujours soutenu dans les mauvais moments avec compréhension et amour. Un immense merci à toi d'illuminer mes jours comme personne avant toi.





# Table des matières :

Table des matières :	7
Résumé :	13
<b>I. Introduction</b>	<b>17</b>
<b>I.1. Généralités</b>	<b>19</b>
I.1.A. Une brève histoire de la microbiologie	19
I.1.B Les bactéries	20
I.1.B.1. Les bactéries, pilier de la biosphère	21
I.1.B.2. Quelques exemples de biofilms	22
I.1.B.2.a. Biofilms naturels	22
I.1.B.2.b. Biofilms et activité humaine	23
<b>I.2. La formation d'un biofilm</b>	<b>25</b>
I.2.A. Initiation d'un biofilm	26
I.2.B. La matrice extracellulaire	27
I.2.C. Les interactions inter-espèces	28
I.2.D. Hydrodynamique	31
<b>I.3. Approches méthodologiques de l'étude des biofilms</b>	<b>33</b>
I.3.A. Types de communauté étudiés	33
I.3.B. Microscopie optique et rapporteurs fluorescents	35
I.3.C. Cytométrie en flux	36
I.3.D. Les techniques -omiques	36
<b>II. Matériels et méthodes</b>	<b>39</b>
<b>II.1. Microbiologie</b>	<b>41</b>
II.1.A. Souches	41
II.1.A.1. Escherichia coli	41
II.1.A.2. Espèces de la communauté bactérienne	41

II.1.A.2.a. <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	41
II.1.A.2.b. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	42
II.1.A.2.c. <i>Kocuria salsicia</i> .....	42
II.1.A.2.d. <i>Rhodocyclus sp.</i> .....	42
II.1.A.2.e. Communauté 4-espèces en biofilm .....	44
II.1.B. Protéines fluorescentes .....	45
II.1.C. Milieux de culture .....	45
II.1.C.1. Pré-cultures d' <i>Escherichia coli</i> .....	45
II.1.C.2. Pré-cultures des membres de la communauté 4S .....	46
III.1.C.3. Préparations spécifiques des différentes expériences.....	46
II.1.C.3.a. Expérience biofilm .....	46
II.1.C.3.b. Expérience cytométrie.....	47
II.1.C.3.c. Expérience tecan.....	47
<b>II.2. Dispositif milli-fluidique</b> .....	<b>47</b>
<b>II.3. Microscopie optique</b> .....	<b>48</b>
II.3.A. Montage expérimental .....	48
II.3.A.1. Microscope.....	48
II.3.A.2. Imagerie .....	49
II.3.B. Analyse d'image .....	49
<b>II.4. Lecteur de plaque</b> .....	<b>52</b>
II.4.A. Appareillage .....	52
II.4.B. Analyse .....	53
<b>II.5. Cytométrie</b> .....	<b>53</b>
II.5.A. Principe de la cytométrie en flux.....	53
II.5.B. Appareillage et acquisition .....	54
II.5.C. Analyses de cytométrie en flux.....	55
II.5.C.1. Mise au point de l'analyse MACSQuant VYB.....	55
II.5.C.2. Mise au point de l'analyse FACS Calibur .....	57
<b>III. Résultats et interprétations</b> .....	<b>63</b>
<b>III.1. Rapporteurs génétiques fluorescents en biofilm</b>	

<b>bactérien. Introduction d'un nouveau rapporteur à fluorescence inductible : FAST.....</b>	<b>65</b>
III.1.A. Linéarité et distribution spatio-temporelle de la fluorescence de la GFP et représentativité avec la $\mu$ OD.....	66
III.1.B. Impact de la concentration hétérogène en O <sub>2</sub> sur la fluorescence de la GFP en biofilm .....	67
III.1.C. Comparaison FAST avec la GFP et la mCherry en contexte de biofilm croissant.....	69
<b>III.2. Etude cinétique du développement d'un biofilm quatre espèces sous flux.....</b>	<b>99</b>
III.2.A. L'origine du biofilm 4 espèces .....	99
III.2.B. Formation et développement d'un biofilm 4 espèces en flux.....	101
III.2.C. Etude des marqueurs quantitatifs du biofilm 4S .....	107
III.2.C.1 Protéines fluorescentes : Limitations en biofilm 4S.....	108
.....	110
III.2.C.2 Quantification des signaux de fluorescence .....	110
III.2.C.3 Le coefficient de corrélation et la dynamique spatiale au sein du biofilm. ....	113
III.2.D Structure et dynamique de la formation du biofilm 4S.....	115
III.2.D.1 Comportements individuels en contexte 4S.....	115
☐ <b><i>Bacillus thuringiensis</i></b> .....	116
a) Cinétique de croissance .....	116
b) Distribution spatiale .....	119
c) Dynamique spatiale .....	122
☐ <b><i>Pseudomonas fluorescens</i></b> .....	123
a) Cinétique de croissance .....	123
b) Distribution spatiale .....	126
c) Dynamique spatiale .....	128
☐ <b><i>Kocuria salsicia</i></b> .....	130
☐ <b><i>Rhodocyclus sp.</i></b> .....	132
III.2.D.2 Composition de l'état stationnaire .....	132
III.2.D.3 Phases individuelles versus phases collectives .....	135
III.2.E Conclusion .....	137

<b>III.3. Les différents mélanges de biofilm : analyse combinatoire</b> .....	139
III.3.A. Les associations de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	139
III.3.B. Les cas complémentaires contenant <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	143
III.3.C. Les cas particuliers de <i>Kocuria salsicia</i> et/ou <i>Rhodocyclus sp.</i> .....	146
III.3.C.1. <i>Kocuria salsicia</i> .....	147
III.3.C.2. <i>Rhodocyclus sp.</i> .....	149
III.3.C.3. Biofilm 2S <i>Kocuria salsicia</i> et <i>Rhodocyclus sp.</i> .....	150
III.3.D. Conclusion .....	151
<b>IV. Conclusions et perspectives</b> .....	155
<b>IV.1. Conclusions</b> .....	157
<b>IV.2. Perspectives</b> .....	159
<b>Bibliographie :</b> .....	163
<b>ANNEXES</b> .....	179
Annexe A : Plasmides.....	180
Annexe B : Composition des milieux de culture .....	182
Annexe C : Configuration des cytomètres .....	183
Annexe D : Temps de doublement des populations en condition de cultures planctoniques en Mb à 30°C .....	185
Annexe E : Data biofilms 4S complètes.....	187







# Résumé :

Le mode de vie des bactéries dans le milieu naturel suit un cycle passant d'un style de vie planctonique, où les cellules sont séparées les unes des autres, à un style de vie en communautés multi-espèces adhérentes, aussi appelées biofilms. Le style de vie planctonique a toujours été le plus étudié en microbiologie, or il s'avère que le style de vie en biofilm est fondamental pour les bactéries. En effet, les biofilms apparaissent comme des lieux à fortes interactions entre espèces, protégeant et permettant un grand développement des cellules le composant. Depuis une trentaine d'années, les biofilms font l'objet de recherches de plus en plus poussées, grâce à l'évolution des techniques et des méthodes qui y sont dédiées, augmentant d'autant notre compréhension du cycle de vie des bactéries.

Pendant mon travail de thèse, je me suis intéressé à caractériser le développement d'un biofilm multi-espèces en canaux milli-fluidiques sous flux constant de milieu nutritif. J'ai tout d'abord mis au point l'utilisation d'un nouveau rapporteur fluorescent sur un biofilm mono-espèce d'*Escherichia coli*, précédemment bien caractérisé. J'ai montré les limites des rapporteurs classiques de type GFP sur le système et introduit la protéine FAST à fluorescence inductible pour dépasser ces limites.

Armé de ce nouvel outil, j'ai ensuite étudié la formation d'un biofilm multi-espèces (à 4 espèces), issu d'un biofilm naturel adapté au laboratoire, constitué de *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.* J'ai caractérisé le développement de cette communauté adhérente par vidéo-microscopie de lumière transmise et de fluorescence, en mesurant en temps-réel les cinétiques de développement de la biomasse globale et des espèces fluorescentes au sein de la communauté. J'ai ainsi pu mettre en évidence une succession de phases de croissance et de récession du biofilm, puis l'établissement d'état stationnaire après 30h de croissance, démontrant la formation d'une communauté stable. J'ai également trouvé que *Pseudomonas fluorescens*, numériquement l'espèce dominante de cette communauté, opère après quelque heure un changement de niche lui donnant probablement un avantage important. Ces résultats m'ont amené à formuler l'hypothèse que le mécanisme de formation de cette communauté adhérente est largement gouvernée par l'équilibre de l'O<sub>2</sub> dans le système.

Enfin, j'ai étudié les différentes combinaisons pouvant être formées (15 combinaisons possibles) par les membres de la communauté à la recherche d'interactions existantes entre les bactéries. J'ai pu ainsi montrer l'existence d'interactions de compétition entre *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus thuringiensis*, la relation de parasitisme de ce dernier sur *Kocuria salsicia*, ainsi que celle d'amensalisme de *Pseudomonas fluorescens* sur *Kocuria salsicia*. Nous avons aussi déterminé que *Rhodocyclus sp.* se développe de manière neutre vis-à-vis des autres espèces. Nos résultats suggèrent que ces interactions s'établissent principalement sur la base d'interactions physiques et de régulations physico-chimiques.

La caractérisation de ce biofilm multi-espèces, et des interactions s'y établissant, offre un système d'étude de ces communautés complexes bien contrôlé où de nouvelles questions telles que celle de la résilience du biofilm à des perturbations chimiques, physiques et biologiques, pourront être abordées.





# **I. Introduction**



# I.1. Généralités

## I.1.A. Une brève histoire de la microbiologie

Durant une longue période, l'existence même des micro-organismes fut ignorée de l'Humanité. Les premières suppositions de l'existence de microbes furent avancées au XVI<sup>ème</sup> siècle et portées par Girolamo Fracastoro (1483-1553), mais sans preuves concrètes. Il fallut attendre pour les “découvrir” la mise au point d'outils optiques performants dus à l'ingéniosité de plusieurs hommes de sciences. Ces observations commencèrent dans la deuxième moitié du XVII<sup>ème</sup> siècle et furent effectuées la première fois par Antoni Van Leeuwenhoek (1632-1723), un prospère drapier danois et scientifique autodidacte (Meunier et al., 2016). Robert Hooke (1635-1703) confirma ces observations (Howard, 2005), et la Royal Society britannique puis l'Académie des sciences française les adoptèrent. Ces observations mirent à bas les théories qui étaient alors communément admises sur la génération spontanée des organismes soutenues par William Harvey (1578-1657) ou Reinier de Graaf (1641-1673), et combattues par Francesco Redi (1626-1697) et Jan Swammerdam (1637-1680) à propos des insectes et *a fortiori* du vivant dans sa globalité.

Cependant, il fallut attendre le XVIII<sup>ème</sup> siècle pour qu'une terminologie moderne apparaisse avec le mot « bactérie » par Christian Gottfried Ehrenberg (1795-1876), qui entreprit une étude et une description systématique des micro-organismes (EHRENBERG, 1838), et le mot « germe » par Jakob Henle (1809-1885) pour parler des micro-organismes pathogènes . Le développement des techniques de ce siècle permit le premier essor de la microbiologie en tant que science à part entière. Ainsi, Louis Pasteur (1822-1895) démontre que les « levures lactiques », maintenant connues comme lactobacilles, étaient capables de fermentation, et que certains micro-organismes pouvaient se développer sans apport d'oxygène. Il les définit comme « anaérobies ». Il développa à cette occasion les « cultures pures » développant grandement les possibilités d'études des micro-organismes. Il mit au point plus tard les premières vaccinations qui furent une grande avancée pour la santé publique, bien que ne comprenant pas l'ensemble des mécanismes exacts de la vaccination (Meunier et al., 2016). En parallèle des travaux de Louis Pasteur, Robert Koch (1843-1910) participe à mettre au point la compréhension des différents cycles de vie des bactéries et met en place des moyens de coloration et de culture pour les bactéries. Il développe aussi « Les postulats de Koch » permettant de lier une maladie à un germe spécifique (Carter, 1985; Meunier et al., 2016). D'autres parts, des travaux de la communauté scientifique apparaissent aussi pour mettre en évidence les liens bénéfiques des bactéries avec le vivant, comme les interactions entre différentes souches bactériennes pour se développer plus



vite mises en avant par Sergei Winograsky (1856-1953), ou comme le système symbiotique bactérie-plante démontré par Martinus Beijerinck (1851-1931). Ces travaux ouvrirent la voie à l'écologie microbienne. C'est aussi à cette époque, que Martinus Beijerinck a démontré l'existence de germes plus petits que les bactéries, les virus (Lustig & Levine, 1992).

La microbiologie est née, sur la base des études des maladies infectieuses, et surtout bactériennes. Mais ces recherches, précédemment exposées, étaient empiriques et basées quasiment exclusivement sur l'observation. Il faudra attendre le développement de la biochimie et la découverte dans les années 1950 de l'ADN par James Watson (1928-), Francis Crick (1916-2004) et Rosalind Franklin (1920-1958) (Franklin & Gosling, 1953a, 1953b; Watson & Crick, 1953), suivie par la naissance de la biologie moléculaire pour qu'émerge une nouvelle période dans la compréhension des mécanismes des systèmes microbiens (Meunier et al., 2016). La biologie moléculaire ainsi que la biochimie permirent de caractériser pleinement les différents métabolismes et leurs différentes voies de régulation, aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes, puis de perfectionner les méthodes d'étude sur des souches modèles de laboratoire. Cette caractérisation des métabolismes des micro-organismes montra l'ampleur de la diversité du vivant. Dans les années 1970, Carl Woese (1928-2012) et George E. Fox (1945-) se basant sur l'analyse génétique et les observations phénotypiques décrivent alors le vivant, non plus séparé entre procaryotes et eucaryotes, mais en trois domaines : Bacteria, Eukarya et Archaea (Woese & Fox, 1977).

Au début des années 1990, certains microbiologistes recommencèrent à s'intéresser aux développements plus naturels des micro-organismes, passant des cultures liquides optimisées aux cultures aux interfaces air-liquide et solide-liquide, ainsi qu'en passant d'études mono-espèces à des études de communautés multi-espèces, plus représentatives des conditions de croissance naturelle. Comme le disait Carl Woese en 2005 :

« I see the question of biological organization taking two prominent directions today. The first is the evolution of (proteinaceous) cellular organization, [...]

The second major direction involves the nature of the global ecosystem. This is both a very practical and a very basic problem, involving biological organization on a level over and above the cellular/organismal. Bacteria are the major organisms on this planet — in numbers, in total mass, in importance to the global balances. Thus, it is microbial ecology that matters most [...] and it is microbial ecology that is most in need of development, both in terms of facts needed to understand it, and in terms of the framework in which to interpret them. ». (Woese, 2005)

## I.1.B Les bactéries

## I.1.B.1. Les bactéries, pilier de la biosphère

De nos jours, les bactéries appartiennent à l'un des trois grands domaines du vivant : les Eubacteria. Ce sont des cellules uniques sans noyaux dont la taille varie grandement d'une espèce à l'autre, mais qui est en général comprise entre 0.5µm et 5µm. Les estimations les plus récentes évaluent que les bactéries représentent près de 95 % de la biomasse totale de la biosphère terrestre (Hans Curt Flemming & Wuertz, 2019; Muller & Nebe-von-Caron, 2010; Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998). Les bactéries sont des espèces clés dans la biosphère, et pas seulement en considérant leur quantité. Il apparaît que les bactéries sont une pierre angulaire du cycle du carbone (Crapart et al., 2007; Goffredi, Warén, Orphan, Van Dover, & Vrijenhoek, 2004; Hügler, Wirsén, Fuchs, Taylor, & Sievert, 2005; Takai et al., 2005) car elles participent grandement dans les océans à la fixation du carbone dans des structures les entourant, et formant des concrétions macroscopiques (Bosak, Greene, & Newman, 2007; Walker, Spear, & Pace, 2005). Elles jouent aussi un rôle important dans l'oxygénation des océans et de l'atmosphère de notre planète. En effet, les bactéries ont été les premiers organismes à effectuer de la photosynthèse enrichissant et augmentant la concentration en dioxygène de la surface terrestre (Martin, Bryant, & Beatty, 2018; Robert E. Blankenship and Martin F. Hohmann-Marriott, 2011; Woodward W. Fischer, James Hemp, 2016; Xiong & Bauer, 2002). De plus, il semblerait aussi que les bactéries jouent un rôle dans le cycle de l'eau, via les bactéries stratosphériques se développant en altitude dans les nuages. En effet, ces bactéries sécrètent des protéines qui changent la microtension de surface de l'eau, augmentant la cohésion des gouttes d'eau qui forment les nuages (Amato et al., 2015; Bauer et al., 2003; DeLeon-Rodriguez et al., 2013; O. Möhler, P. J. DeMott, G. Vali, 2007).

L'étude des bactéries semble donc primordiale à la bonne compréhension de notre planète. Mais comment se développent-elles ? Elles le font de deux façons. La première est la croissance en condition planctonique, c'est à dire en milieu liquide, généralement à l'état de cellules uniques cohabitant dans un même environnement. Cette première voie de développement est la plus étudiée depuis le début de la microbiologie moderne, car elle permet de contrôler aisément la composition du milieu dans lequel les bactéries croissent, de bien sélectionner les espèces, de les faire pousser de manière optimisée et reproductible. Mais cette façon de se développer ne semble représenter qu'une petite partie du cycle de vie des bactéries (L Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004; Kolter & Greenberg, 2006), et non celle privilégiée pour la croissance, dans la nature, mais plutôt celle de la recherche d'un milieu adéquat à la prolifération.

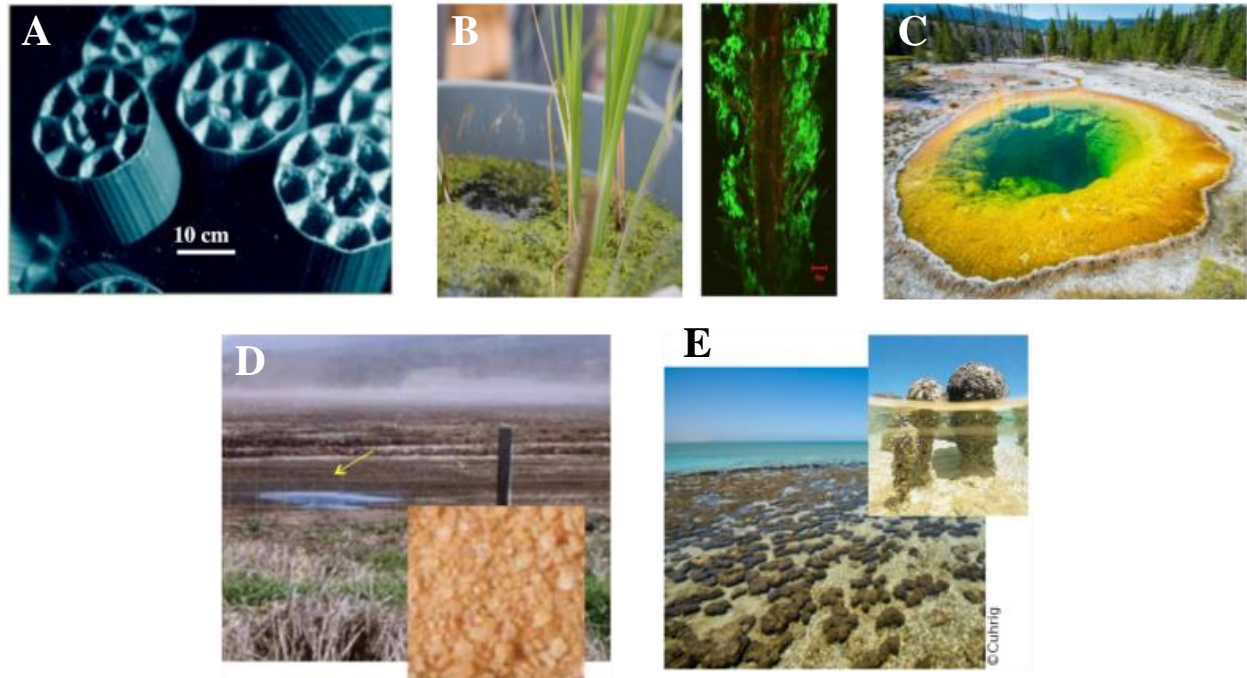
Le second mode de développement, qui semble majoritaire pour les bactéries, est la croissance en communauté aux interfaces — air-liquide, solide-air ou solide-liquide. Ces communautés sont appelées '*Biofilms*'. Ce second mode de prolifération est, dans la nature, largement multi-espèces, mêlant bien souvent plusieurs bactéries, archées et/ou eucaryotes, et

créant une grande complexité des écosystèmes, où émergent interactions, interdépendances et compétitions.

## I.1.B.2. Quelques exemples de biofilms

### I.1.B.2.a. Biofilms naturels

Les biofilms sont présents dans toutes les niches de la biosphère. Des océans aux nuages, des rochers aux organismes pluricellulaires aussi bien végétal et animal que fongique (Hans Curt Flemming & Wuertz, 2019). La première niche d'importance où ils se sont développés est les océans (Guillonnet, Baraquet, Bazire, & Molmeret, 2018). On trouve aujourd'hui des biofilms sur les planchers océaniques, principalement au niveau des fumerolles des dorsales océaniques (Crapart et al., 2007; Goffredi et al., 2004) et près des côtes, mais aussi sur les premiers mètres sous la surface des eaux sous forme de tapis plus ou moins épais. Une deuxième grande niche où se forment les biofilms est constituée par le sol qu'ils enrichissent en biodégradant les autres organismes (Friedman, Higgins, & Gore, 2017; Raghupathi et al., 2018). La troisième grande niche est liée aux autres êtres vivants. Ainsi, on trouve des biofilms se développant sur les plantes (Antoun, 2013; Niu, Paulson, Zheng, & Kolter, 2017; Pérez-Montaña et al., 2014; Rinaudi & Giordano, 2010), ces biofilms font partie de ce que l'on appelle leur microbiome (communauté de micro-organismes se développant dans un très proche voisinage de la surface des eucaryotes multicellulaires). Ces microbiomes sont en symbiose avec leur hôte et possèdent une action de protection contre les micro-organismes infectieux, de promotion de la croissance par synthèse d'hormones et augmentent la biocompatibilité des minéraux présents dans le sol. Ces bénéfices sont promulgués contre la mise à disposition de nutriments que relarguent les plantes via leur surface. Outre les microbiomes des plantes, il en existe aussi liés aux animaux. Cependant, pour les animaux, en plus des communautés se développant sur leur surface, il y a aussi des biofilms se développant en leur sein et qui forment la majorité des biofilms inter-réagissant avec eux. Ces microbiotes symbiotiques sont essentiellement liés au trafic intestinal. Ainsi, on en retrouve dans les cavités bucco-dentaires (Amarasinghe, Scannapieco, & Haase, 2009; Paster, Olsen, Aas, & Dewhirst, 2006; Peyyala, Kirakodu, Ebersole, & Novak, 2011; Alexander H. Rickard, Gilbert, High, Kolenbrander, & Handley, 2003) et dans les intestins (Lu et al., 2019; Parshukov et al., 2019; Patterson et al., 2014; Sarmiento et al., 2019). Ces communautés bactériennes ont un rôle prépondérant dans la dégradation des aliments et leur assimilation, et synthétisent certains des nutriments essentiels au bon fonctionnement de l'organisme.

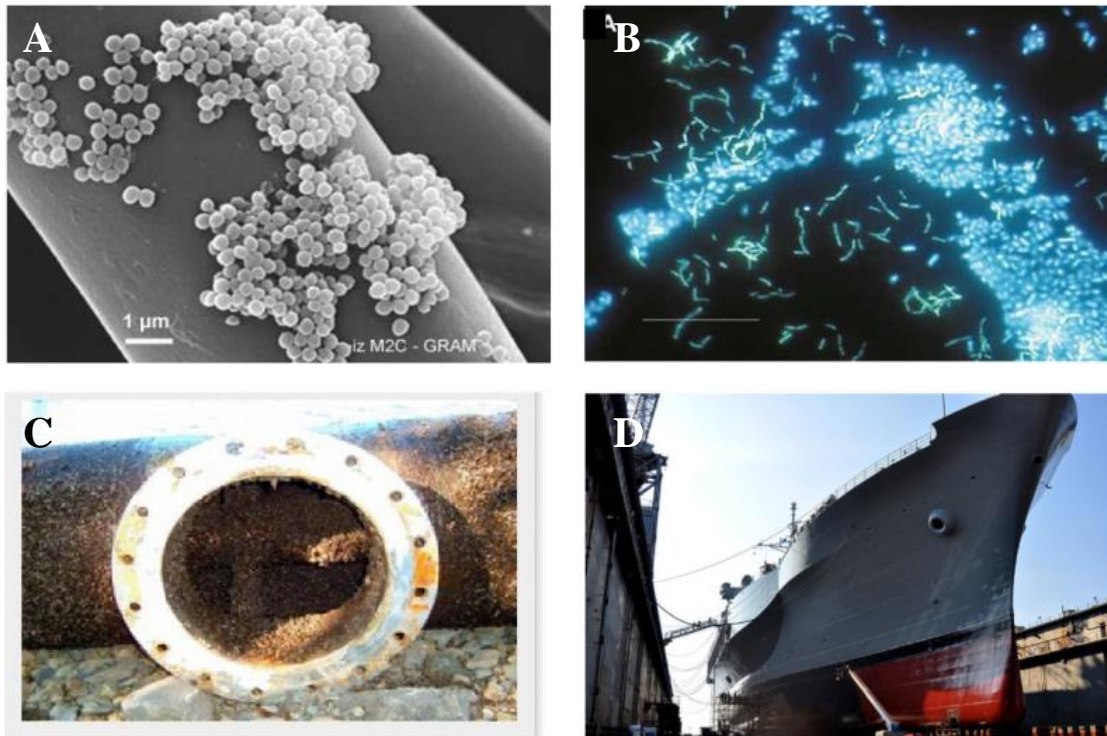


**Fig. 1.1 : Exemples de biofilms naturels.** A) Système de traitement d'eaux usées (Biofilm Carrier Lotus™ AquaCELL™) ; B) Microbiome à la surface de racines d'*Arabidopsis thaliana* ; C) Biofilm extremophile, Parc National de Yellowstone (USA) ; D) Biofilms du sol, dégradant la matière organique ; E) Stromatolithes aquatiques, Shark Bay (Australie).

## I.1.B.2.b. Biofilms et activité humaine

Les biofilms se développent donc partout, et se sont adaptés pour se développer sur les produits de l'Humanité. Ainsi, il apparaît que des biofilms utilisent les surfaces des déchets que nous rejetons dans les mers pour se développer et proliférer plus facilement. Cela est aussi vrai pour les surfaces des structures côtières immergées telle que les pontons et les ports, ainsi que pour les coques des navires (Characklis & James D. Bryers, 1981; Costerton, 1990). Ces biofilms dégradent ces surfaces au cours du temps, digérant les structures en bois, accélérant la corrosion des structures métalliques et altérant l'hydrodynamisme des navires. Tous ces effets impliquent un coût important en entretien pour y remédier. De la même manière, les bâtiments terrestres sont aussi touchés. Mais cela devient plus problématique lorsque des biofilms se forment à des interfaces devant être stériles. Ainsi, les industries agro-alimentaires et pharmaceutiques (Declerck et al., 2009) sont particulièrement sensibles au développement de ces communautés dans leurs usines. De forts coûts financiers pour les nettoyer en cas de contamination peuvent être engagés, et parfois il peut y avoir des coûts en vie humaine. Enfin, le dernier domaine

spécifique à être impacté par leur présence, et probablement là où ils sont les plus nocifs, est le domaine médical (Costerton, Stewart, & Greenberg, 1999; Sansonetti, n.d.). Dans ces environnements, des biofilms de bactéries pathogènes peuvent se maintenir et proliférer, ainsi que développer des résistances ou des tolérances aux antibiotiques utilisés contre eux pour soigner les patients. Les biofilms peuvent aussi se former malgré tous les efforts de stérilisation sur des prothèses, et mener à de sévères complications post-implantations.



**Fig. 1.2 : Exemples de biofilms impactant l'Humanité.** A) Contamination sur une surface d'implant médical (ici, une prothèse cardiaque, image en microscopie électronique de Dr L. Bénard, laboratoire GRAM EA 2656) ; B) Contamination d'un circuit agro-alimentaire (image en microscopie optique de fluorescence d'un biofilm se développant sur de l'inox, Murga et Donlan 2002) ; C) Encrassement des infrastructures immergées ; D) Bio-revêtement des navires attaquant la coque nécessitant de grand moyen d'entretien (l'US Navy dépense 1 milliard de dollars par an dans cette optique).

Cependant, il existe aussi des applications bénéfiques aux biofilms. Ainsi, les traitements de certains déchets par ces communautés (Madden, Chinalia, Enright, Collins, & O'Flaherty, 2010; Poirier, Madigou, Bouchez, & Chapleur, 2017; Soren Moller, Anne R. Pedersen, Lars K. Poulsen, Erik Arvin, 1996), en plus de produire de la matière hautement fertile, permettent de produire des gaz pouvant servir aux industries et aux chauffages domestiques. De plus, le développement de technologie utilisant les bactéries pour synthétiser des molécules d'intérêts médicaux et agro-alimentaires est devenu d'une grande importance dans nos sociétés.

## I.2. La formation d'un biofilm

Les biofilms sont donc d'une importance capitale pour notre biosphère, aussi bien en termes de masse de cette biosphère que d'impact sur celle-ci. Mais qu'est-ce qu'un biofilm exactement ? Un biofilm est une communauté composée d'un ou de plusieurs micro-organismes se développant à une interface dans une matrice protectrice sécrétée par ces mêmes micro-organismes maintenant la cohésion de la communauté (Hans Curt Flemming, Neu, & Wozniak, 2007). La compréhension de leur formation et de leur structure est primordiale pour appréhender pleinement ces communautés. Ainsi, nous pouvons nous poser plusieurs questions telles que : Comment s'initie un biofilm ? Quelles sont les éléments structurant un biofilm ? Quelles sont les interactions entre les cellules du biofilm, et avec la surface ? L'environnement dans lequel il se forme l'impacte-t-il, autant d'un point de vue structurel que de la façon qu'il a de se développer ? Quel est le cycle de vie « classique » d'une telle communauté ?



**Fig. I.3 : Introduction au cycle de vie d'un biofilm.** 1) Des bactéries en suspension dans un milieu rencontrent une surface immergée et peuvent s'y fixer en quelques minutes. Ils commencent à produire des substances polymères extracellulaires gluantes (EPS) et à coloniser la surface. 2) La production d'EPS permet à la communauté de biofilms de développer une structure tridimensionnelle complexe qui est influencée par divers facteurs environnementaux. 3) Les biofilms peuvent se propager par détachement de petits ou gros flocons de cellules ou par un type de dispersion dit « essaimage » qui libère des cellules individuelles. Ces types de détachements permettent aux bactéries de se lier à une surface ou à un biofilm en aval de la communauté d'origine. ([http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what\\_are\\_biofilms.html](http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html))



## I.2.A. Initiation d'un biofilm

La première étape de la formation d'un biofilm est qu'au moins une cellule adhère à une surface (Berne, Ellison, Ducret, & Brun, 2018). Pour ce faire, les bactéries doivent passer d'un état planctonique, motile ou non, à un état sédentaire. Il a été démontré qu'il existe plusieurs stratégies chez les bactéries pour effectuer cette transition de mode de vie. La principale retrouvée dans de nombreux phylums bactériens est l'utilisation de mécano-senseurs qui, lorsqu'ils rencontrent une surface solide inerte (ou biologique), enclenchent une cascade de réactions moléculaires ayant pour but l'arrêt de la motilité et la fixation à la surface rencontrée (Belas, 2014). Deux familles de mécano-senseurs existent. La première est principalement liée aux flagelles dont se servent certaines bactéries pour se mouvoir. Lorsqu'une bactérie se rapproche d'une surface, les flagelles (dépendant de l'espèce, il peut y en avoir plusieurs) éprouvent les différences dans l'hydrodynamique du milieu dans lequel elles se meuvent (Utada et al., 2014). De plus, en se rapprochant de la surface, les flagelles peuvent la heurter, et la résistance qui lui est opposée réprime l'activité du ou des flagelles (Belas, 2014). La seconde famille de mécano-senseurs est représentée par les différents pili se trouvant à la surface des bactéries. En faible nombre lors de la phase motile d'une bactérie (O'Toole & Kolter, 1998), ils se multiplient sur la membrane ou la paroi cellulaire en cas de contact avec une surface et répriment l'activité flagellaire. Ces pili, dont le plus étudié est appelé TFP (pour « Type IV pilus »), accrochent la cellule à la surface (O'Toole & Wong, 2016). Il a été montré que ces pili particuliers permettent à la cellule de se déplacer tout en restant attachée à la surface (Maier & Wong, 2015) et tout en réprimant les flagelles et la motilité cellulaire attenante (Burrows, 2012). Il existe différents types de déplacement de surface utilisant les TFP. Le premier dit de « twitching » permet un déplacement sur de longues distances tandis que la cellule est orientée parallèlement à la surface. Ils peuvent également induire une « marche » cellulaire, dans laquelle le microbe se tient verticalement par rapport à la surface et semble explorer la surface locale (Gibiansky et al., 2010). Ce dernier type de déplacement est propice à un détachement des bactéries pour un retour à la motilité (Conrad et al., 2011). Ces deux déplacements permettent probablement à la cellule de « choisir » le meilleur endroit où se fixer à plus long terme, comme par exemple : (i) plus proche d'autres bactéries pour profiter de leur présence, (ii) en fonction de l'exposition à des facteurs du milieu contraignants (comme l'hydrodynamique ou le pH), ou (iii) favorables (comme une concentration locale importante de nutriments ou la présence d'adhésine), choisissant de s'éloigner des zones de milieux contraignants et de se rapprocher des zones favorables (Zhao et al., 2013). Tout le long de ces processus de contact avec la surface et d'exploration de cette surface, la cellule peut cependant retourner à un état motile. Une fois ces déplacements terminés, et la cellule sédentarisée, elle continue de faire proliférer ces pili ce qui active la synthèse de molécules intracellulaires comme l'AMPc (A Persat, Inclan, Engel, Stone, & Gitai, 2015) et le cyclic-di-GMP (Almblad et al., 2015b, 2015a; Kuchma et al., 2010). Ces deux molécules finissant de réprimer l'activité flagellaire et promeuvent la production des composés de la matrice

extracellulaire, finissant ainsi l'installation de la bactérie à la surface et commençant son développement en biofilm. Cependant, ces molécules ne sont pas les seules impliquées, et toute une cascade de régulation entre en jeu rendant très complexe, encore aujourd'hui, la compréhension de l'engagement d'un biofilm par une cellule unique. De plus, chaque espèce de bactéries possède des variantes plus ou moins marquées de ces systèmes développés durant son évolution. Tout cela rend la phase d'initiation difficilement généralisable.

## I.2.B. La matrice extracellulaire

Dans la plupart des biofilms matures, les micro-organismes en tant que tels représentent entre 10% et 50% de la masse, tandis que la matrice en représenterait entre 50% et 90% (H C Flemming & Wingender, 2010; Frolund, Palmgren, Keiding, & Nielsen, 1996). Cette matrice, sécrétée par les micro-organismes, consiste en une agglomération de différents types de biopolymères (homo- et hétéro-polysaccharides, protéines, ADN) - connus sous le nom de substances polymériques extracellulaires (EPS, pour « extracellular polymeric substances » en anglais) - qui forment le support de l'architecture tridimensionnelle du biofilm. La formation d'un biofilm permet un mode de vie totalement différent de l'état planctonique, et plusieurs fonctions de l'EPS, qui ont été mises en évidence, démontrent de nombreux avantages pour ce mode de développement pour les cellules (Donlan, 2002; H C Flemming & Wingender, 2010).

Ainsi les EPS de la matrice extracellulaire des biofilms sont responsables du maintien de leur adhérence aux surfaces et de leur cohésion. Les EPS immobilisent les cellules du biofilm dans la matrice extracellulaire et les maintiennent à proximité les unes des autres (Sutherland, 2001). Cela permet aux cellules de faciliter de possibles interactions entre elles (Lee et al., 2014), telles que la communication cellule à cellule et la formation de micro-consortia synergiques (Karatan & Watnick, 2009). En raison de la rétention des enzymes extracellulaires, un système « digestif » externe polyvalent est généré, permettant une plus grande captation des nutriments d'intérêt contenus dans la phase aqueuse (Wingender & Jaeger, 2003). La matrice sert également de centre de recyclage en gardant tous les composants des cellules précédemment lysées. Les EPS peuvent aussi servir de source de nutriments, en cas de pénurie de sources de carbone et d'azote. Cependant, certains de leurs composants ne sont que lentement métabolisables en raison de leur complexité et donc de la grande quantité d'enzymes nécessaire pour y parvenir. De plus, la matrice extracellulaire protège les micro-organismes s'y logeant contre la déshydratation, contre les biocides et antibiotiques (Anderson & O'Toole, 2008; Stewart & Costerton, 2001), mais aussi contre les rayonnements ultraviolets, ou encore contre la prédation de certains protozoaires dans la nature (Raghupathi et al., 2018) ou bien contre les défenses immunitaires d'un hôte que la population infecte (Ciofu, Tolker-Nielsen, Jensen, Wang, & Høiby, 2015; Luanne Hall-Stoodley, 2004). Sur le plan écologique, la concurrence et la coopération dans l'espace confiné de la matrice



d'EPS conduisent à une adaptation constante des propriétés physiques et chimiques de la communauté (Decho & Gutierrez, 2017; Xavier & Foster, 2007).

Les substances composant la matrice peuvent varier considérablement entre les biofilms, en fonction des micro-organismes qui les composent et de l'environnement où le biofilm se forme changeant en fonction du flux, de la température et de la disponibilité des nutriments (Kumar Singha, 2013). Les EPS initialement dénommées « polysaccharides extracellulaires », ont été renommées car il est devenu évident que la matrice contient également des protéines, des acides nucléiques, des lipides et d'autres biopolymères tels que des substances humiques (Costa, Raaijmakers, & Kuramae, 2018; Decho & Gutierrez, 2017; Frolund et al., 1996; Sutherland, 2001). Globalement, les EPS représentent une fraction dominante du réservoir de carbone réduit dans les sols et les sédiments, ainsi que des agrégats en suspension dans les océans et les eaux douces. Dans ces zones, ils servent de nutriments pour les micro-organismes et jouent donc un rôle important dans l'écologie microbienne (Decho, 1990; Decho, Visscher, & Reid, 2005).

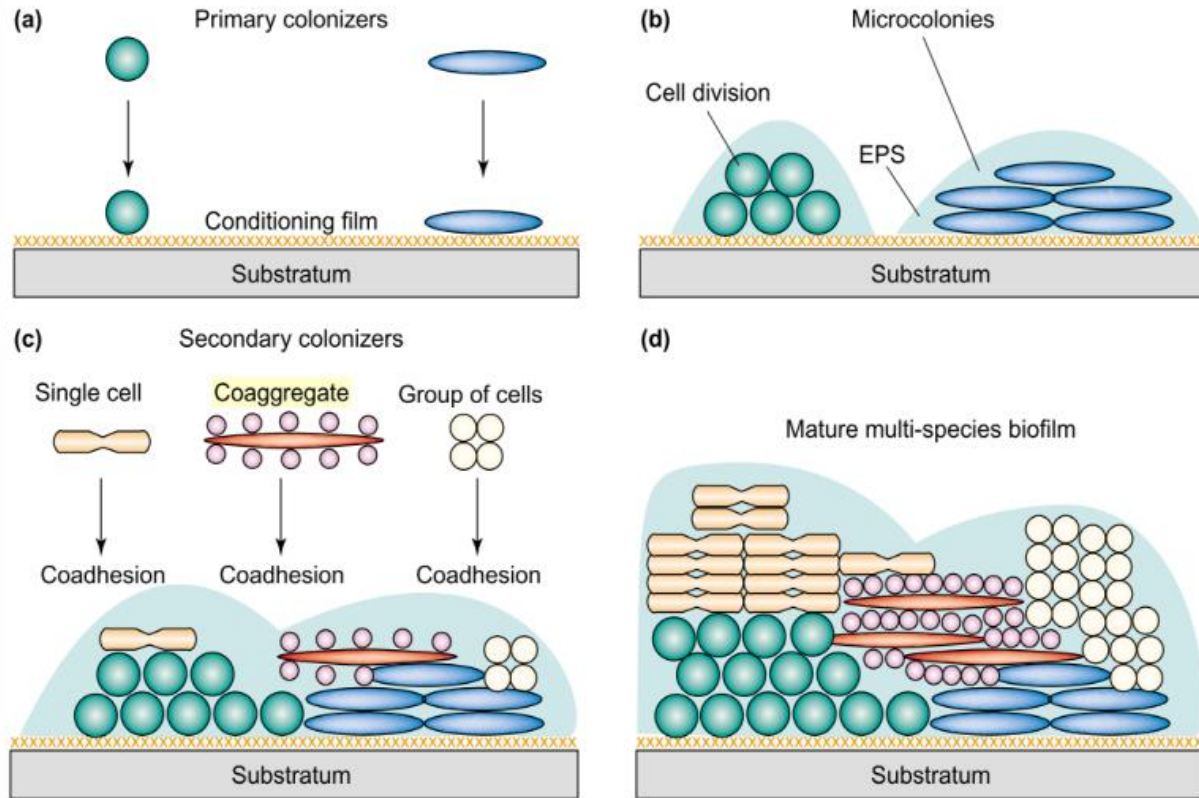
## I.2.C. Les interactions inter-espèces

Dans la nature, les biofilms sont composés de levures, de micro-algues, d'archées, et/ou d'espèces très différentes de bactéries. Cette hétérogénéité génétique des cellules composant un biofilm est très grande aussi bien en nombre d'espèces différentes, qu'en effets possibles que cette diversité d'espèce peut avoir sur la population. On peut ainsi observer de multiples interactions inter-espèces, dont la complexité augmente grandement avec le nombre d'espèces présentes dans la communauté (Ren, Madsen, Sorensen, & Burmølle, 2015; Tan, Lee, Burmølle, Kjelleberg, & Rice, 2017).

Une partie des interactions est liée aux propriétés adhésives des cellules elles-mêmes et de leur matrice extracellulaire. Ainsi, des bactéries ne synthétisant pas de matrice extracellulaire, ou des bactéries en produisant une faiblement adhésive ou peu coercitive, peuvent se fixer à une communauté microbienne déjà en place et bénéficier des avantages de ce mode de vie tout en contribuant à sa diversification et à son adaptabilité (Alexander H. Rickard et al., 2003).

Cette co-agrégation permet l'émergence d'un deuxième groupe d'interactions liées à l'assimilation des nutriments du milieu. Des complémentarités métaboliques bénéfiques peuvent apparaître entre différentes espèces, rendant plus efficace l'assimilation de composés présents dans l'environnement du biofilm (Burmølle, Ren, Bjarnsholt, & Sørensen, 2014). Deux principales interactions nutritives ont été mises à jour. La première est la mise en commun d'enzymes de digestion dans la matrice extracellulaire du biofilm de manière altruiste, permettant à tous les membres de la communauté d'en profiter. La seconde se rapproche plus du recyclage : une cellule

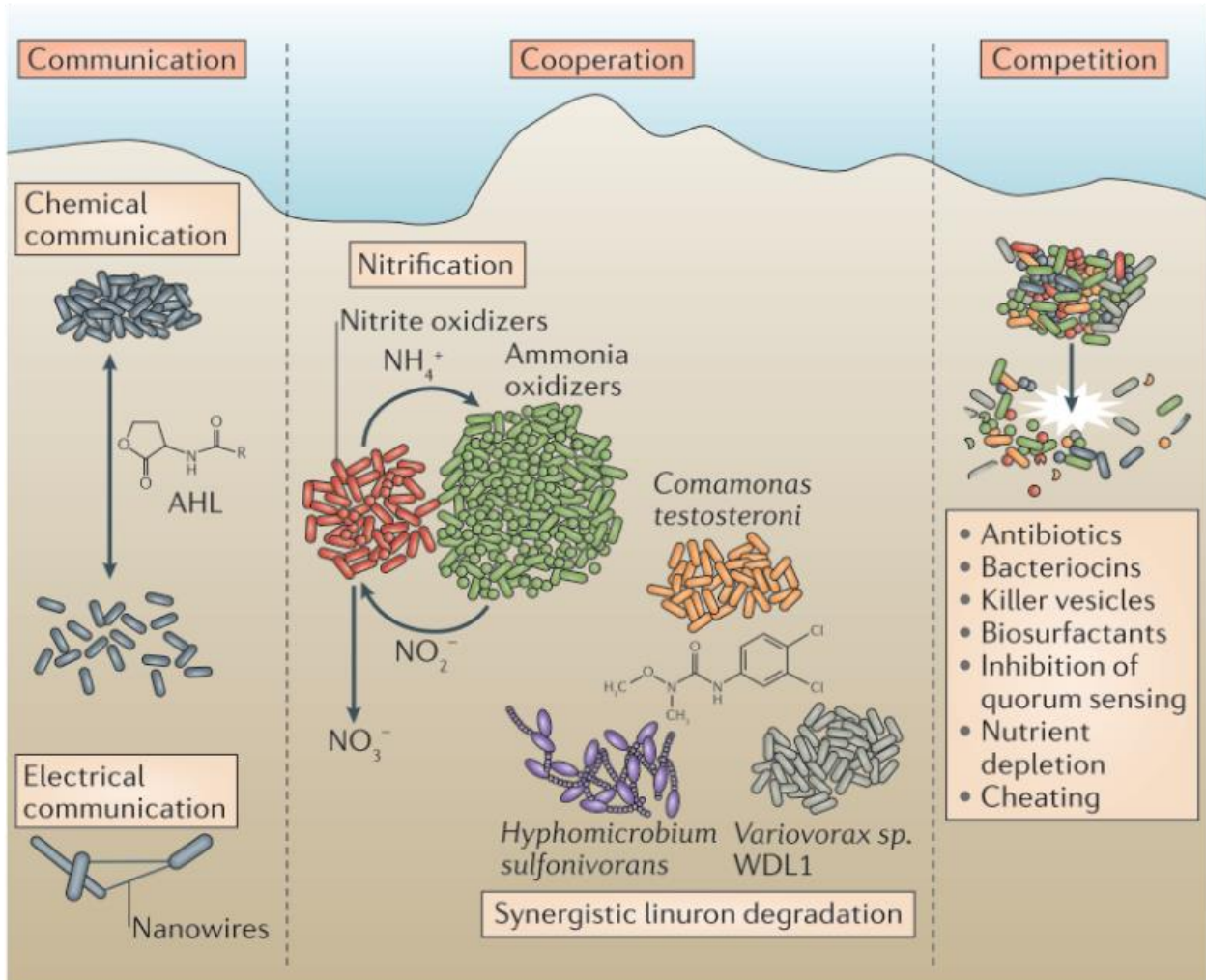
relargue un composé qu'elle ne peut métaboliser dans la matrice, et une seconde cellule le récupère car pouvant le digérer (Absalon, Ymele-Leki, & Watnick, 2012). Ce deuxième type d'interaction peut concerner plusieurs espèces en même temps et créer une chaîne de



TRENDS in Microbiology

**Fig. 1.4 :** Illustrations du scénario de co-aggrégation dans le développement d'un biofilm multi-espèces. a) Colonisation initiale d'une surface recouverte d'un revêtement de polysaccharides et de protéines ; b) les cellules croissent en se divisant et en produisant de la matrice extracellulaire (EPS), formant des micro-colonies ; c) co-adhésion de cellules uniques, de cellules agrégées ou de groupes de cellules identiques dans le biofilm multi-espèces précoce ; d) maturation et formation d'une mosaïque clonale dans le biofilm multi-espèces. (A H Rickard, Gilbert, High, Kolenbrander, & Handley, 2003)

coopération. De plus, elle peut aussi concerner plusieurs voies métaboliques bénéficiant, dans différents sens, aux cellules impliquées. D'autre part, il a été démontré que certaines bactéries pouvaient produire des molécules agissant comme des inducteurs de croissance stimulant le développement d'autres espèces microbiennes, comme la relation de la bactérie *Phaeobacter inhibens* qui produit de l'indole-3-acetic acid qui accélère la croissance de la micro-algue *Emiliania huxleyi* qui elle-même sécrète du tryptophan qui attire les bactéries sus-mentionnées (Segev et al., 2016). Cependant, des molécules à l'effet inhibiteur ont aussi été mises en évidence, montrant qu'il pouvait exister une compétition entre les espèces d'un biofilm.



**Fig. 1.5 :** Les interactions sociales dans les biofilms impliquent une coopération ou une compétition entre cellules. La coopération peut être une communication chimique ou électrique et/ou peut impliquer un métabolisme coopératif, tel que celui observé dans le processus de nitrification (dans lequel des bactéries oxydant l'ammoniac produisent des nitrites qui sont ensuite oxydés par des bactéries oxydantes des nitrites) ou une dégradation synergique des composés toxiques. Ces interactions reposent sur la proximité des cellules qui échangent des métabolites afin de permettre un échange efficace par diffusion. Des interactions négatives, sous forme de compétition ou de tricherie, ont également été observées dans les biofilms. La compétition entre cellules dans les biofilms peut impliquer des mécanismes de destruction, tels que ceux utilisant des antibiotiques, des bactériocines ou des vésicules de membrane extracellulaires (pouvant contenir des enzymes détruisant ou empêchant la croissance d'organismes concurrents), ou des stratégies compromettant la croissance, telles que l'épuisement des nutriments ou l'inhibition du quorum sensing. (H C Flemming et al., 2016)

Une troisième famille d'interactions liée à la communication entre les cellules d'un biofilm y est aussi présente. Ce type d'interactions appelé « Quorum Sensing » (QS), bien que non spécifique à la croissance en biofilm, permet aux cellules de la communauté de détecter la densité

de la population les entourant (Burmølle et al., 2014). Cette communication est basée sur des transmetteurs chimiques divers, espèce-spécifiques ou non, et permet de signaler la taille de la communauté aux bactéries la formant.

Enfin, la dernière famille d'interactions entre les cellules d'un biofilm est la régulation génétique. Là encore, différents types d'interactions semblent exister. Le premier est la spécialisation des cellules en fonction de leur localisation dans le biofilm. Cette spécialisation permet aux cellules de se développer dans les différentes strates de la communauté, et à leurs différents gradients physico-chimiques, en adaptant la transcription de leur patrimoine génétique. Le second, qui commence à être mis en évidence, est lié à la synthèse d'ADN extracellulaire (eDNA). Cet eDNA, en plus d'être un constituant minoritaire de la structure la matrice extracellulaire, agit quelques fois comme un pot commun de matériel génétique pour les cellules de la communauté. Le tierce type, plus caractérisé, est le transfert horizontal de matériel génétique, souvent sous forme de plasmides (Donlan, 2002; Ehlers & Bouwer, 1999; J. M. Ghigo, 2001). Ce partage de patrimoine génétique est rendu possible par la grande proximité des cellules dans le biofilm, et peut s'effectuer aussi bien dans une même espèce qu'entre différentes espèces. Le transfert horizontal de gènes concerne principalement les bactéries, mais peut aussi être réalisé d'une bactérie à une levure. Cette famille d'interactions génétiques est primordiale pour l'adaptabilité des différentes espèces, aussi bien à leur micro-niche dans le biofilm où elles se développent qu'aux stress liés aux antibiotiques.

Toutes ces interactions sont plus ou moins bénéfiques aux biofilms où elles ont lieu, pouvant être classées en plusieurs catégories : parasitisme, coopération et compétition (Nadell, Xavier, & Foster, 2009; Xavier & Foster, 2007). Certaines profitent à l'ensemble de la communauté, mais ne sont fournies que par quelques espèces. D'autres sont le produit de coopération à différents niveaux s'équilibrant en coup d'énergie sur toute la communauté et favorisant l'ensemble de la population. Enfin, certaines sont particulièrement néfastes pour certaines espèces et profitent à d'autres espèces pouvant occuper plus largement l'espace du biofilm. Ces différentes conditions dépendent des espèces en présence et des phases de développement de chacune.

## I.2.D. Hydrodynamique

La majorité des biofilms se forme dans des milieux aquatiques où l'hydrodynamique peut grandement varier, que ça soit au cours du temps (crue) ou entre les différents milieux (par exemple, entre un lac et un ruisseau). L'absence d'écoulement est rare et se retrouve principalement dans les points d'eau stagnante éphémères. Nous nous intéresserons ici seulement aux cas d'hydrodynamique continue ou intermittente. L'hydrodynamique d'un milieu peut en premier lieu influencer le site de première adhérence des cellules, qui vont avoir

tendance à se fixer aux endroits les moins exposés aux forces de cisaillement (Merritt, Danhorn, & Fuqua, 2007; Thomen et al., 2017). Les bactéries ont toutes un seuil de cisaillement en dessous duquel elles peuvent s'installer sur une surface, dépendant de leur motilité, de leur morphologie, et de leur adhérence (Junghyun Kim et al., 2013). Il a ainsi été montré sur les biofilms formés par *Escherichia coli* en canaux milli-fluidiques de différentes géométries (section des canaux variables) mais à flux constant, donc avec des forces de cisaillement différentes mais un débit constant, qu'il existe un seuil de cisaillement au-dessus duquel aucune initiation de biofilm ne peut commencer (Thomen et al., 2017).

Une fois qu'un biofilm a commencé à se développer, le flux du milieu, en plus d'imposer une contrainte mécanique à la communauté, impacte la composition chimique du milieu où il pousse. Ainsi, il lave en permanence les sécrétions que les cellules émettent, comme les enzymes, les EPS et les autres molécules de la matrice extracellulaire (Kirisits et al., 2007), mais en parallèle ce flux renouvelle en permanence les nutriments qu'elles utilisent pour croître (Besemer, Singer, Hödl, & Battin, 2009; Mašić, Bengtsson, & Christensson, 2010; Rochex, Godon, Bernet, & Escudie, 2008).

De plus, le flux du milieu de développement d'un biofilm impacte son écologie, par l'apport de nouvelles cellules à la communauté et l'essaimage de cellules issues de cette dernière (Alexandre Persat et al., 2015; Stewart, 2012). Ainsi, le flux a une forte influence sur l'adhésion initiale de bactéries sur une surface. Il apparaît que, plus le flux est fort, plus les contraintes de cisaillement qu'il exerce sur les surfaces l'est aussi, limitant mécaniquement l'adhésion initiale des cellules (Bakker, Postmus, Busscher, & Van Der Mei, 2004; De La Fuente et al., 2007). Cependant, il a aussi été démontré qu'une plus forte contrainte de cisaillement pouvait améliorer l'attachement aux surfaces des cellules, dans une certaine gamme de valeurs. En effet, chez *Escherichia Coli* s'est développé un système de fimbriae optimisant son adhésion une fois à la surface en condition de fort flux. Ainsi, en comparant deux valeurs de cisaillement de  $0.26 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-2}$  et de  $2.2 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ , il a été observé 12 fois plus d'attachement de cellules aux surfaces à faible cisaillement, mais une durée de contact supérieure à 30 sec dans 2% des cas à faible cisaillement contre plus de 80% des cas à fort cisaillement (Thomas, Nilsson, Forero, Sokurenko, & Vogel, 2004; Thomas, Vogel, & Sokurenko, 2008; Whitfield, Luo, & Thomas, 2014). D'autre part, il a été démontré qu'une fraction de *Pseudomonas aeruginosa* d'une communauté mono-espèce présente sur une surface pouvait utiliser leur TFP pour remonter le flux et coloniser de nouvelles surfaces, augmentant de même leur propagation, en utilisant le twitching précédemment mentionné (cf. I.2.A). Il semblerait aussi que cela soit vrai pour toutes les bactéries ayant des TFP polaires (Meng et al., 2011; Shen, Siryaporn, Lecuyer, Gitai, & Stone, 2012). Enfin, il a aussi été observé que la structure et la morphologie d'un biofilm dépendait des forces de cisaillement du flux avec lequel il se formait, et qu'un biofilm formé à de plus forts cisaillements était plus dense, comme observé sur des biofilms de *Pseudomonas fluorescens* où à flux fort (0.8 m/s) la hauteur des biofilms formés est plus petite (-17%) qu'à flux faible (0.1 m/s), bien que la biomasse générée soit égale (Araujo et al., 2016). Une augmentation des forces de cisaillement, en plus de modifier la morphologie du biofilm, peut le faire se détacher partiellement, favorisant la dissémination de

la communauté aussi bien pour les biofilms de *P. aeruginosa* (gram négatif, motile) que de *S. aureus* (gram positif, non motile) (Rupp, Fux, & Stoodley, 2005).

## I.3. Approches méthodologiques de l'étude des biofilms

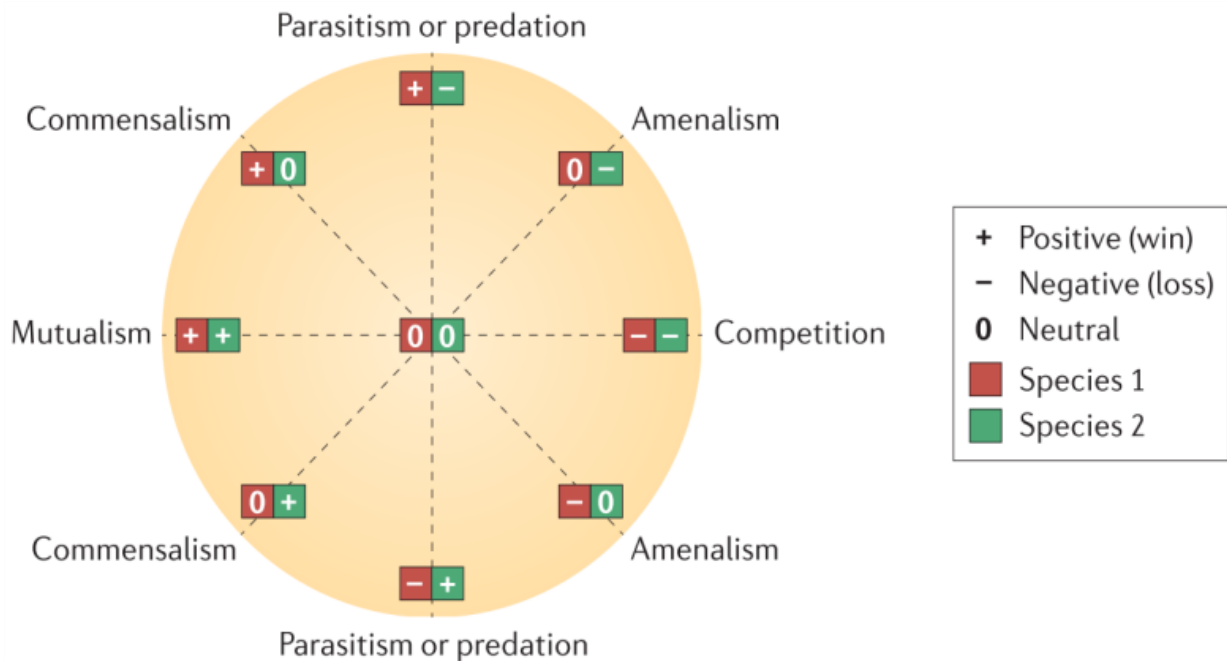
### I.3.A. Types de communauté étudiés

Les biofilms naturels présents dans le sol, les océans et les eaux douces, ou encore chez les eucaryotes, sont traditionnellement étudiés en terme de biomasse générée au cours du temps ainsi qu'en utilisant des outils génomiques permettant de déterminer les pourcentages de phylum bactériens présents ainsi que les espèces de ces phylums. Des études génétiques de ces communautés sont aussi menées et permettent de caractériser des métabolismes particuliers de ces écosystèmes microbiens, tels que les métabolismes du soufre, du méthane, de nitrification, etc (Orcutt, Sylvan, Knab, & Edwards, 2011). Pour cela, les biofilms sont extraits et fixés, puis est effectué sur ces échantillons une analyse génomique pour essayer de savoir quels gènes sont présents dans les bactéries (ce protocole permettant aussi de déterminer quelles espèces sont présentes par l'analyse de l'ADN ribosomal 16S (Mohit, Culley, Lovejoy, Bouchard, & Vincent, 2017)). Une analyse transcriptomique des ARNs présents peut aussi être réalisée, et la quantité des différents ARNs permet de connaître les utilisations faites par les bactéries de leurs gènes, et de comparer ces utilisations entre différents biofilms (compositions d'espèces, adaptation aux milieux) (Vogel & Marcotte, 2013). Enfin, une analyse protéomique, et moléculaire, peut aussi être faite pour déterminer les constituants de ces biofilms (Planchon et al., 2009).

Cependant, l'étude des biofilms naturels, et *a fortiori* celle des interactions entre les différentes espèces les formant, est compliquée pour deux principales raisons. La première cause de difficulté est la très grande variabilité des espèces composant ces biofilms naturels et de la méconnaissance des espèces précises les composant. En effet, il est estimé au mieux qu'à peine 1/10000 des espèces de bactéries dans le monde étaient connues (Little, Robinson, Peterson, Raffa, & Handelsman, 2008)(Little et al., 2008), et seule une fraction est très bien caractérisée. Les études de ces biofilms naturels sont donc forcément globales et non spécifiques. La seconde cause de difficulté est la grande diversité de ces biofilms, principalement due au grand nombre de variables impliquées dans leurs développements (composition de la surface de développement, composition en terme d'espèces, abondance des espèces). Des études de biofilms naturels au nombre d'espèce plus restreint ont cependant été menées pour déterminer

des interactions inter-espèces. Ainsi, par exemple, des échantillons de biofilm bucco-dentaire d'humain ont été étudiés à l'aide de microscopie optique afin de déterminer des interactions de co-localisation entre les espèces (Valm et al., 2011). Ce genre d'étude demande un développement constant de technique d'analyse d'image et de marquage, mais reste dépendant au nombre d'espèces présentes dans la communauté, où une plus grande diversité implique une plus grande difficulté d'analyse.

Pour pallier ces difficultés, dues aux grands nombres d'espèces, tout en restant proche de ces systèmes naturels, il a été fait des isolations de souches présentes dans des biofilms de différents milieux pouvant croître en laboratoire en communauté restreinte, par sélection de ces souches, et en bonne représentativité de phylum dominant. Ces biofilms issus de la nature permettent l'étude plus détaillée des processus de formation des biofilms, de leur développement et des interactions qui s'y établissent, le tout dans un environnement contrôlé physico-chimiquement. Ainsi, il devient plus aisé d'étudier les interactions entre les espèces selon un schéma plus simple (figure interactions « rond jaune ») et de caractériser plus précisément la nature des interactions observées (Faust & Raes, 2012; Segev et al., 2016).



**Fig. 1.6 :** Résumé des interactions écologiques entre membres de différentes espèces. Ce résumé a été adapté pour résumer tous les avis possibles interactions par paires. Pour chaque partenaire d'interaction, il existe trois résultats possibles : positif (+), négatif (-) et neutre (0). Par exemple, dans le parasitisme, le parasite bénéficie de la relation (+), alors que l'hôte est lésé (-); cette relation est donc représentée par la paire de symboles + -. (Faust & Raes, 2012)

Les interactions inter-espèces sont aussi très étudiées sur des communautés synthétiques. Ces communautés étudiées sont souvent formées par deux espèces bien définies, ce qui facilite l'étude plus précise des interactions inter-espèces, car connaissant génétiquement les espèces impliquées (Sanchez-Vizueté, Orgaz, Aymerich, Le Coq, & Briandet, 2015; Simões, Simões, & Vieira, 2009). Cependant, ces biofilms synthétiques ne rendent pas compte d'interactions spécifiques fortes se développant dans une communauté dont les membres co-évoluent ensemble, et reste donc éloigné de ce que sont les interactions dans les biofilms naturels.

## I.3.B. Microscopie optique et rapporteurs fluorescents

Une des méthodes répandues pour étudier les biofilms est la microscopie. De nombreuses études concernent des biofilms immergés mono-taxoniques, et l'emploi de la microscopie se fait à des temps fixes de développement après fixation des échantillons en utilisant des colorants fluorogènes ou des protéines fluorescentes qu'on leur fait produire (Amine Ben Mlouka, Cousseau, & Di Martino, 2016; Haagensen et al., 2007; Thomas R. Neu et al., 2010; Sanchez-Vizueté, Le Coq, et al., 2015). Cependant, dans le cas des biofilms multi-espèces un problème se pose quant à la séparation des différentes espèces. Pour y remédier, plusieurs colorants ou protéines visant différentes cibles plus ou moins spécifiques (membrane cellulaire, paroi cellulaire, protéines spécifiques, etc.), et avec des caractéristiques d'excitation et/ou d'émission distinctes, sont utilisés (T R Neu & Lawrence, 2015; T R Neu et al., 2010). Ces méthodes permettent d'étudier la formation de biomasse à des stades précis et la structure spatiale des bactéries dans les biofilms. Ces techniques permettent d'avoir un aperçu global de la cinétique de développement des communautés, néanmoins plusieurs d'entre elles ne permettent qu'une acquisition ponctuelle (FISH, SEM, TEM) (Alhede et al., 2012; Bleck et al., 2010; Chatterjee, Biswas, Datta, Dey, & Maiti, 2014; Hannig, Follo, Hellwig, & Al-Ahmad, 2010). De plus, beaucoup des colorants exogènes utilisés sont toxiques, et les techniques de microscopies utilisées peuvent être souvent délétères pour les cellules (FISH, SEM, etc.) (Azeredo et al., 2017).

Pour l'étude de formation des biofilms sous flux en temps réel, permise par le développement de la micro- et milli-fluidique (J Kim, Park, & Chung, 2012), il est impossible d'utiliser ces techniques classiques demandant une préparation des échantillons, souvent délétère, ou utilisant des colorants toxiques au long terme. Cependant, il est possible d'utiliser la microscopie optique classique à épi-fluorescence en se basant sur les protéines fluorescentes produites par les cellules des biofilms (T R Neu et al., 2010). Néanmoins, ces protéines fluorescentes présentent des limitations. La première est liée à la faisabilité de transformation génétique des micro-organismes des biofilms étudiés, surtout pour les souches naturelles,



difficulté non présente avec des colorants exogènes. La seconde est liée à la maturation de ces protéines, dépendant de la concentration en dioxygène du milieu, qui est fortement consommé par les cellules pour se développer, qui plus est dans l'environnement particulier que sont les biofilms où règne de multiples gradients chimiques. Cela demande donc de mettre en place des méthodes innovantes pour ce genre de système. Pour cela, depuis une quinzaine d'années, l'usage de protéines fluorogènes exotiques s'est développé, comme les protéines fluorescentes inductibles UNAG (avec de la bilirubine) (Kumagai et al., 2013) ou LOV (avec de la flavine) (Buckley, Petersen, Roe, Douce, & Christie, 2015). Cependant, ces complexes protéiques fluorescents présentent des limitations dues à leurs propriétés physico-chimiques. Nous présenterons dans cette thèse une stratégie alternative plus efficace que celles susmentionnées appelé FAST.

### I.3.C. Cytométrie en flux

Une autre méthode utilisée pour étudier les communautés de cellules formant des biofilms est la cytométrie en flux. Cette technique est principalement utilisée pour quantifier les populations des biofilms, *a fortiori* elle permet de déduire aussi la biomasse, ainsi que pour mesurer la viabilité des cellules dans ces communautés (Cerca et al., 2011; Oliveira, Lima, Brás, França, & Cerca, 2015). Cependant, comme pour les principales méthodes de microscopie (SEM, FISH, etc...), la cytométrie est une mesure ponctuelle nécessitant de collecter le biofilm, et pouvant utiliser des colorants exogènes fluorescents. Néanmoins, elle reste d'une grande aide, car elle permet de séparer les cellules et de déterminer un nombre donné pour une biomasse. Cela est d'autant plus intéressant dans les études de biofilm multi-espèces, où le rapport du nombre de cellules avec la biomasse peut être très différent entre une population de petites cellules et pour une de grandes cellules. Durant cette thèse, nous avons utilisé cette technique pour quantifier les populations de nos biofilms à différents temps de développement.

### I.3.D. Les techniques -omiques

Les deux précédentes méthodes présentées décrivent soit l'observation de base, soit l'analyse de biofilms. Cependant, en raison de la complexité du biofilm, il est nécessaire d'adopter une perspective plus large et d'utiliser une approche holistique pour décrire les biofilms. Pour cette raison, l'approche des études -omiques pour analyser et décrire les biofilms en tant que structures complexes ont fortement été utilisées pour étudier les changements qui se passent au niveau des gènes (génomique), des ARNs (transcriptomique), des protéines (protéomique) et métabolique (métabolomique) (Azevedo, Lopes, Keevil, Pereira, & Vieira, 2009). Les analyses -

omiques ont révélé des différences physiologiques survenant au cours du développement des biofilms en réponse à des interactions avec son environnement, comme le passage de la motilité à l'adhérence à une surface, ou la réponse au stress lié au manque d'O<sub>2</sub> dans le milieu (An & Parsek, 2007), mais aussi de manière symbiotique entre espèces (Lenahan et al., 2014; Sheridan et al., 2013).

Tous ces niveaux d'étude -omiques transmettent différentes informations, toutes complémentaires entre elles à un moment donné (Vogel & Marcotte, 2013). Ainsi, l'étude génomique d'une population évoluant en biofilm montre la capacité de ces cellules à muter pour s'adapter, mais ce processus est très lent, et n'est pas le plus adéquat pour ce genre de système à des échelles de temps comme celles des études en laboratoire. L'étude transcriptomique quant à elle fournit des informations sur l'ensemble des transcriptions présentes dans la population, mettant en exergue la réponse des cellules à leur environnement. Ainsi, il a été démontré en usant de cette technique (et de la protéomique) les différences de transcriptome (et de protéome) de populations bactériennes mono-taxoniques issues de culture planctonique et celles de culture en biofilm (De Angelis, Siragusa, Campanella, Di Cagno, & Gobbetti, 2015; Planchon et al., 2009). Les différentes techniques -omiques se complètent entre-elles pour étudier la physiologie cellulaire au cours de la formation du biofilm (Lenahan et al., 2014; Liu et al., 2016; Sheridan et al., 2013).

Cependant, ces techniques sont compliquées à m'êtrre en place dans des populations multi-espèces. En collaboration avec une équipe de chercheurs de l'Institut Micalis, nous avons entamé l'étude transcriptomique de nos biofilms, en développant un protocole permettant de différencier les différentes espèces simultanément et dans le but de mettre en avant des différences de transcriptomes entre les conditions de nos biofilms et pour chaque espèces les constituant. Cependant, l'étude étant en cours, elle ne sera pas discutée dans ce manuscrit.



## **II. Matériels et méthodes**



# II.1. Microbiologie

## II.1.A. Souches

### II.1.A.1. Escherichia coli

Nous avons utilisé différentes souches de la bactérie *Escherichia coli* K12-MG1655-F (Ec) portant un plasmide non-conjugatif avec le pilus F (Tab. II.1), qui promeut la formation de biofilm et un gène de résistance à la tétracycline (J. Ghigo, 2001). La première souche que nous avons utilisée dans nos expériences, appelée MG1655-gfp-F, porte le gène exprimant la GFP lié au gène mut3 inséré dans le chromosome sous le contrôle du promoteur lambda pR. Nous avons transformé cette souche avec le plasmide pAg87pR codant pour la protéine FAST (cf. Annexe A) pour obtenir la souche MG1655-gfp-F-FAST, exprimant les protéines FAST et GFP. Nous avons aussi transformé la souche initiale K12-MG1655-F avec le plasmide pAG101pR codant pour une fusion FAST-mCherry pour donner la souches MG1655-F-FAST-mCherry. Les plasmides pAg87pR et pAG101pR ont été construits à partir des plasmides pAG87 et pAG101 (M.-A. Plamont et al., 2015), pour remplacer le promoteur initial T7 par le promoteur lambda pR, afin d'exprimer respectivement la protéine FAST et la fusion des protéines FAST et mCherry chez *Escherichia coli* K12-MG1655-F.

Souche d' <i>Escherichia coli</i> k12	Souche 'mère'	Plasmide	Protéine exprimée
MG1655-F	MG1655	pF'tet	Pilus F
MG1655-gfp-F	MG1655-F	Lambda pR-mut3*	Pilus F, GFP
MG1655-gfp-F-FAST	MG1655-gfp-F	pAg87pR	Pilus F, GFP, FAST
MG1655-F-FAST-mCherry	MG1655-F	pAG101pR	Pilus F, mCherry fusion FAST

**Tab. II.1.** : Tableau récapitulatif des souches d'*Escherichia coli* k12 utilisées, avec les souches mères, les plasmides et les protéines d'intérêt qui leur sont liés.

\*NB : ici insertion chromosomique

### II.1.A.2. Espèces de la communauté bactérienne

#### II.1.A.2.a. *Pseudomonas fluorescens*

Nous avons utilisé deux souches de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 (Tab. II.2.). La première sans modification et la seconde dans laquelle il a été inséré le plasmide pMP7605 (Lagendijk, Validov, Lamers, De Weert, & Bloemberg, 2010). Le plasmide pMP7605 est un plasmide pBBR1MCS-5 contenant un gène de résistance à la gentamycine (Elzer et al., 1995) et le gène codant pour la protéine mCherry, sous le contrôle du promoteur tac.

### II.1.A.2.b. *Bacillus thuringiensis*

Nous avons utilisé une souche de *Bacillus thuringiensis* 407 cry- (Sheppard, Poehlein, Rosenstiel, Liesegang, & Schulenburg, 2013), et produit plusieurs souches dérivées de celle-ci (Tab. II.2.). La première souche dérivée exprime le gène de la GFP sous promoteur PaphA3, inséré sur le chromosome via le plasmide pRN5101-PaphA3-gfp. La deuxième souche exprime le plasmide pRN5101-Psar-Yfast. La troisième souche exprime la protéine FAST sous promoteur PsarA, inséré sur le chromosome via le plasmide pRN5101-Psar-Yfast. Les plasmides pRN5101-PaphA3-gfp et pRN5101-Psar-Yfast sont issus d'un plasmide pRN5101, plasmide naturel thermosensible issu de *Bacillus sphaericus* (Ge et al., 2014; Poncet et al., 1997), contenant respectivement le gène codant pour la protéine GFP sous promoteur PaphA3 et le gène codant pour la protéine FAST sous le promoteur Psar ainsi qu'un gène de résistance à l'érythromycine.

### II.1.A.2.c. *Kocuria salsicia*

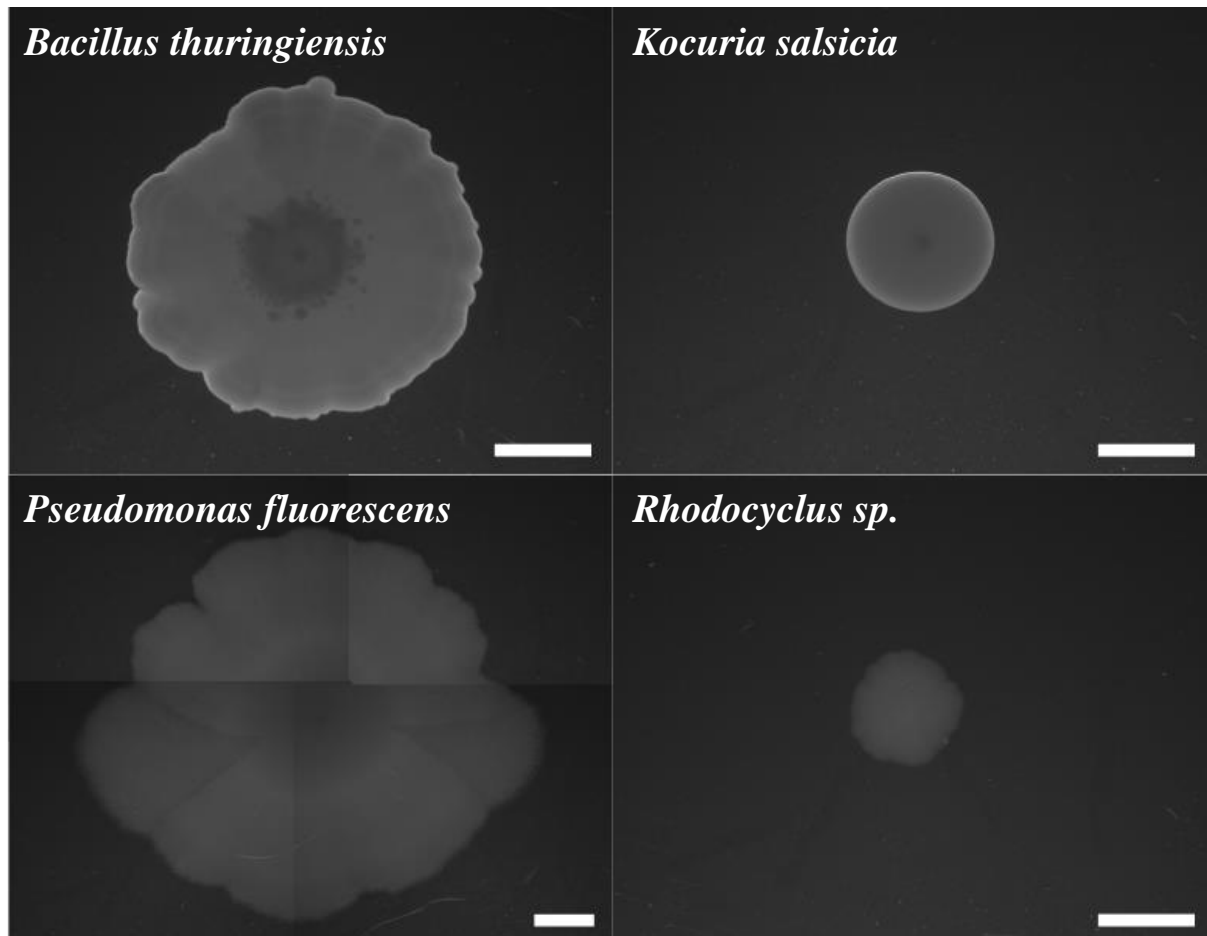
Nous avons utilisé une souche sauvage de la famille des Micrococcaceae, que les analyses taxonomiques basées sur 16S et « Average nucleotide identity » (ANI) ont pu déterminer comme étant *Kocuria salsicia* (Yun et al., 2011) (Tab. II.2.).

### II.1.A.2.d. *Rhodocyclus sp.*

Nous avons utilisé une souche sauvage de la famille des Rhodocyclaceae. Les analyses sont encore en cours pour déterminer plus clairement l'espèce. Nous appellerons ici cette souche *Rhodocyclus sp.* (Tab. II.2.).

Souche	Souche 'mère'	Plasmide	Protéine exprimée
<i>P. fluorescens</i> WCS365	Wild type	-	-
<i>P. fluorescens</i> WCS365 mCherry	<i>P. fluorescens</i> WCS365	pMP7605	mCherry
<i>B. thuringiensis</i> 407 cry-	Wild type	-	-
<i>B. thuringiensis</i> gfp	<i>B. thuringiensis</i> 407 cry-	pRN5101-PaphA3-gfp	GFP
<i>B. thuringiensis</i> Yfast-p	<i>B. thuringiensis</i> 407 cry-	pRN5101-Psar-Yfast	FAST
<i>B. thuringiensis</i> Yfast-c	<i>B. thuringiensis</i> 407 cry-	Chromosomique via pRN5101-Psar-Yfast	FAST
<i>Kocuria salsicia</i>	Wild type	-	-
<i>Rhodocyclus sp.</i>	Wild type	-	-

**Tab. II.2. :** Tableau récapitulatif des souches de la communauté multi-espèces utilisées, avec les souches 'mères', les plasmides et les protéines associées correspondantes.

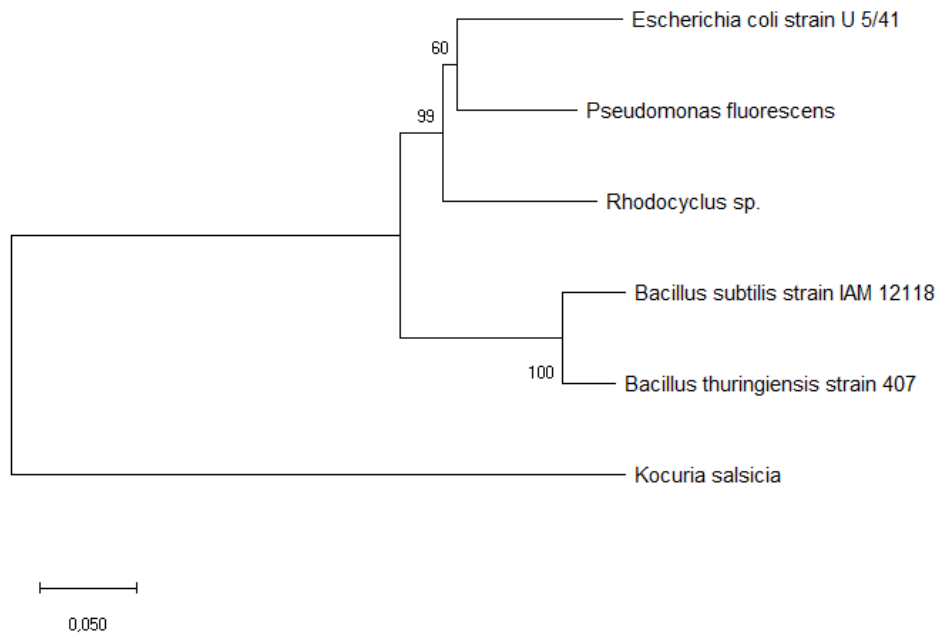


**Fig. II.1. :** Photographies macroscopiques des colonies formées boîte d'agar-M1 des 4 espèces de la communauté après 9 jours de croissance. Les barres d'échelle représentent 4 mm.



## II.1.A.2.e. Communauté 4-espèces en biofilm

Pour toutes les expériences de biofilm constitué de la communauté quatre espèces (4S), les souches utilisées, sauf mention explicitement contraire, seront : *Bacillus thuringiensis* Yfast-c (Bt), *Pseudomonas fluorescens* WCS365 mCherry (Pf), *Kocuria salsicia* (Ks) et *Rhodocyclus* sp. (R) (Fig. II.1). Une analyse phylogénétique des souches a été réalisée et montre les éloignements existant entre les espèces de notre communauté, avec une souche de *Escherichia coli* à titre informatif (Fig. II.2.).



**Fig. II.2. :** L'histoire évolutive des souches a été déduite en utilisant la méthode des jonctions voisines. L'arborescence optimale avec la somme de la longueur de branche (égale à 0,91624038) est montrée. Le pourcentage de répliquats d'arbres dans lesquels les taxons associés se regroupent dans le test d'amorçage (1 000 répliquats) est indiqué à côté des branches. L'arbre est dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branches dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode des p-distances, et sont exprimées en unités du nombre de différences de base par site. L'analyse a impliqué 6 séquences de nucléotides. Toutes les positions ambiguës ont été supprimées pour chaque paire de séquences. Il y avait un total de 1595 positions dans le jeu de données final. Des analyses évolutives ont été menées sur MEGA X.

## II.1.B. Protéines fluorescentes

GFP : Cette protéine fluorescente verte (GFP, pour « green fluorescent protein ») a une longueur d'onde d'excitation optimale à 488nm et une longueur d'onde d'émission optimale à 522nm.

mCherry : Cette protéine fluorescente rouge, dérivée de la protéine fluorescente DsRed, a une longueur d'onde d'excitation optimale à 568nm et une longueur d'onde d'émission optimale à 585nm.

FAST : La protéine FAST a été développée dans le groupe du Dr. Arnaud Gautier. Lorsque cette protéine est en présence d'un analogue synthétique fluorogène de l'hydroxybenzylène rhodanine (HBR), développé aussi par la même équipe, elle forme un complexe fluorescent (Li et al., 2017; M.-A. Plamont et al., 2015). Nous avons ici utilisé l'HBR-2,5-DM (4-hydroxy-2,5-dimethylbenzylidene rhodanine) qui, une fois lié à la protéine FAST, fluoresce en vert (em. 552nm) sous une excitation bleue (494nm), ainsi que l'HBR-3,5-DOM (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene rhodanine) qui fluoresce en rouge (em. 600nm) sous une excitation verte (518nm).

## II.1.C. Milieux de culture

### II.1.C.1. Pré-cultures d'*Escherichia coli*

Toutes les cultures de cette souche ont été faites à 37°C. Une première étape de culture sur boîte de Pétri composée de LB agar (Annexe A) supplémenté avec 7.5 µg/ml de tétracycline est réalisée à partir d'un stock de bactéries conservé à -80°C. Puis on dilue une colonie unique prélevée de la boîte de Pétri dans un Erlenmeyer contenant du LB supplémenté avec 7.5 µg/mL de tétracycline, avant incubation sous agitation durant toute une nuit. Le lendemain matin, cette culture est diluée dans du milieu minimum M63B1 (Annexe A) supplémenté avec 0.4% de glucose pour obtenir une culture en phase de croissance exponentielle d'une densité optique à 600nm (OD600) égale à 0.2 après quelques heures d'incubation sous agitation. Enfin, on initie les biofilms en inoculant cette culture (OD600 0.2) dans des canaux milli-fluidiques, à une concentration approximative de 10<sup>6</sup> cellules par mL. On laisse au repos durant 90 minutes avant de lancer le flux de milieu M63B1 supplémenté avec 0.4% de glucose à 1mL/h. La totalité des expériences en canaux milli-fluidiques est menée à une température contrôlée de 37°C.

## II.1.C.2. Pré-cultures des membres de la communauté 4S

Toutes les cultures des souches *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.* sont réalisées à 30°C. Les milieux utilisés pour ces souches sont le M1 et le Mb (Annexe A). Les souches *Bacillus thuringiensis* 407 cry- (« blanc »), GFP et chromosome FAST n'ont pas de résistance à un antibiotique. Les souches de *Bacillus thuringiensis* plasmide FAST, *Pseudomonas fluorescens* « blanc », *Pseudomonas fluorescens* mCherry, *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.*, ont une résistance antibiotique (Tab. II.3).

Souche	Résistance à l'antibiotique	Concentration pour les cultures
<i>Bacillus thuringiensis</i> « blanc »	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> GFP	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> Yfast-p	érythromycine	10 µg/ml
<i>Bacillus thuringiensis</i> Yfast-c	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> « blanc »	chloramphénicol	8 µg/ml
<i>Pseudomonas fluorescens</i> mCherry	gentamycine	10 µg/ml
<i>Kocuria salsicia</i>	oxomycine	15 µg/ml
<i>Rhodocyclus sp.</i>	kanamycine	20 µg/ml

**Tab. II.3.** : Tableau récapitulatif des résistances aux antibiotiques des souches de la communauté 4S, avec les concentrations utilisées pour les cultures.

Une première étape de cultures sur boîtes de Pétri en M1 agar et supplémentées avec antibiotique, correspondant à la souche inoculée, a été faite à partir de stock de bactéries issues de stock conservé à -80°C. Ensuite, une deuxième étape de cultures a été faite en M1, ou en Mb, avec antibiotique. Ces cultures ont été inoculées avec des colonies uniques, issues de cultures sur boîtes, pour une nuit (OVN) à la température voulue et avec agitation. Le lendemain matin, une troisième étape de cultures a été réalisée à partir des cultures OVN en appliquant des dilutions spécifiques à chaque espèce dans 5ml de M1, ou Mb, afin d'obtenir une culture en phase de croissance exponentielle 8h plus tard.

## III.1.C.3. Préparations spécifiques des différentes expériences

### II.1.C.3.a. Expérience biofilm

Après une mesure de l'OD600 des cultures en phase exponentielle, les cultures sont diluées pour former un inoculum composé de 1 à 4 espèce(s) ayant chacune une concentration de  $10^6$  cellules par mL. Puis cet inoculum est injecté dans un canal milli-fluidique et laissé au repos durant 1h avant de lancer le flux de Mb à 1mL/h.

### II.1.C.3.b. Expérience cytométrie

Après une mesure de l'OD600 des cultures en phase de saturation, exponentielle, ou issues des biofilms, les échantillons sont dilués dans le tampon de cytométrie (FACS flow BD ou Buffer MACSQuant, dépendant du cytomètre utilisé) à des concentrations permettant une analyse quantitative des échantillons ( $10^5$ - $10^7$  cellules par mL). Eventuellement, on ajoute différents colorants fluorogènes : HBR 2.5 DM, HBR 3.5 DOM, FM4-64 (Thermofisher).

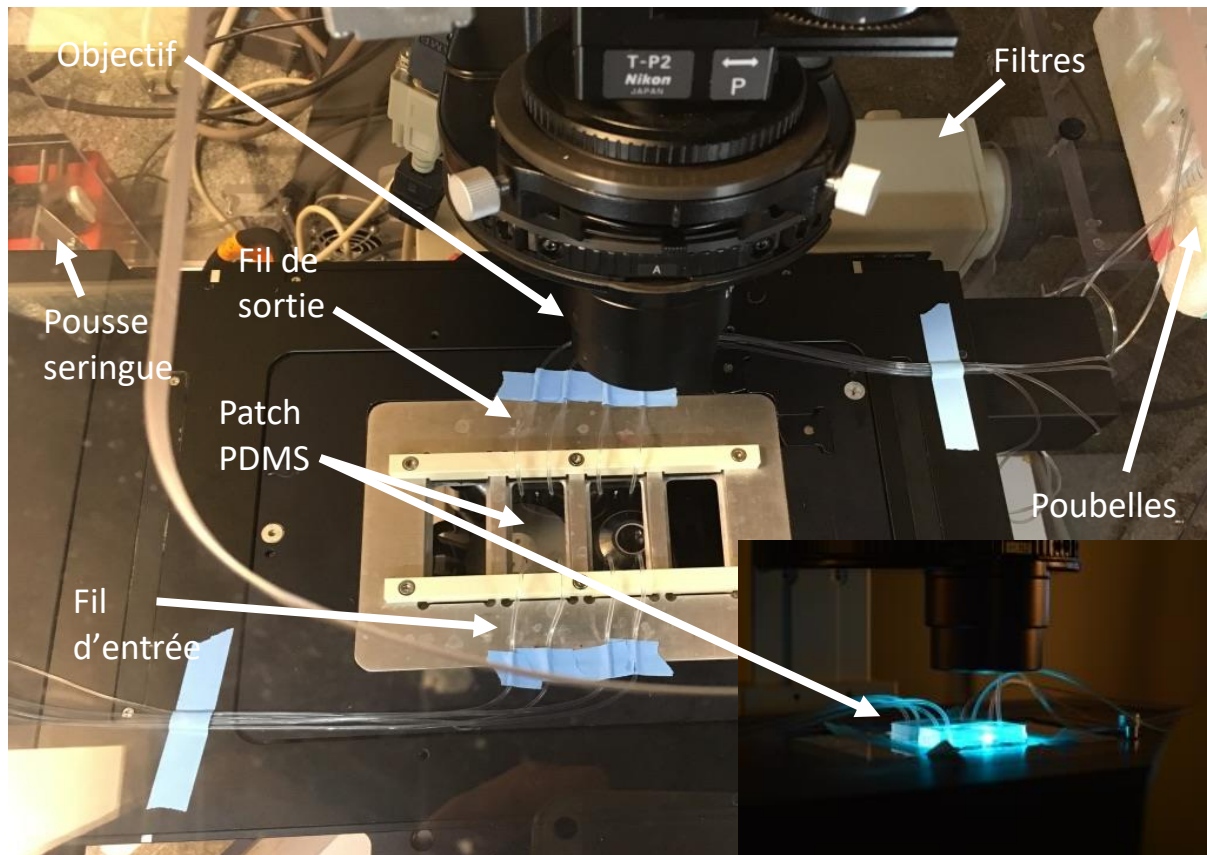
### II.1.C.3.c. Expérience tecan

Après une mesure de l'OD600 des cultures en phase de saturation, exponentielle, ou issues des biofilms, les cultures ont été diluées, ou non, dans du milieu M1 ou Mb, à des concentrations dépendantes des expériences, menées avec l'ajout ou non d'un des fluorogènes HBR.

## II.2. Dispositif milli-fluidique

Nous avons développé la micro-fabrication de canaux milli-fluidiques d'une longueur de 30mm, d'une largeur de 1mm et d'une hauteur de 1mm. Un mélange de polydimethylsiloxane (PDMS, RTV615 A + B, de Momentive) a été versé à température ambiante dans différents moules micro-usinés en polyvinyl chloride, et laissé à réticuler dans un four à 65°C pour au moins 3h après dégazage avec une pompe à vide. Les gabarits en PDMS ainsi obtenus sont percés afin de pouvoir brancher plus tard des raccords et des tuyaux adaptés. Ces gabarits et des lamelles de verre sont ensuite nettoyés dans une enceinte à plasma d'oxygène (Harrick) et immédiatement scellés les uns aux autres, afin de former des canaux fermés à l'exception des trous précédemment percés. Ces canaux sont ensuite remplis avec de l'eau milliQ, et laissés à reposer pour au moins 2h. Enfin, après inoculation des bactéries dans les canaux, ils sont branchés en utilisant de fins connecteurs métalliques (0.013" ID and 0.025" OD) aux entrées et des tubes microbores Tygon (0.020" ID and 0.06" OD) approvisionnés par Phymep (France) aux sorties. Les connecteurs métalliques sont aussi reliés à des tuyaux microbores Tygon (0.020" ID and 0.06" OD) puis connectés à des seringues montées sur pousse-seringues. On peut ainsi appliquer un flux de milieu contrôlé dans

les canaux. Les fins connecteurs métalliques forment des goulets qui limitent la colonisation en amont par les bactéries présentes dans les canaux. L'effluent des canaux est collecté au cours du temps afin d'analyser les bactéries relâchées par le biofilm (Fig. II.3).



**Fig. II.3. :** Photographie du montage expérimental, et un zoom sur un patch de PDMS éclairé en lumière bleue.

## II.3. Microscopie optique

### II.3.A. Montage expérimental

#### II.3.A.1. Microscope

Nous avons utilisé un microscope inversé NIKON TE300 équipé avec une platine x, y, z motorisée ainsi que des obturateurs motorisés. Les images ont été recueillies en illumination directe (sans phase) à l'aide d'objectif 20x Fluor plan, NA 0.45 WD 8,2-6,9. Les acquisitions de

fluorescence sont effectuées en utilisant deux configurations de filtres : la première pour l'acquisition de la fluorescence de la protéine GFP et du complexe FAST:HBR-2.5-DM (Exc. 482/35, DM 506 Em. FF01-536/40, canal vert) ; la seconde pour l'acquisition de la fluorescence de la protéine mCherry et du complexe FAST:HBR-3.5-DOM (Exc. 531/40 nm, DM 562 Em. 593/40, canal rouge). Cette dernière configuration de filtre est un compromis qui permet de détecter mCherry et FAST:HBR-3.5-DOM sur le même canal de fluorescence et donc non-optimal pour chacun des chromophores. L'excitation a été réalisée via un boîte LEDs (CollLed pE 4000).

## II.3.A.2. Imagerie

Nous avons utilisé une caméra Hamamatsu ORCA-R2 EMCCD pour les acquisitions à intervalles réguliers d'images de 1344x1024 pixels avec une profondeur de niveau de gris de 12 bits (4096 niveaux de gris). Les images ainsi obtenues couvrent un champs xy objet de 330µm sur 430µm. Les images en champs clair et en fluorescence sont collectées à différentes fréquences, dépendant de la composition des biofilms étudiés et de la fluorescence des souches visées (Tab. II.4). Pour les expériences du chapitre III.1, les acquisitions sont effectuées durant 24 heures, toutes les 5 minutes. Pour les expériences des chapitres III.2 et III.3, les acquisitions sont effectuées sur des lapses de temps allant de 29 et 60 heures, et majoritairement durant 40h, toutes les 10 minutes.

Souches :	Temps d'expérience (heures)	Temps entre deux mesures (minutes)	Temps d'acquisition (milli-secondes)		
			Transmission	Fluorescence verte	Fluorescence rouge
Ec GFP	24	5	10	50 - 500	800
Ec Fast+ GFP	24	5	10	50 - 500	800
Ec Fast-mCherry	24	5	10	50 - 500	800
Pf	40	10	10	-	800
Bt	40	10	10	800	-

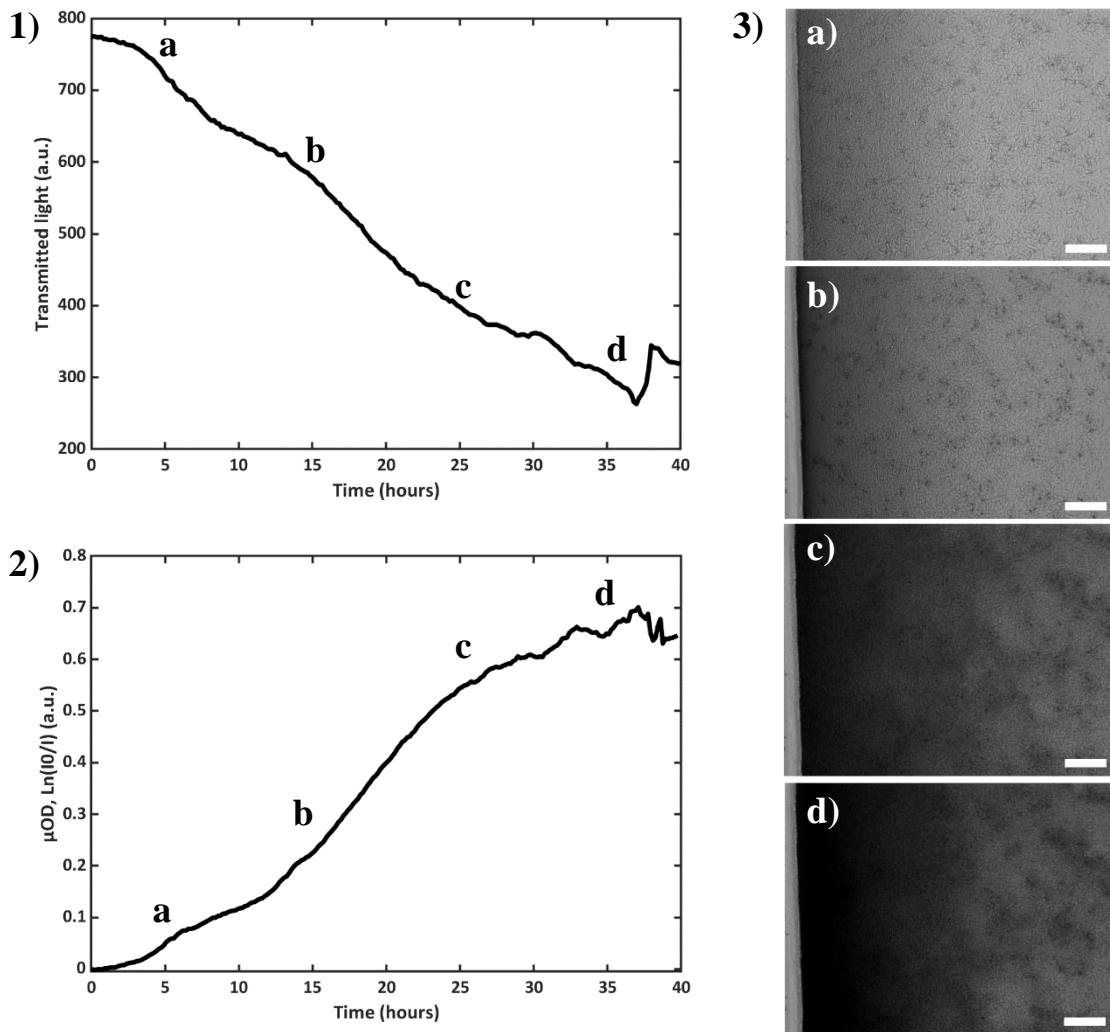
**Tab. II.4. :** Tableau récapitulatif des caractéristiques d'acquisition des expériences de biofilm en vidéo-microscopie pour les différents signaux d'acquisition (Transmission, fluorescence canal vert et rouge), pour les différentes souches.

## II.3.B. Analyse d'image

La moyenne d'intensité par pixel des images, aussi bien de fluorescence que de lumière transmise, sur des régions d'intérêt définies (ROI, pour « region of interest ») a été collectée à

l'aide du logiciel NIS, développé par NIKON. Les fichiers de données édités par NIS sont ensuite exportés vers Matlab pour une analyse plus approfondie de la cinétique de développement du biofilm et de la détermination des paramètres de croissance.

Pour suivre quantitativement la croissance des biofilms, nous avons utilisé le microscope comme microphotomètre et défini une absorbance microscopique  $\mu\text{OD} = \ln(I_0 / I)$ , où  $I_0$  est l'intensité (niveau de gris moyen par pixel) des images enregistrées sur un canal rempli d'eau et  $I$  l'intensité du canal contenant le biofilm en croissance (Fig. II.4).



**Fig. II.4. :** 1) Courbes de cinétique de la lumière transmise au cours du temps d'un biofilm 4S. 2) Courbes de cinétique de la  $\mu\text{OD}$  au cours du temps du même biofilm 4S. 3) Images de lumière transmise du même biofilm 4S après a) 5h, b) 15h, c) 25h et d) 35h de développement. Les barres blanches d'échelle représentent 55  $\mu\text{m}$ . Les temps des images a), b), c) et d) sont indiqués sur les courbes 1) et 2).

La fluctuation de  $\mu\text{OD}$  est liée à la création de biomasse dans le canal par analogie avec la loi empirique de Beer-Lambert stipulant que l'absorption de la lumière par un matériau est directement proportionnelle à l'épaisseur et à la concentration de l'échantillon. Nous avons vérifié cela en cultivant une série de 10 biofilms identiques en parallèle dans des canaux de 1 mm de hauteur avec un débit moyen de 1 mL/h (Thomen et al., 2017).

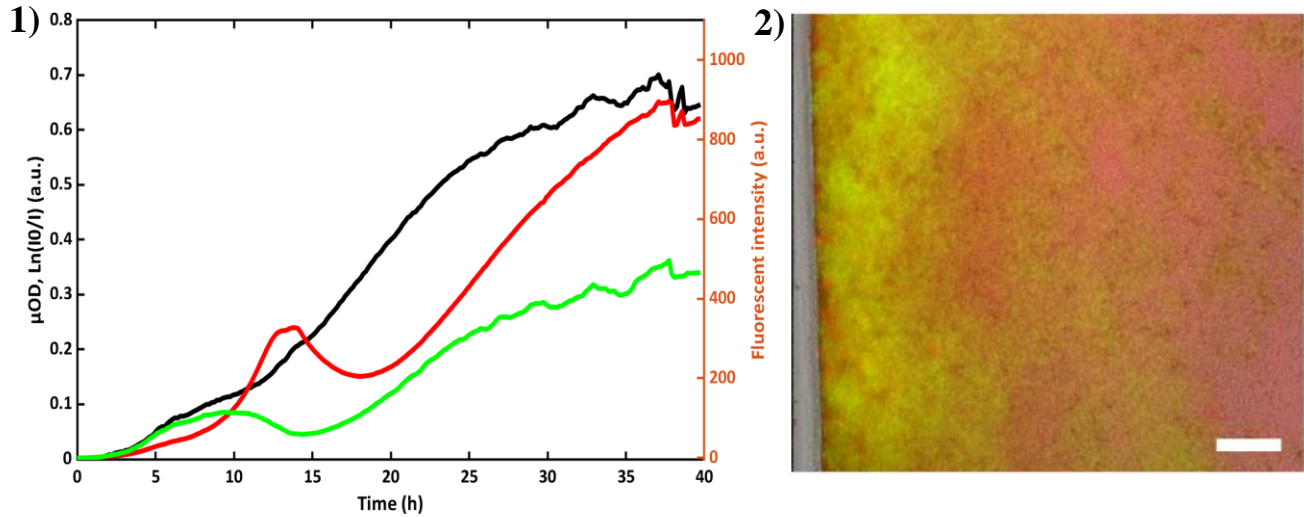
À différents moments de la croissance du biofilm, celle-ci a été arrêtée en interrompant le flux d'éléments nutritifs et en extrayant immédiatement le biofilm du canal par impulsions répétées d'air et de milieu. Le matériel extrait a ensuite été entièrement remis en suspension dans 300  $\mu\text{L}$  de milieu minimum par pipetage doux. Ensuite, la suspension concentrée est diluée dans un milieu minimum pour les mesures de densité optique (OD) dans une cuvette à spectrophotomètre. La biomasse est évaluée en considérant qu'une suspension d'*E. coli* de concentration égale à  $5 \cdot 10^8$  cellules par mL produit une OD de 1 à 600 nm. Nous obtenons ensuite la relation entre la quantité de cellules dans le canal et l'absorbance microscopique —  $\mu\text{OD}$  (Thomen et al., 2017).

Il a également été observé, comme dans la version macroscopique de la loi de Beer-Lambert, que la relation absorbance-biomasse s'écarte du régime linéaire aux concentrations élevées. Dans les conditions de  $I_0$  utilisées pour le suivi de la croissance du biofilm, le signal de détection de la biomasse a commencé à se stabiliser à des temps et pour des valeurs d'absorbance microscopiques différentes en fonction des espèces inoculées dans les canaux mais stables pour une même espèce. Cette non-linéarité a été prise en compte dans l'analyse de la courbe de croissance.

D'autre part, pour les intensités de fluorescence, nous soustrayons la contribution de leur fond respectif en utilisant la contribution à l'intensité de fluorescence d'un canal de milieu en l'absence de bactéries.

Ces modifications des données permettent de s'assurer que la  $\mu\text{OD}$  rapporte bien la création de biomasse des biofilms, et les fluorescences, les cinétiques propres des espèces les produisant (Fig. II.5).





**Fig. II.5. :** 1) Courbes de cinétique des fluorescences de FAST (en vert) et de la mCherry (en rouge) ainsi que la cinétique de  $\mu\text{OD}$  du même biofilm 4S au cours du temps. 2) Image de la superposition des 3 signaux acquis en microscopie du même biofilm, après 40h de croissance. La barre d'échelle représente 55  $\mu\text{m}$ .

## II.4. Lecteur de plaque

### II.4.A. Appareillage

Les analyses de OD et fluorescence en plaque 48 puits Greiner (flat bottom) sont réalisées en utilisant un lecteur de plaque TECAN Infinite M200 pro. Nos plaques sont maintenues à température d'intérêt (30°C ou 37°C) et mesurées soit ponctuellement soit au cours du temps, sans couvercle. Nous mesurons l'absorbance des puits à 600nm, la fluorescence verte (excitation à 488nm et émission à 535nm permettant de suivre la GFP ou le complexe FAST:HBR-2.5-DM) et la fluorescence rouge (excitation à 550nm et émission à 620nm permettant de suivre la mCherry). Les plaques 48 puits sont mesurées sur des périodes variables (24 ou 48h) sous agitation orbitale de 3.5mm (200rpm) durant 90/135sec puis linéaire de 4.5mm (352rpm) 90/135sec, cela deux fois de suite, pour une durée totale de 6 ou 9 min, pour assurer une bonne homogénéité de nos cellules dans nos puits. Ces différentes durées des périodes d'agitation dépendent du nombre d'acquisitions différentes effectuées durant une mesure : 9 min pour une mesure d'OD seule, 6 min pour les trois acquisitions à la suite.

## II.4.B. Analyse

Les mesures d'OD et de fluorescence effectuées par le TECAN sont collectées à l'aide du logiciel dédié i-Control. Les données sont recueillies et éditées au format .xls, puis analysées à l'aide du logiciel Excel ou Matlab. Nous avons soustrait la contribution de fond du milieu, utilisé pour les expériences, aux mesures acquises par le TECAN. Pour les courbes d'OD, les données ont été étudiées en utilisant le logarithme népérien (Ln) des valeurs mesurées afin de déterminer les phases de croissance exponentielle de nos cultures. De ces courbes, nous avons pu obtenir les temps de doublement des populations croissant dans chaque puits. Les mesures faites en fluorescence sont analysées en parallèle. Elles ont permis de déterminer les cinétiques de croissance des espèces fluorescentes dans les mélanges d'espèces.

## II.5. Cytométrie

### II.5.A. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de compter et de caractériser des cellules individuellement en les faisant défiler une à une à grande vitesse devant un jeu de lasers (Fig. II.6).

La séparation des cellules est basée sur les propriétés dynamiques d'écoulement laminaire coaxiales décrites par Reynolds (Reynolds, 1894). L'échantillon contenant les cellules est pressurisé puis injecté dans un écoulement gaine, stable, à l'aide d'une buse. La vitesse de suspension cellulaire dépend de la pression du fluide de gaine qui est fixée par construction de façon à optimiser la précision de la focalisation hydrodynamique et à assurer une bonne qualité de l'analyse de l'échantillon.

Les cellules isolées passent ensuite devant un ou plusieurs laser(s) cohérent(s) et monochromatique(s). C'est durant cette étape que les mesures sont effectuées. Lorsque la cellule passe dans le faisceau d'excitation, la lumière est réfractée dans toutes les directions. La diffusion de la lumière aux petits angles (lumière diffusée vers l'avant entre 1° et 9°, FSC pour « Forward Scattering ») est collectée près de l'axe du faisceau laser par une photodiode ou un tube photomultiplicateur. Le signal FSC est corrélé à la taille (volume) des cellules. La diffusion de la lumière aux grands angles (lumière diffusée à 90°, SSC pour « Side Scattering ») est collectée de manière orthogonale à l'axe du laser du faisceau laser par une photodiode ou un tube photomultiplicateur. Le signal SSC est une combinaison de diffusion, et de réfraction provoquée

par la complexité structurelle dans la cellule. C'est aussi aux grands angles que sont mesurées les intensités de fluorescence des cellules. Les différentes longueurs d'onde sont filtrées par des miroirs dichroïques et des filtres d'émission adéquats (passe-bande haut, passe-bande bas ou passe-bande mixte).

## II.5.B. Appareillage et acquisition

Nous avons utilisé durant cette recherche deux cytomètres différents. Le premier cytomètre utilisé est un FACS Calibur de BD Biosciences. Il est composé d'un laser principal à ion-argon, refroidi par circuit d'air, émettant un faisceau d'une longueur d'onde de 488nm avec des filtres d'émission à 530/30 nm (acquisition FL1), 585/42 nm (acquisition FL2) et >670nm (acquisition FL3) (cf. Annexe C). C'est avec ce laser principal qu'ont été mesurés les FSC et SSC. Ce cytomètre possède aussi un laser annexe — une diode rouge émettant à 633 nm avec un filtre d'émission à 661/16 nm (acquisition FL4). Les paramètres d'acquisition sont résumés Tab. II.5.

Nous avons utilisé pour les mesures de nos échantillons un débit d'injection de l'échantillon de 35µl/min et un temps d'acquisition généralement de 20sec. Les échantillons ont tous été mesurés en présence de billes fluorescentes F13081 (de diamètre 1µm, avec une excitation à 495nm et une émission à 505nm) à concentration fixe pour agir en tant que calibre permettant de corriger les diverses fluctuations expérimentales. De plus, nous avons effectué nos mesures avec ou sans HBR-2.5-DM (à 2µM), ainsi qu'avec ou sans un colorant membranaire, le FM4-64 ([N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide], avec une excitation à 488 nm et une émission à 640 nm, concentré à 50 µg/ml). Entre chaque mesure, le dispositif a été brièvement et manuellement nettoyé pour prévenir les contaminations entre les différentes mesures.

Tableau 1	FSC	SSC	FL1	FL2	FL3
Gain	E01	350	500	500	650
Seuil		52			
Type	Log				

**Tab. II.5. :** Tableau récapitulatif des paramètres d'acquisition du cytomètre FACS Calibur, pour les canaux utilisés.

Le second cytomètre utilisé est un MACSQuant VYB de Miltenyi Biotec. Il est composé d'un laser principal à diode émettant un faisceau d'une longueur d'onde de 561 nm avec des filtres d'émission à 586/15 nm (acquisition Y1), 615/20 nm (acquisition Y2), 661/20 nm (acquisition Y3) et >750 nm (acquisition Y4). C'est avec ce laser principal qu'ont été mesurés les FSC et SSC. Ce cytomètre possède aussi deux lasers annexes avec d'une part une diode violette

émettant à 405 nm avec des filtres d'émission à 450/50 nm (acquisition V1) et à 525/50 nm (acquisition V2), et d'autre part une diode émettant à 488 nm avec des filtres d'émission à 525/50 nm (acquisition B1) et à 614/50 nm (acquisition B2) (cf. Annexe B). Les mesures de nos échantillons se sont effectuées en utilisant les canaux d'acquisition FSC, SSC, B1 (fluorescence GFP et FAST : HBR 2.5 DM), Y2 (fluorescence mCherry) et Y3 (colorant membranaire FM 4-64, marquant toutes nos bactéries). Les paramètres d'acquisition sont résumés Tab. II.6.

Le débit d'échantillon a été de 25µl/min, pour une mesure de 20µl d'échantillon d'un échantillon d'au moins 800µl. Les échantillons ont tous été mesurés avec ou sans HBR-2.5-DM (à 2µM) ainsi qu'avec ou sans colorant FM4-64. Avant chaque mesure, les échantillons sont resuspendus par le cytomètre, et entre chaque mesure un lavage est effectué.

Tableau 1	FSC	SSC	B1	Y2	Y3
Gain	430	350	566	508	438
Seuil	2	1			
Type	hyperLog				

**Tab. II.6.** : Tableau récapitulatif des paramètres d'acquisition du cytomètre MACSQuant VYB, pour les canaux utilisés.

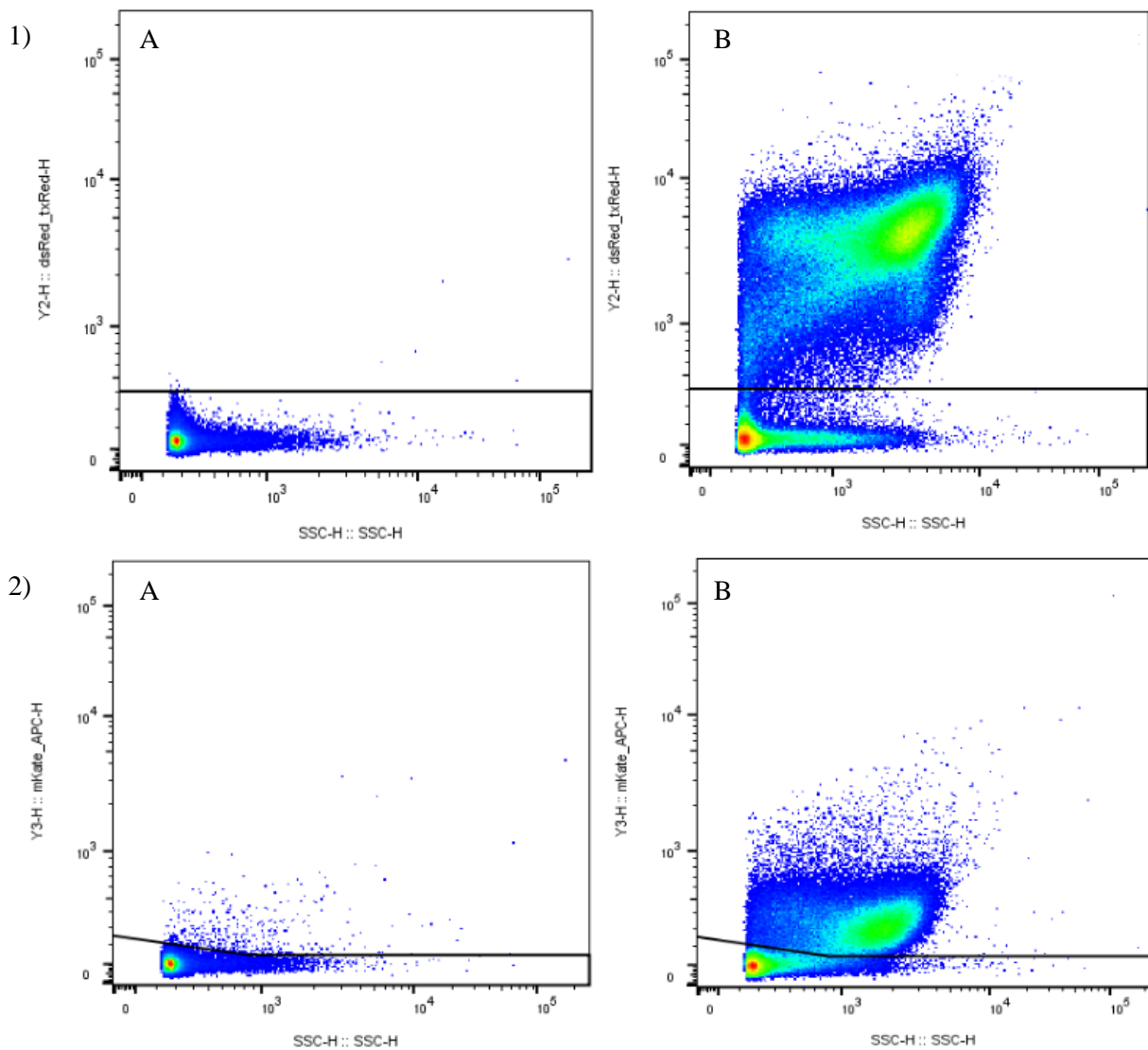
Pour des raisons historiques, nous avons utilisé d'abord le FACS Calibur car déjà présent au Laboratoire Jean Perrin. Cependant, ce premier cytomètre ne possédant qu'un laser 'bleu' ne permet pas de détecter la mCherry. Nous avons donc également utilisé le MACSQuant VYB présent à la plate-forme de l'Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), qui offre une beaucoup plus grande gamme d'excitation et d'émission.

## II.5.C. Analyses de cytométrie en flux

### II.5.C.1. Mise au point de l'analyse MACSQuant VYB

Les données obtenues par MACSQuant VYB ont été analysées en utilisant le logiciel FlowJo. Nous avons analysé les données produites sous une représentation point par point sur un graphique 2D (dotplot), avec en abscisse le SSC. La détection de *Pseudomonas fluorescens* est effectuée par une détermination directe dans un canal d'acquisition de la fluorescence de la mCherry (Y2), dans une zone ne considérant que les bactéries fluorescentes en comparaison avec les acquisitions effectuées sur le tampon (Fig II.6-1). Le seuil de détermination de cette zone est fixé à 400 a.u.. De la même manière, nous avons fixé la zone de détermination de *Bacillus thuringiensis*, dans le canal d'acquisition des fluorescences de la GFP et du complexe FAST : HBR-

2.5-DM (B1), avec pour seuil 600 a.u.. De plus, en utilisant le colorant exogène (FM4-64), nous avons pu déterminer l'ensemble de la population de bactéries de nos échantillons, via un autre canal d'acquisition des fluorescences rouge (Y3). La zone de détermination a été mis en place avec des échantillons de *Rhodocyclus sp.*, car cette bactérie est la plus difficile à caractériser en cytométrie, avec un seuil changeant avec la valeur de SSC en abscisse (Fig II.6-2), et fonctionne pour toutes les bactéries de la communauté 4S. Nous avons ensuite confirmé ces zones en regardant leur efficacité à exclure les cellules non fluorescentes : *Bacillus thuringiensis*, *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.* en Y2 pour la détermination de *Pseudomonas fluorescens* ;



**Fig. II.6. :** Dotplots des mesures de cytométrie, réalisé avec le MACSQuant VYB, de buffer MACSQuant en 1-A) et 2-A), et de cellules issues d'extraction de biofilm mono-espèce *Pseudomonas fluorescens* 1-B) et de *Rhodocyclus sp.* 2-B). Les dotplots 1) représentent l'intensité de fluorescence de la mCherry (Y2) en fonction de la SSC des objets mesurés. Les dotplots 2) représentent l'intensité de fluorescence rouge (Y3) du colorant FM4-64 marquant les cellules en fonction de la SSC des objets mesurés.

*Pseudomonas fluorescens*, *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.* en B1 pour la détermination de *Bacillus thuringiensis* ; et en l'absence de colorant en Y3.

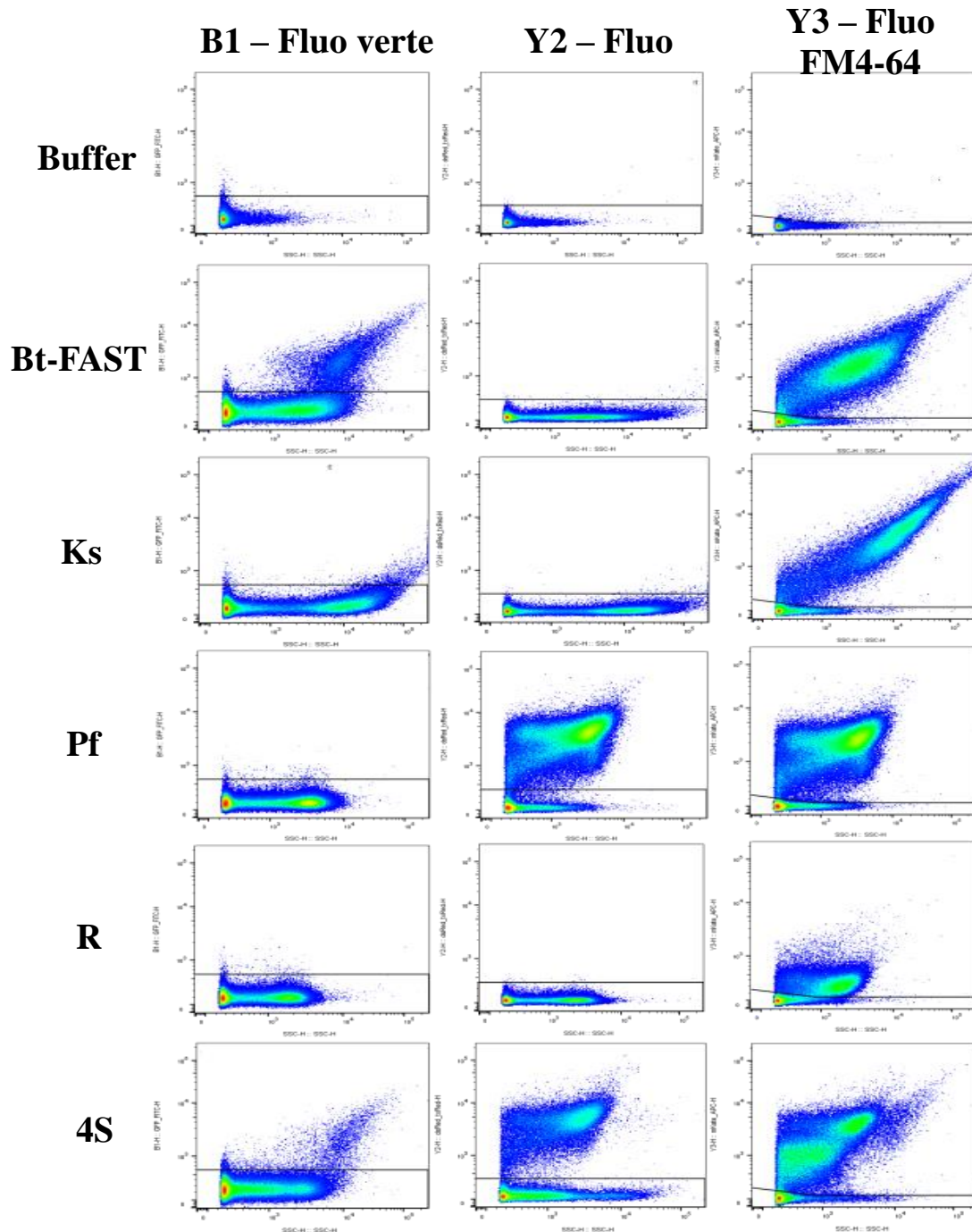
Enfin, dans le contexte de mélange d'espèces, nous avons mis en place une méthode pour différencier les souches. Les fluorescences ressortent dans les canaux d'acquisition B1 et Y2, respectivement pour *Bacillus thuringiensis* et *Pseudomonas fluorescens*. Une zone spécifique de *Rhodocyclus sp.* en Y3 est contenue entre 600 et 4000 a.u. en canal SSC et entre 150 et 800 a.u. en canal Y3. Enfin, la détermination de *Kocuria salsicia* en cas de mélange d'espèces se fait en prenant la population globale fluorescente en Y3 avec FM4-64, et en soustrayant les autres espèces (Fig. II.7).

## II.5.C.2. Mise au point de l'analyse FACS Calibur

Les données obtenues par FACS Calibur ont été analysées en utilisant le logiciel dédié CellQuest Pro. Nous avons analysé les données produites sous la même représentation qu'avec le MACSQuant VYB, en dotplot, avec le signal FSC en abscisse et les canaux de fluorescence ou de SSC en ordonnée. Un seul canal de données pouvait clairement différencier une des souches fluorescentes, *Bacillus thuringiensis* en GFP aussi bien qu'en FAST : HBR-2.5-DM : le canal FL1, au-dessus d'une valeur de 9 a.u. d'intensité et en-dessous de 3000 a.u.. De plus, en utilisant le canal FL3, une zone spécifique aux *Pseudomonas fluorescens* a pu être déterminée entre 7 et 100 a.u. d'intensité de FL3 et entre 1 et 50 a.u. de FSC. En combinant le canal FL3 au FM4-64, nous avons pu déterminer le nombre de bactéries totales (*Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.* seul ou dans différents mélanges) dans mes échantillons entre 7 a.u. et 3000 a.u. d'intensité de FL3 (Fig. II.8).

Cependant, ces zones spécifiques, déterminées via l'étude de cultures liquides et d'échantillon de biofilm en condition mono-espèces, se superposent avec les autres souches, à l'exception du cas de *Bacillus thuringiensis* en FL1, en fonction de leur phase de croissance, des conditions de culture et des cellules non-fluorescentes qui auraient dû l'être (cf. annexe C). Cela a limité l'interprétation des données en condition de mélanges artificiels issus de cultures planctoniques ou expérimentaux issus de biofilm. Une méthode a néanmoins été développée en prenant la population de *Bacillus thuringiensis* seulement via le canal FL1, les *Kocuria salsicia* en considérant les grands objets non fluorescents dans le canal FL1 (FSC supérieur à 35 a.u.), les *Pseudomonas fluorescens* via leur présence en FL3 sans colorants exogènes, et R en prenant la population globale, moins les autres espèces.

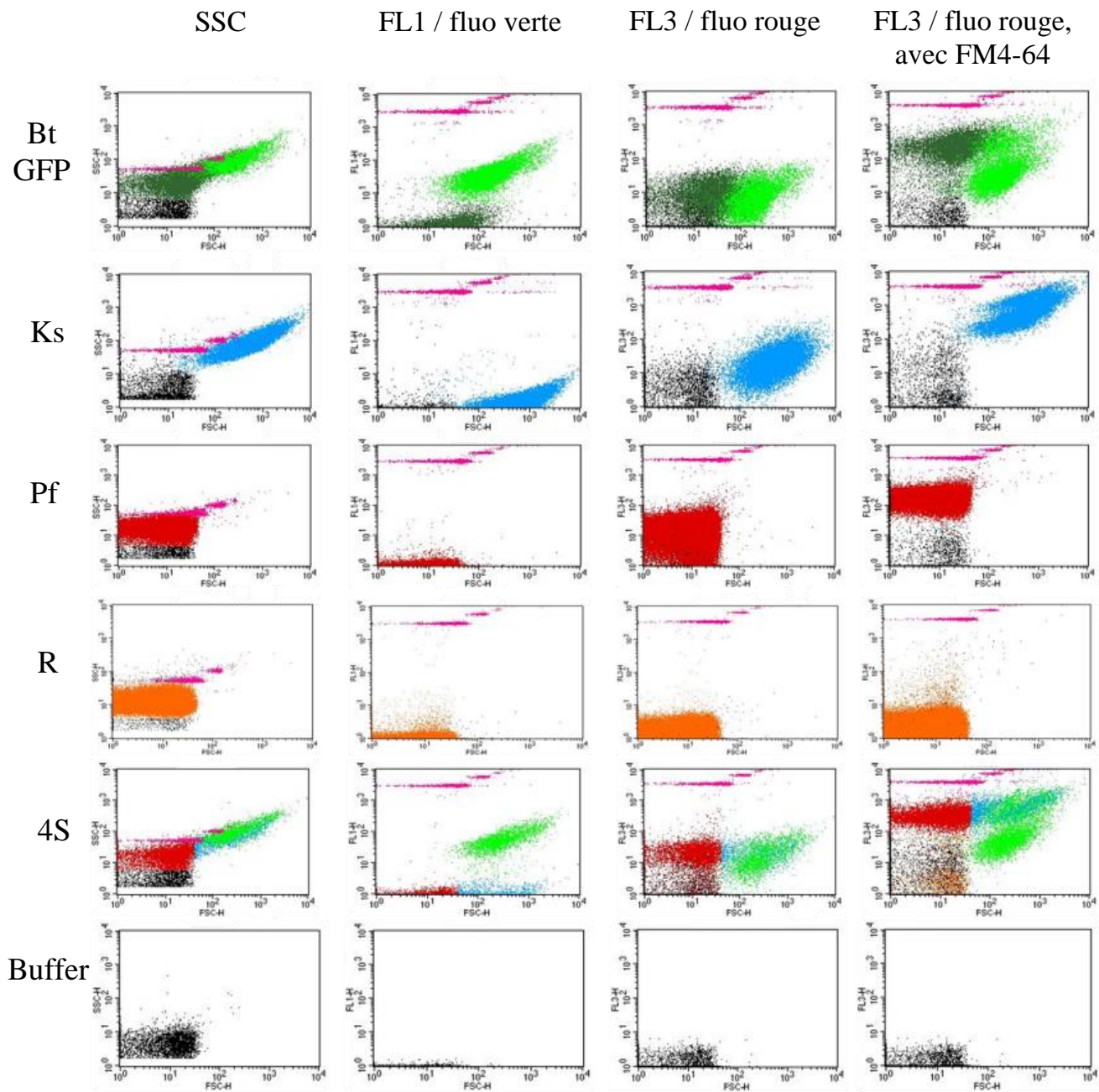
De plus, un témoin constitué de billes fluorescentes ajoutées à chaque mesure, et à concentration connue, a permis d'appliquer un coefficient correcteur dépendant de la concentration des échantillons. En effet, un échantillon trop ou trop peu concentré est mesuré



**Fig. II.7 :** Mosaïque des dotplots types obtenus avec le cytomètre MACSQuant VYB. Les dotplots représentent les différents canaux d’acquisition de fluorescence (de gauche à droite : B1 pour GFP, FAST ; Y2 pour mCherry ; Y3 pour FM4-64) en fonction du SSC. La composition des échantillons est spécifiée à gauche (de haut en bas : Buffer MACSQuant ; Bt pour *Bacillus thuringiensis*, ici exprimant FAST ; Ks pour *Kocuria salsicia* ; Pf pour *Pseudomonas fluorescens* ; R pour *Rhodocyclus sp.* ; 4S pour la communauté 4 espèces.



incorrectement, mais même à des concentrations correctes des variations peuvent être observées d'une mesure à l'autre.



**Fig. II.8. :** Mosaïque d'acquisitions de cytométrie effectuées avec le FACS Calibur sur des échantillons de biofilms 4S (1<sup>ère</sup> ligne) et mono-espèces de Bt-GFP, de Ks, de Pf, de R et de buffer de dilution des échantillons (de la 2<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> ligne dans cet ordre). Les colonnes représentent les différents canaux d'acquisition : SSC, FL1, FL3, FL3 avec ajout de FM4-64 (de gauche à droite). Sur ces représentations des mesures de cytométrie, chaque point représente un évènement de Bt-GFP (vert), Ks (bleu), Pf (rouge), R (orange), billes F13081 (rose) et de bruit de fond (noir).



Enfin, nous avons observé une limitation à la détermination des populations bactériennes via la fluorescence. En effet, il est apparu qu'une portion des bactéries de ces populations exprimant une protéine fluorescente sur plasmide perd sa fluorescence au cours du temps. Cette portion change en fonction des espèces et des types de cultures, et le stade de ces cultures. Ainsi, nous avons déterminé une perte : jusqu'à 50% des Bt-gfp et Bt-Yfastp ; jusqu'à 20% pour *Pseudomonas fluorescens*, seulement en cultures planctoniques, et < 5% en biofilm.





### **III. Résultats et interprétations**



# **III.1. Rapporteurs génétiques fluorescents en biofilm bactérien. Introduction d'un nouveau rapporteur à fluorescence inductible : FAST.**

Pour mieux comprendre les mécanismes de formation des biofilms bactériens, nous cherchons à développer un suivi cinétique en temps réel de paramètres caractéristiques tels que la quantité de biomasse formée et sa distribution spatiale. Le premier enjeu de ces travaux est un enjeu technique qui demande de mettre en œuvre des marqueurs fiables des bactéries en biofilm.

Les progrès récents vis-à-vis des protéines fluorescentes codées génétiquement ont conduit au développement d'approches de microscopie à fluorescence pour l'imagerie des biofilms. Prodiguant en principe spécificité moléculaire et résolution temporelle et spatiale dans les cellules vivantes, les protéines fluorescentes de la famille GFP sont largement utilisées depuis deux décennies pour suivre l'expression des gènes, marquer des souches spécifiques ou mesurer des fonctions spécifiques dans les biofilms vivants. Cependant, les analyses quantitatives et les études sur les biofilms peuvent être gênées par la sensibilité de la fluorescence des protéines fluorescentes au niveau d'oxygène du milieu. En effet, l'étape finale de la maturation des chromophores, qui confère la capacité de fluorescence à la protéine, implique une étape de déshydrogénation, dépendante de l'oxygène, nécessitant un niveau minimal d'oxygène moléculaire. Cependant, dans les biofilms, la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> résultant de l'équilibre des processus de consommation et de diffusion entremêlés est hétérogène, mal caractérisée et très dépendante des conditions environnementales et du stade du biofilm.

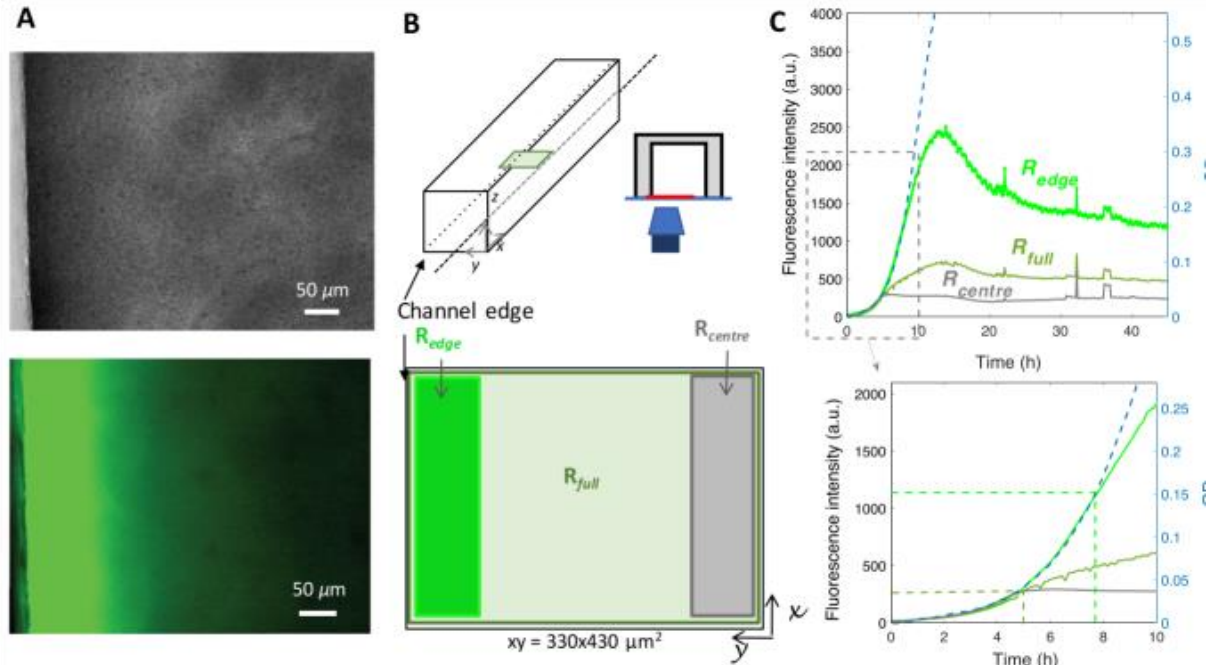
Pour éclaircir ce point, nous nous sommes intéressés au suivi des signaux des protéines fluorescentes de la famille GFP, en biofilm bactérien, en particulier à l'utilisation de la GFP et la mCherry d'un biofilm en croissance. Nous avons montré les limites de ces marqueurs fluorescents et comment les surmonter par la mise en place d'une nouvelle protéine à fluorescence inductible : FAST, qui fluoresce à 552nm en complexe avec l'HBR-2.5-DM avec une excitation à 494nm, et en rouge (600nm) en complexe avec l'HBR-3.5-DOM avec une excitation à 518nm (M. A. Plamont et al., 2016). Nous avons caractérisé et comparé cette protéine FAST aux deux protéines fluorescentes précédemment utilisées.

Nous avons choisi de mener cette étude sur des biofilms d'*Escherichia coli* bien connus et bien caractérisés au laboratoire (Thomen et al., 2017). Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue « Scientific Reports » (Monmeyran et al., 2018), et ce chapitre résume le travail présenté dans cette publication.

## III.1.A. Linéarité et distribution spatio-temporelle de la fluorescence de la GFP et représentativité avec la $\mu$ OD

Nous avons utilisé différentes souches génétiquement modifiées pour produire les différentes protéines fluorescentes (cf. II.1.A). Les bactéries ont suivi un protocole de pré-culture (cf. II.1.C) puis elles ont été inoculées dans des canaux milli-fluidiques de dimension 1x1x30mm en PDMS (cf. II.2) utilisés pour la vidéo microscopie, sous un flux à 1mL/h de milieu nutritif.

Nous avons tout d'abord étudié la distribution spatiale de la fluorescence de la GFP produite par *Escherichia coli*. Pour ce faire, nous avons recueilli les intensités de fluorescence et de  $\mu$ OD au cours du temps sur plusieurs zones du champs d'acquisition de vidéo-microscopie acquis en bord du canal (Fig. III.1.1-A) : une zone contenant le champ global d'acquisition  $R_{full}$ , une zone resserrée contre le bord du canal  $R_{edge}$  et une dernière zone au centre du canal  $R_{centre}$  (Fig. III.1.1-B). Nous avons comparé les cinétiques de fluorescence et de  $\mu$ OD de ces zones (Fig. III.1.1-C). Notre première observation a été que la  $\mu$ OD et la fluorescence se superposent pour la zone  $R_{full}$  durant les 5 premières heures de croissance du biofilm, divergent ensuite pour le reste des expériences où la  $\mu$ OD continue de croître et la fluorescence sature. De plus, en comparant les cinétiques des différentes zones  $R_{full}$ ,  $R_{edge}$  et  $R_{centre}$ , nous avons remarqué que la cinétique de l'intensité de fluorescence varie d'une zone à l'autre, en intensité et en forme de cinétique, et que la fin de la période de superposabilité de la  $\mu$ OD et de la fluorescence prend fin au bout de 5h pour  $R_{centre}$  et après 7h30 pour  $R_{edge}$ . Nous en avons conclu qu'à partir d'un certain développement du biofilm, la quantité de GFP synthétisée par les cellules ne varie plus linéairement avec le nombre de cellules estimé via la  $\mu$ OD, contrairement à ce qui est attendu pour un gène exprimé de manière constitutive. D'autre part, cette divergence est plus forte et rapide à apparaître au centre du canal qu'au bord, dans nos conditions hydrodynamiques, alors que la biomasse générée est similaire sur toute la surface du canal observée. Cela suggère qu'un facteur environnemental distribué de manière asymétrique affecte le marqueur fluorescent.



**Fig. III.1.1 :** L'intensité de fluorescence de la GFP dans un biofilm de *E.coli* montre des gradients et une cinétique inattendus. A) Images en lumière transmise (haut) et en fluorescence (bas) d'un biofilm de *E.coli* au bord d'un canal après 24h de croissance sous un flux continu de 1ml/h de milieu nutritif. B) En haut, le schéma d'un canal milli-fluidique (1x30mm) en PDMS monté sur un microscope pour réaliser des images en temps réel de biofilm en lumière transmise et en fluorescence. En bas, le schéma d'un champ d'acquisition de 330x430 $\mu\text{m}^2$  imagé avec un objectif 20x. Sur ce schéma sont définies les régions  $R_{full}$ ,  $R_{edge}$  et  $R_{centre}$ . C) En haut, les courbes d'intensité de fluorescence des différentes régions (axe de gauche) :  $R_{full}$  (vert pâle),  $R_{edge}$  (vert) et  $R_{centre}$  (gris) ; ainsi que la courbe de la  $\mu\text{OD} = \text{Ln}(I_0/I)$  (bleu pointillé) de la région  $R_{full}$  (axe de droite). En bas, un zoom de ces mêmes courbes sur les 10 premières heures.

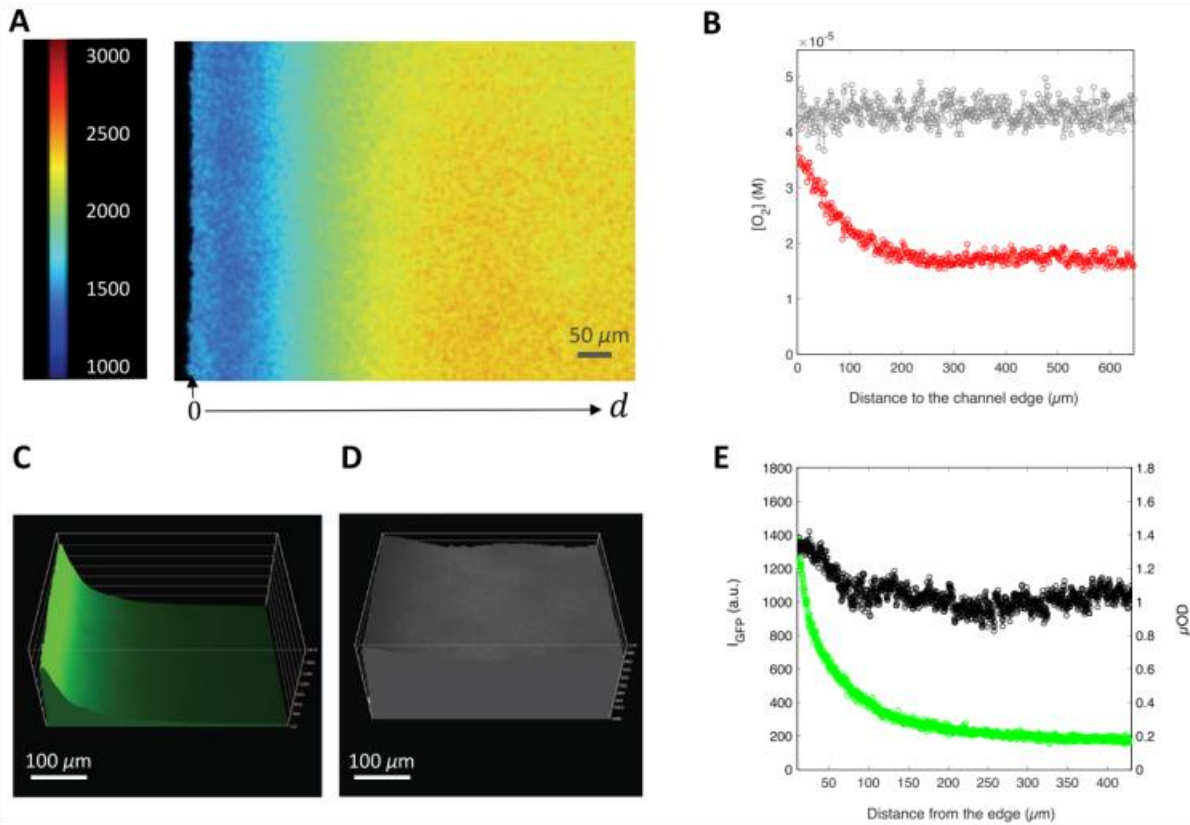
## III.1.B. Impact de la concentration hétérogène en $\text{O}_2$ sur la fluorescence de la GFP en biofilm

Il est connu depuis le début de l'emploi des protéines fluorescentes de la famille GFP, que ces protéines ont besoin d'une étape d'oxydation pour se conformer correctement, et pouvoir fluorescer, nécessitant une certaine concentration en  $\text{O}_2$  dans le milieu (Heim, Prasher, & Tsien, 1994; Tsien, 1998). Dans cette partie, nous avons trouvé que la fluorescence de la GFP est



contrôlée par la concentration en  $O_2$  du milieu, et qu'il existe un seuil en-dessous duquel la conformation correcte de la GFP n'a plus lieu. Dans un biofilm en croissance, la consommation d' $O_2$  augmente avec le nombre des cellules qui le composent — le taux d' $O_2$  chutant potentiellement en dessous du seuil de concentration requise pour une conformation correcte des protéines de type GFP.

Nous avons montré cela en mesurant la distribution de l'oxygène dans des biofilms âgés d'environ 20h, en utilisant des micelles fonctionnalisées avec des complexes de Ruthénium fluorescent présentant un temps de vie de fluorescence dépendant de l'oxygène. Ces micelles ont été injectées dans les biofilms puis on a mesuré le temps de vie de fluorescence du complexe en microscopie (Fig. III.1.2-A) afin d'obtenir la distribution spatiale de l'oxygène (Fig. III.1.2-B) dans



**Fig. III.1.2 :** Dans un biofilm vivant, le fort gradient latéral de fluorescence de la GFP correspond au gradient latéral de la concentration en oxygène. (A) Image du temps de vie en fluorescence d'un biofilm mature de *E.coli*, après 20 heures de croissance, alimenté en continu avec un flux à 1 ml/h de milieu nutritif contenant des micelles de Ruthénium à une concentration finale en Ruthénium de 8  $\mu$ M. Le champ d'acquisition s'étend du bord au centre du canal sur 500  $\mu$ m de la longueur du canal, et capture une couche de biofilm de  $7 \pm 2$   $\mu$ m d'épaisseur près du fond du canal. La barre de couleur est en nanosecondes. (B) Distribution spatiale de la concentration molaire d'oxygène extraite de l'image de temps de vie en faisant la moyenne de 3 lignes de pixels contiguës pour les micelles de Ruthénium seules (gris) ou en présence du biofilm (rouges). (C, D) montrent la distribution spatiale de la fluorescence de la GFP (C) et de la  $\mu$ OD (D) d'un biofilm équivalent, ainsi que le graphe (E) des valeurs prises sur chaque image le long de la même ligne y sur ces deux images (C,D).

le canal. Nous avons ensuite comparé cette distribution spatiale à celle des intensités de fluorescence et de  $\mu\text{OD}$  mesurées dans les mêmes conditions (Fig. III/1/2-C,D). Nous avons alors remarqué que les profils de distribution spatiale de l'intensité de fluorescence et de l' $\text{O}_2$  sont corrélés, avec un fort niveau au bord du canal et un faible niveau au centre (Fig. III.1.3-B,E), alors que la distribution spatiale de la  $\mu\text{OD}$  ne montre pas de différence importante entre le bord et le centre (Fig. III.1.2-D,E). L'établissement de ce gradient d'oxygène est cohérent avec la perméabilité attendue du PDMS à l'oxygène.

Ces résultats montrent les limites de l'utilisation la GFP pour l'étude des biofilms. Le même comportement a aussi été obtenu avec la protéine mCherry, ce qui tend à généraliser nos conclusions à toute la famille des protéines de type GFP.

### III.1.C. Comparaison FAST avec la GFP et la mCherry en contexte de biofilm croissant

Nous cherchions donc une alternative lorsque nous avons pris connaissance des travaux d'Arnaud Gautier dédiés à un nouveau système de marquage des cellules vivantes engageant une protéine fluorogène, FAST (M.-A. Plamont et al., 2015). Initialement, cette protéine a été développée pour pouvoir marquer de manière réversible, rapide et non toxique des cellules, et pour développer une nouvelle méthode pour effectuer une imagerie de multiplexage séquentiel.

FAST est une protéine de 14 kDa évoluée à partir de la protéine photo-activable (PYP) issue de *Halorhodospira halophila* (M. A. Plamont et al., 2016). La protéine FAST peut se lier un analogue fluorogène synthétique de l'hydroxybenzyliden rhodanine (HBR) pour former un complexe fluorescent (Li et al., 2016). Cette fluorescence due à la fixation d'une molécule HBR n'est donc pas liée à la concentration en  $\text{O}_2$  du milieu. Plusieurs fluorogènes différents ont été mis au point, formant des complexes de propriétés de fluorescence distinctes (Tab. III.1.1).

Dans nos expériences, nous avons utilisé deux HBR : l'HBR-3.5-DOM (en complexe avec FAST, fluoresce en rouge) que l'on peut utiliser en combinaison avec la GFP ; et l'HBR-2.5-DM (en complexe avec FAST, fluoresce en vert) utilisable avec des cellules exprimant la mCherry (cf. II.1.B).

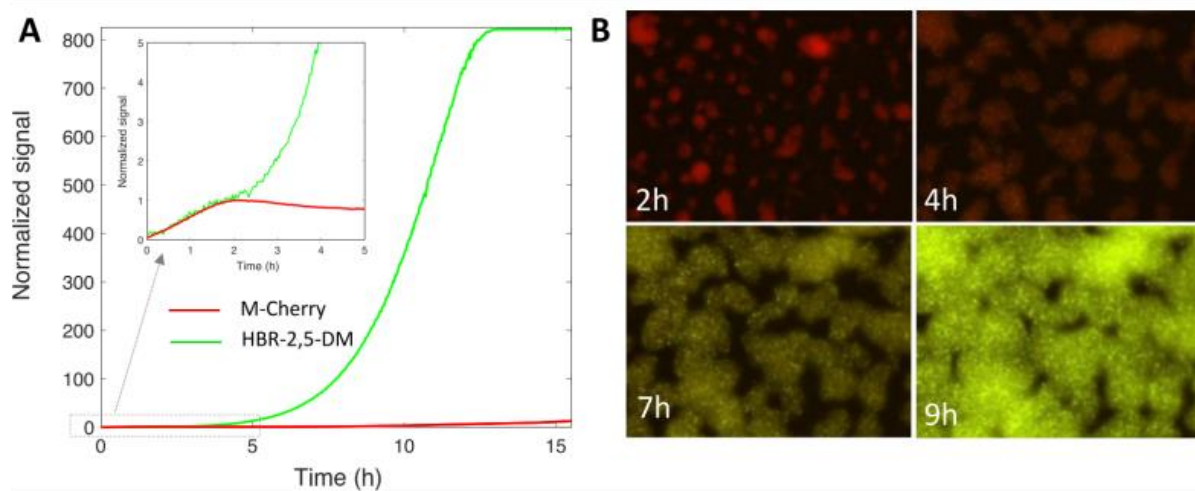
En étudiant les cinétiques des courbes de fluorescence du complexe FAST : HBR-2.5-DM et de la mCherry (Fig. III.1.3-A), nous avons remarqué une divergence de ces cinétiques au cours de la formation du biofilm après 2h de croissance, comme attendu. Ces résultats ont aussi été obtenus avec la comparaison de la GFP et du complexe FAST : HBR-3.5-DOM après 5h de croissance du

biofilm (plus de détails dans le papier, ci-après). Nous avons pu aussi observer le passage de la dominance de la fluorescence de la mCherry au complexe FAST, via l'observation de la vidéo-microscopie en superposition des deux fluorescences (Fig. II.1.3-B).

Nous avons ainsi conclu à l'efficacité et à la linéarité du complexe FAST : HBR comme rapporteur fluorescent dans le contexte hétérogène et à faible concentration en O<sub>2</sub> qu'est un biofilm en croissance.

Complexes	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\Delta\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\epsilon$ (mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	$\phi$ (%)	$F_{\text{bound}} / F_{\text{unbound}}$	Brightness	$K_D$ ( $\mu\text{M}$ )
FAST:HMBR	481	80	540	45	23	300	10300	0.13
FAST:HBR-3E	481	81	543	50	13	300	6500	0.08
FAST:HBR-2.5DM	494	88	552	50	29	430	14500	0.008
FAST:HBR-3.5DM	499	98	562	48	49	660	23500	0.08
FAST:HBR-3OM	494	81	561	40	36	350	14400	0.31
FAST:HBR-3OE	497	84	562	41	17	230	7000	0.27
FAST:HBR-3.5DOM	518	112	600	39	31	220	12000	0.97

**Tab. III.1.1 :** Propriétés physico-chimiques des complexes FAST:fluorogène en PBS à pH 7.4. Les abréviations utilisées sont :  $\lambda_{\text{abs}}$ , la longueur d'onde d'absorption maximale ;  $\lambda_{\text{em}}$ , la longueur d'onde d'émission maximale ;  $\Delta\lambda_{\text{abs}} = \lambda_{\text{abs,bound}} - \lambda_{\text{abs,unbound}}$ , le décalage dans le rouge de l'absorption en complexe avec FAST ;  $\epsilon$ , le coefficient d'absorption molaire à  $\lambda_{\text{abs}}$  ;  $\phi$ , le rendement quantique de fluorescence ;  $F_{\text{bound}} / F_{\text{unbound}}$ , l'activation de la fluorescence un fois en complexe avec FAST ; Brightness =  $\epsilon \times \phi$  ;  $K_D$ , la constante de dissociation thermodynamique. (Li et al., 2017)



**Fig. III.1.3 :** FAST, fluorescent en vert avec HBR-2.5-DM, surpasse de loin mCherry, fluorescent en rouge, dans un biofilm vivant. (A) Cinétique d'intensité de fluorescence de mCherry (rouge) et FAST : HBR-2.5-DM (verte) à partir d'un biofilm d'*E.coli* en croissance exprimant la protéine de fusion FAST-mCherry. Le signal sur le graphique a été normalisé à 1 à l'instant  $t = 2h$ , ce qui correspond au temps de saturation de la mCherry. L'encart montre un zoom avant sur les 5 premières heures de croissance du biofilm. (B) Superposition d'images de fluorescence de mCherry et de FAST recueillies à différents moments de la croissance du biofilm. Le temps d'acquisition des images dans chaque canal a été choisi pour capturer l'ensemble de la dynamique du signal, induisant un changement de couleur saisissant de l'émission rouge mCherry, dominant le signal dans les 2 premières heures de la croissance, à l'émission jaune-vert de FAST qui dépasse largement celle de mCherry après quelques heures de croissance.

# **The inducible chemical-genetic fluorescent marker FAST outperforms classical fluorescent proteins in the quantitative reporting of bacterial biofilm dynamics.**

Amaury Monmeyran<sup>1</sup>, Philippe Thomen<sup>1</sup>, Hugo Jonquière<sup>1</sup>, Franck Sureau<sup>1</sup>, Chenge Li<sup>2</sup>, Marie-Aude Plamont<sup>2</sup>, Carine Douarche<sup>3</sup>, Jean-François Casella<sup>1</sup>, Arnaud Gautier<sup>2</sup> and Nelly Henry<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire Jean Perrin, CNRS UMR 8237 Sorbonne Université & UPMC Université Paris 06 , F-75005, Paris, France

<sup>2</sup>PASTEUR, Département de Chimie, École Normale Supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France.

<sup>3</sup>Laboratoire de Physique des Solides, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay Cedex, France

# Abstract

To progress in the understanding of the bacterial biofilm complexity, real time quantitative analyses of the living community functions are required. To this goal accurate fluorescent reporters are needed. In this paper, we reconsider the use of the classical fluorescent genetic reporters of the GFP family and demonstrate their limited use in the context of a living biofilm. We point out the signal saturation occurring after only a few hours of growth and relate it to the reduction of oxygen concentration induced by bacterial consumption. This characteristic rules out the use of these markers for quantitative measurement in living biofilms. To overcome this shortcoming, we propose the use of a recently introduced small protein tag, FAST, which becomes fluorescent in the presence of an exogenously applied fluorogenic dye, enabling to avoid the oxygen sensitivity issue. We confront the efficiency of the FAST system with that of GFP and mCherry to report both gene expression and biofilm growth, and conclude to the clear-cut superiority of the FAST:fluorogen probes for investigating dynamics in the complex environment of the living biofilm.

# Introduction

Bacterial biofilms are confined, three-dimensional communities of adherent microbes. They display an outperforming specific lifestyle which raises a number of fundamental and practical questions drawing interest from various disciplines<sup>1-6</sup>. Molecular biology advances have pointed out hundreds of genes, the expression of which is altered in biofilm-dwelling cells compared to their planktonic counterparts<sup>7-8</sup>. Yet, no biofilm-specific gene has been identified so far<sup>9</sup>, suggesting biofilm key properties might emerge from the subtle interplay between the special physico-chemical properties the cells are subjected to in the biofilm and the elicited biological responses. Besides, a central feature of these fascinating living communities is their microscale structural, chemical and biological heterogeneity<sup>10,11</sup>, a property reflexively interrelated with the multiple gradients of nutrients, metabolites, oxygen and others molecules or ions present in the material. Therefore, biofilm description relying on data averaged on the whole population is blurred and the clarification of the mechanisms behind development and thriving of adherent communities is calling for spatially-resolved approaches. Thus, biofilm quantitative descriptors of both gene expression and physico-chemical quantities shall be probed at the local scale with a sufficient spatial resolution to seize the biofilm heterogeneity and its implications for the community progress. This situation, together with the advent of genetically encodable fluorescent proteins<sup>12</sup> has logically boosted up the development of fluorescence microscopy approaches for biofilm imaging<sup>13</sup>. Providing in principle molecular specificity, time and space resolution in living cells, the popular green fluorescent protein (GFP) and its train of colour variants have been broadly used for two decades now to monitor gene expression in living biofilms, either constitutively produced as a strain occurrence marker<sup>14-20</sup>, or in a protein fusion to measure a specific function in the biofilm<sup>21-25</sup>. However, deriving quantitative information from these reporters in a biofilm may turn out to be a risky task due to the sensitivity of the fluorescence of these proteins to oxygen level. Indeed, the final step of the chromophore maturation, which confers the ability to fluoresce to the protein, involves an oxygen-dependent dehydrogenation step requiring a minimal level of molecular oxygen<sup>26,27</sup>. Meanwhile, into the biofilm, the spatio-temporal distribution of O<sub>2</sub> which results from the balance of intermingled diffusion and consumption processes, is heterogeneous, poorly characterized and very dependent on the environmental conditions and the biofilm stage.

In this paper, we investigate quantitatively the fluorescence spatio-temporal profiles of two proteins belonging to the pool of the classical widely spread fluorescent genetic reporters, GFP and mCherry constitutively expressed in the *Escherichia coli* strain we used to grow a biofilm under controlled fluid flow. We show that both GFP and mCherry exhibit fluorescence kinetics quickly becoming inconsistent with the cell biomass development. By contrast the spatio-temporal profiles appeared to closely match the oxygen shortage that arises as the biofilm develops.

To find out a solution to this problem, we tested the ability of a new small protein tag, FAST (Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag), to report linearly on gene expression in the low-oxygen environment of the biofilm. Engineered by directed evolution, FAST holds its fluorescence from the dynamic and fully reversible binding of a small synthetic fluorogenic chromophore (so-called fluorogen) involving no oxidation step<sup>28</sup>. This feature enables to expect surmounting the issue of the low oxygen sensitivity of the reporter. By monitoring, the spatio-temporal distribution of GFP and FAST fluorescence in the same biofilm growing under flow, we show that the signal of the two proteins displays remarkably distinct spatial distributions and kinetics soon after biofilm starts to grow. Our findings also show that in a mature biofilm FAST reports biomass spatial heterogeneity while GFP does not. Confronted to micro-optical density measurements ( $\mu$ OD), previously shown to linearly report biofilm growth in a limited range of values<sup>29</sup>, FAST fluorescence appears to outmatch  $\mu$ OD saturation, exhibiting an exponential increase well beyond  $\mu$ OD signal inflexion. Using fluorogens with different spectral properties, we achieve biofilm labelling at distinct wavelengths and obtain similar results in experiments challenging mCherry fluorescence.

Altogether, our results demonstrate that the highly heterogeneous spatial and temporal distribution of oxygen in the biofilm strongly affects the fluorescence of the classical GFP-derived genetic reporters and

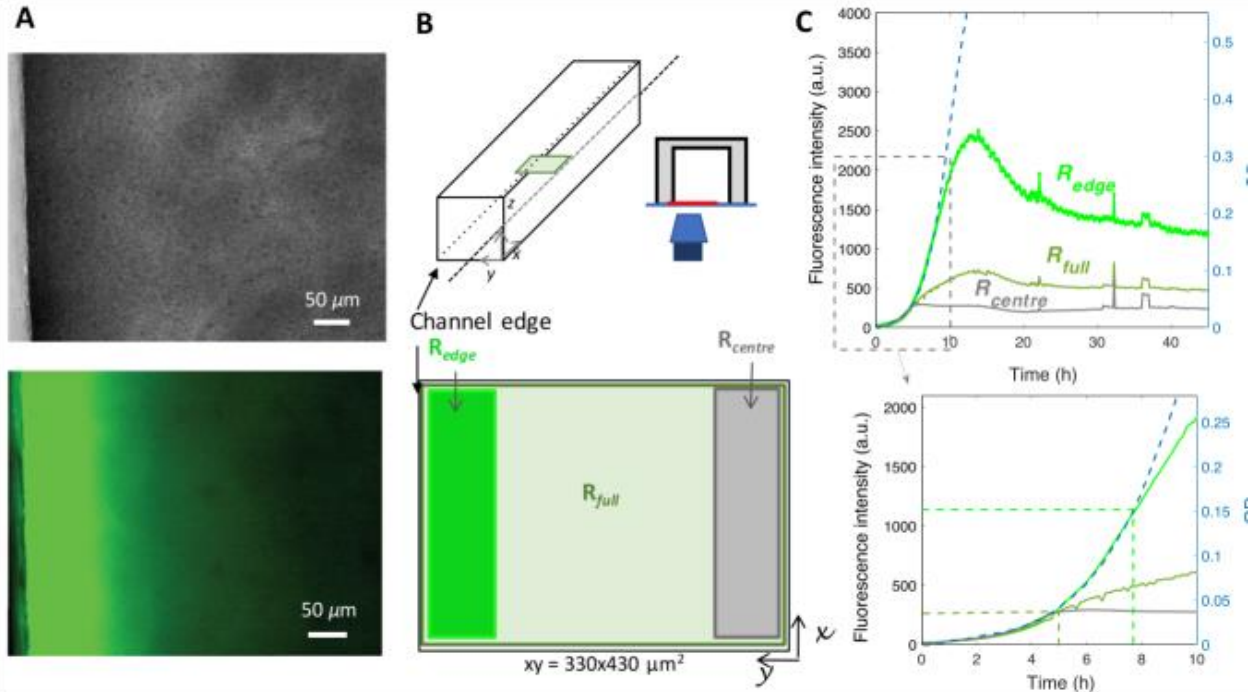
therefore severely deceives the quantitative *in situ* measurement and interpretation of gene expression within a living biofilm. The recently introduced small protein tag, FAST<sup>28</sup>, which fluoresces in the presence of an exogenously applied fluorogenic dye, offers an outstanding answer to this issue, enabling accurate measurement of gene expression in the biofilm, irrespective of the oxygen gradients.



# Results

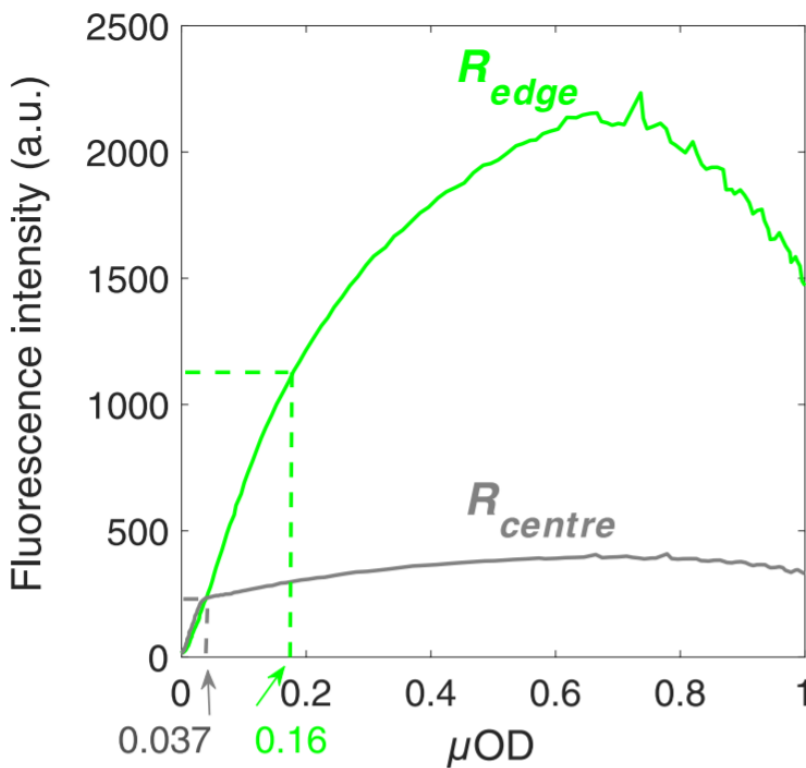
## Spatiotemporal distribution of GFP fluorescence does not linearly report on gene expression

To quantitatively evaluate the spatio-temporal distribution of the most classical genetic reporter — *GFP* — in the confined environment of an adherent bacterial community, we initiated the growth of a biofilm of *E. coli* cells constitutively expressing the pilus *F* to promote biofilm formation<sup>30</sup> and the fluorescent protein GFP (GFPmut3) in a PDMS channel continuously supplied with growth medium at a flow rate of 1 mL/h. The growing biofilm was monitored by collecting bright field and fluorescence images at a frequency of 12 images per hour (1 image every 5 min). As previously shown, the bright field images were converted in microscopic optical density ( $\mu\text{OD}$ ) values which linearly reported cell biomass<sup>29</sup>. GFP fluorescence intensity ( $I_{\text{GFP}}$ ) and  $\mu\text{OD}$  were derived from the image stack reporting the first 24 hours of the biofilm growth. For each image (Fig. 1A), the mean values of intensity were averaged either over the whole field of view or over smaller regions of interest (ROIs) located on the edge or the centre of the channel as shown in Fig. 1B.  $I_{\text{GFP}}$  and  $\mu\text{OD}$  kinetics, initially overlapping, strongly diverged after 5 hours of growth. Thereby, our first



**Figure 1:** GFP fluorescence intensity in a living biofilm of *E. coli* displays unexpected spatial gradients and kinetics. (A) Brightfield (upper panel) and fluorescence (lower panel) images of an *E. coli* biofilm at the channel side wall vicinity after 24 hours growth under a continuous 1 ml/h nutrient flow. (B) Sketch of the square (1 mm × 1mm) PDMS channel, 3 cm length mounted on a microscope stage for real time imaging of biofilm light transmission and fluorescence. A 330 × 430 μm<sup>2</sup> field of view is imaged using a 20× objective. Defined regions of interest,  $R_{\text{edge}}$ ,  $R_{\text{full}}$  and  $R_{\text{centre}}$  are taken as shown in the bottom panel. (C) Plot of the fluorescence mean intensity per pixel kinetics (left axis) of the ROIs:  $R_{\text{edge}}$  (bright green),  $R_{\text{full}}$  (pale green) and  $R_{\text{centre}}$  (grey) optical density together with the microscopic optical density,  $\mu\text{OD} = \ln(I_0/I)$  (right axis) of the ROI  $R_{\text{full}}$  (dashed blue line). Bottom panel shows a zoom of the first ten hours with the same colour code. For the sake of clarity, only the  $\mu\text{OD}$  curve corresponding to a  $R_{\text{full}}$  type ROI is shown.  $\mu\text{OD}$  curves from  $R_{\text{edge}}$  or  $R_{\text{centre}}$ , essentially superimposable to  $R_{\text{full}}$  ones, are shown in Fig. S1 (Supplementary Information) which also gives the statistical dispersion of fluorescence and  $\mu\text{OD}$  curves coming from distinct experiments.

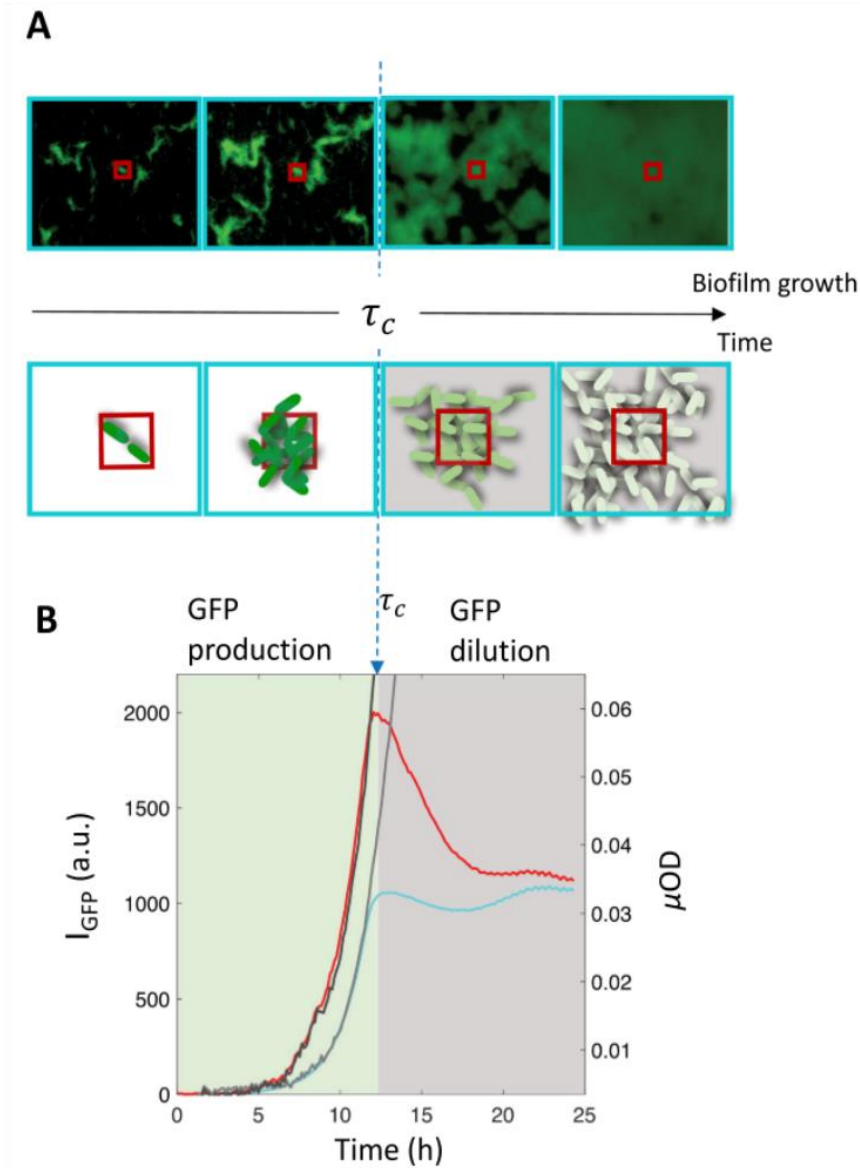
striking observation was that the  $I_{GFP}$  curve variation departed  $\mu OD$  kinetics early in the biofilm development. While  $I_{GFP}$  curve saturated,  $\mu OD$  kept on increasing (Fig. 1C and S1). Interestingly, the  $I_{GFP}$  kinetics strongly depended on the localization of the ROI with respect to the channel edge, regarding both the shape and the intensity of the curves (Fig. 1C and S1). To better capture this point, we plotted  $I_{GFP}$  as a function of  $\mu OD$  which reported cell biomass (Fig. 2) for two typical edge and centre ROIs and observed that  $I_{GFP}$  deviation to linearity occurred for  $\mu OD$  values decreasing by four-fold from the edge to the centre of the channel. So, we observe here that above a given biofilm development point, the amount of fluorescent proteins synthesized by the cells no longer matched the number of cells reported by the  $\mu OD$ , contrarily to what is expected from a protein produced by a constitutively expressed gene. The conflict appears more strongly and quickly as the cells are more distant from the edge of the channel while, under the hydrodynamical conditions used here, no significant difference in biomass amount was measured between the edge and the centre of the channel<sup>29</sup>. This suggests that an environmental parameter asymmetrically distributed in the channel affects the reporter fluorescence.



**Figure 2:** GFP fluorescence relation to biomass displays strong spatial heterogeneity. Fluorescence intensity is plotted as a function of the microscopic optical density,  $\mu OD$  for the channel edge (bright green line) and centre (grey line) ROIs. Dashed lines indicate the fluorescence versus biomass linearity domains for the two ROIs and point to the corresponding  $\mu OD$  values. The ROIs are defined as indicated in Fig. 1.

Next, to better understand the temporal variation of the fluorescence, we concentrated our attention on the recordings made on a defined location of the middle of the channel and drew two concentric ROIs of different size as shown in Fig. 3. The smaller ROI was drawn around an initial cluster of a few cells and the larger one engulfed higher number of cells distributed over several clusters within the ROI. Then, we considered the mean fluorescence coming from each ROI, i.e. the total enclosed fluorescence divided by the number of pixels. Interestingly, the fluorescence coming from the two ROIs displayed very distinct regime changes after about 12 hours biofilm growth. The signal from the small ROI exhibited a steep fluorescence decrease while the one from the larger ROI remained essentially constant. In the meantime, the  $\mu OD$  signal which reported cell number in the considered ROI kept on increasing exponentially attesting the 3D growth of the biofilm. This indicates that, at the critical time  $\tau_c$  of the fluorescence regime change, mean single cell fluorescence decreases while total fluorescence of a population lineage remains constant. In other words, from  $\tau_c$  starts a dilution phase where no more fluorescent molecules are produced and the daughter cells

share the store fabricated in the initial regime, the production phase. So, the fluorescence of the small ROI decreases due to the spread of the initial cluster lineage beyond the limit of the ROI and the dilution of the fluorescent molecules produced before  $\tau_c$  out of the small ROI. Meanwhile the larger ROI which essentially fully comprises the descents of its initial clusters, exhibited a constant global pool of fluorescent molecules although diluted within an increasing number of cells.

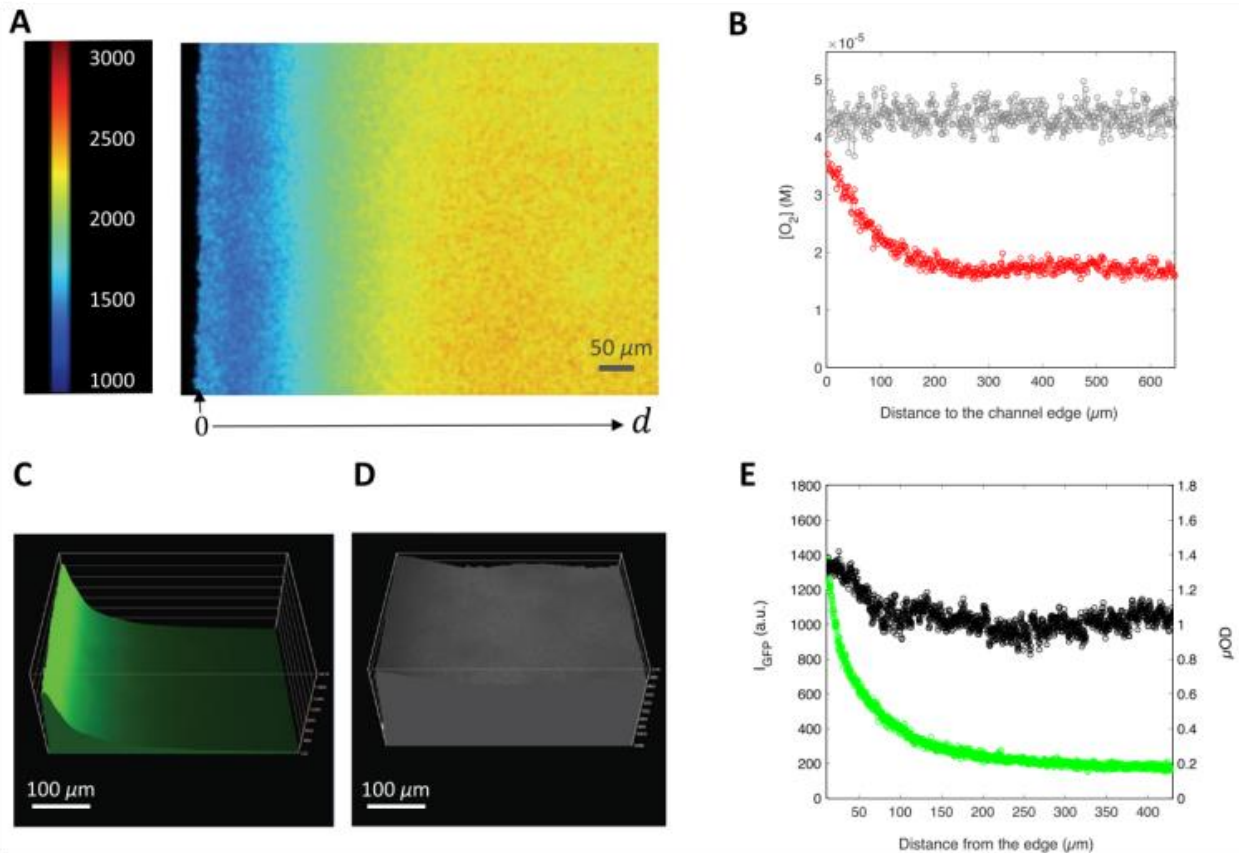


**Figure 3:** Biofilm growth kinetics displays a critical point where fluorescent protein production stops. (A) Images of a field of view, located in the middle of channel of an *E. coli* MG1655-gfp-F biofilm, taken at 6; 10; 16 and 20 hours after biofilm initiation (upper row) and showing both the cell fluorescence and the drawing of two types of ROIs of different size, the small one (red) and the larger one (cyan). The lower row sketches the principle of the small versus large ROI comparison — the small ROI being overpassed during the biofilm growth while the large one contains all the cells descending from the initial cluster lineage. (B) GFP fluorescence (left axis) kinetics is shown for the small (red curve) and large (cyan curve) ROIs together with  $\mu$ OD signals (dark grey for the small ROI and light grey for the large ROI). The fluorescence intensity per pixel is averaged over the considered ROI. Data from different sets of ROIs are shown in supplementary Fig. S1 attesting the statistical accuracy of the observation. fluorescent

## GFP fluorescence in a growing biofilm is strongly impacted by the heterogeneous O<sub>2</sub> concentration

At that stage, we made the hypothesis that the cell fluorescence yield was strictly controlled by a threshold level of molecular oxygen below which the final oxidation step of the GFP chromophore maturation did not occur. In our guess, this oxygen shortage is reached as the biofilm grows and the cell consumption increases and significantly depletes the oxygen transported into the channel below the threshold required for GFP fluorescence. To confirm this vision, we measured the spatial distribution of oxygen in a mature biofilm after approx. 20 hours of growth using micelles functionalized with fluorescent Ruthenium complex displaying oxygen-dependent fluorescence lifetime.

Ruthenium micelles were infused into the biofilm and a lifetime image was collected (Fig. 4A) enabling to derive oxygen spatial distribution (Fig 4B) on the region extending from the edge to the centre of the channel. Then, we compared the O<sub>2</sub> spatial distribution with that of  $I_{GFP}$  and  $\mu OD$  measured under the same conditions (Fig 4C-D). We found that  $I_{GFP}$  and O<sub>2</sub> spatial distributions displayed similar profiles with both high fluorescence and high oxygen levels close to the edge of channel (Fig. 4B,E) and low levels at the



**Figure 4:** Within the living biofilm, the steep lateral gradient of GFP fluorescence matches the lateral gradient of oxygen concentration. (A) Fluorescence lifetime image of a mature biofilm of *E. coli* MG1655-gfp-F, grown during 20 hours, continuously supplied with a 1 ml/h medium flow containing Ruthenium micelles at a final Ruthenium concentration of 8  $\mu$ M. The field of view extends from the edge to the centre of the channel and captures 500  $\mu$ m of the channel length and captures a biofilm layer  $7 \pm 2$   $\mu$ m thick close to the bottom of the channel. The colour bar is in nanoseconds. (B) Spatial molar oxygen concentration distribution as extracted from the lifetime image by averaging 3 contiguous lines of pixels for Ruthenium micelles alone (grey dots) or in the presence of the biofilm (red dots). (C,D) shows the spatial distribution of the GFP fluorescence (C) and  $\mu OD$  (D) for an equivalent biofilm with the graph (E) of the values taken on each image along the same y line on these two images.

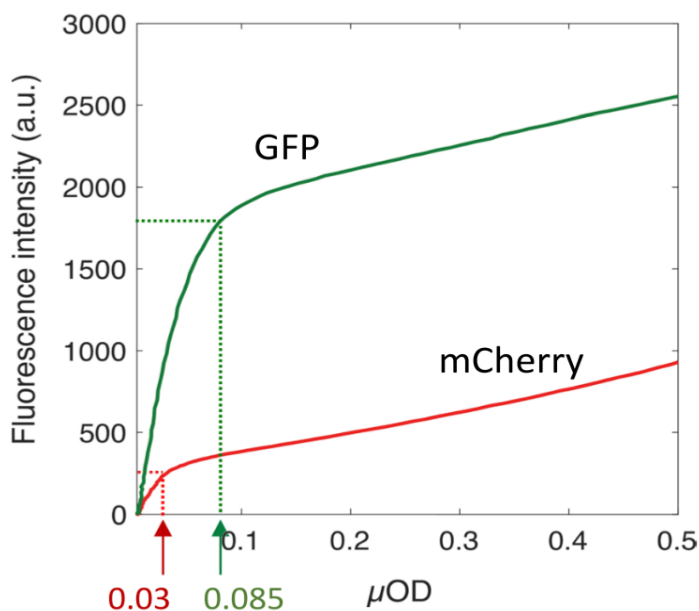
centre of the channel. In the meantime, cell biomass displayed no significant gradient from the edge to centre of the channel (Fig. 4D and E) highlighting again the discrepancy between GFP fluorescence intensity and gene expression. Indeed, as GFP expression was controlled by a constitutive promoter, the fluorescence intensity should vary as cell biomass and then as  $\mu\text{OD}$ . The  $\text{O}_2$  gradient is consistent with the expected permeability of PDMS to oxygen which was confirmed by the observations we made on biofilms grown in glass channels, the edges of which are not permeable to  $\text{O}_2$ . In this case, a uniform low level of fluorescence was observed in the channel (SI, Fig. S2).

Surprisingly, these results show that after 20 hours of growth, colonization has expanded evenly over the channel, independently of the  $\text{O}_2$  access suggesting that the biofilm growth was not affected by  $\text{O}_2$  shortage. However, biomass transport and rearrangements during biofilm development could also account for this smooth topography.

These results emphasize the complexity of interpreting GFP fluorescence in a growing biofilm, due to the strong dependence of the fluorescence intensity on oxygen concentration, itself depending in the biofilm on local cell concentration and on the distance to the main oxygen sources in the considered devices, typically close to the edge of the channel for PDMS devices but also close to the channel connectors for devices made of materials with lower permeability to  $\text{O}_2$  such as for example glass or polystyrene<sup>31</sup>. Therefore, the fluorescence intensity is inconsistent with the reported gene expression and the biomass when a constitutive gene is targeted. The requirement of  $\text{O}_2$  for dehydrogenating the  $\alpha$ ,  $\beta$  bond of the protein Tyr-66 residue so as to GFP can become fluorescent has been pointed out early by Tsien, who indicated that the protein could not be used in obligate anaerobes<sup>27</sup>. Here, we show that GFP fails to fluoresce as the oxygen level of the environment drops below a threshold which is quickly achieved in a growing biofilm.

### mCherry fluorescence also exhibits a severe non-linearity in a growing biofilm

To generalize our statement, we examined the fluorescence kinetics in a growing biofilm expressing the red fluorescent protein mCherry, another iconic genetic reporter derived from *Discosoma sp.* Red (DsRed) fluorescent protein<sup>32</sup>. As for GFP, mCherry expression was under the control of the promoter  $P_R$ , an *E. coli* constitutive promoter, allowing to obtain expression that varies as cell biomass. In parallel channels, we initiated the growth of biofilms with cells expressing GFP and mCherry, respectively. We monitored fluorescence and  $\mu\text{OD}$  signal kinetics along the biofilm growth and plotted for both reporters the variation of the fluorescence amplitude as a function of the  $\mu\text{OD}$  derived from the same images (Fig.5). We found



**Figure 5:** mCherry fluorescence saturates prior to GFP along the biofilm development. Variation of the fluorescence of mCherry versus GFP on parallel biofilms grown from *E. coli* MG1655-F-FAST-mCherry (red curve) and MG1655-gfp-F-FAST (green curve) under the same conditions. Fluorescence intensity per pixel is averaged over a central identical position in each channel. The dashed arrows indicate the fluorescence regime change and the corresponding values of  $\mu\text{OD}$ .

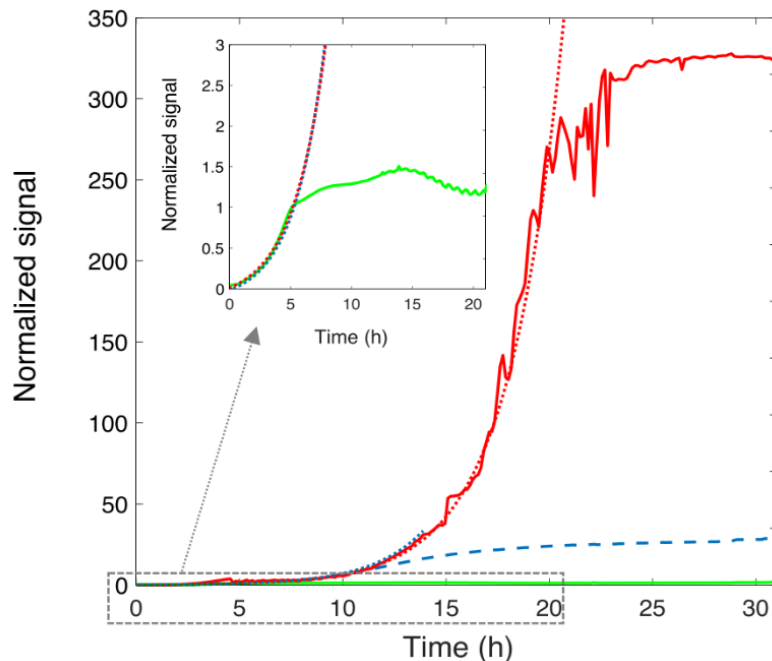


that mCherry fluorescence also levelled off early in the biofilm development and that this saturation occurred for values of  $\mu\text{OD}$  as low as 0.03 while GFP fluorescence remained strictly co-linear up to  $\mu\text{OD}$  equal to 0.085. This result is in agreement with the larger sensitivity of mCherry to  $\text{O}_2$  shortage due to the two oxidation steps involved in the maturation of mCherry chromophore<sup>33</sup>.

At this point, we conclude that proteins which fluorescence relies on a chemical maturation involving  $\text{O}_2$  cannot be used as quantitative tracers of gene expression or cell biomass in living bacterial biofilms where the level of oxygen is low and heterogeneous.

## FAST outperforms GFP and mCherry in reporting gene expression in the complex environment of a living biofilm

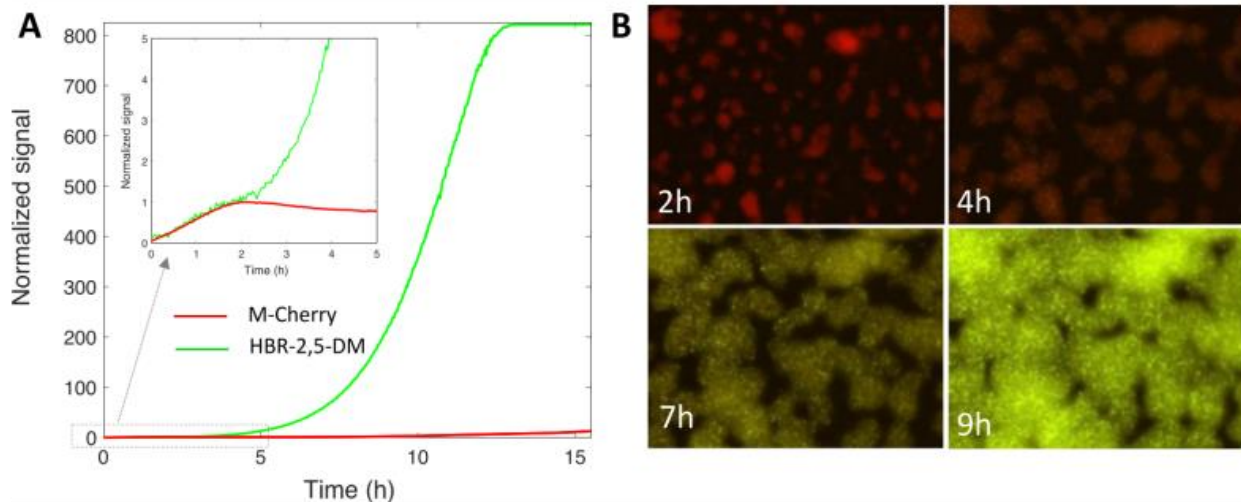
To overcome the drawback due to classical reporter dependence on  $\text{O}_2$  level, we implemented a new approach engaging FAST a small protein tag that has been recently introduced for labelling fusion proteins in living cells and organisms. FAST is a protein of 14 kDa engineered from the photoactive yellow protein (PYP) from *Halorhodospira halophila* to bind and activate the fluorescence of synthetic fluorogenic analogues of hydroxybenzylidene rhodanine (HBR). Because they fluoresce only when immobilized within FAST (because of conformational locking), HBR analogues do not exhibit nonspecific fluorescence in cells, enabling to detect FAST without the need for washing. FAST was shown to be functional in various expression systems including bacteria<sup>28</sup>. As its fluorescence depends only on the interaction of the protein with its cognate fluorogen, FAST is fluorescent – provided that the fluorogen is present – whatever the oxygen level. In addition, an important feature of FAST is the ability to tune its emission colour from green-yellow to orange-red by changing the applied fluorogen, providing an experimental versatility not encountered with GFP-like fluorescent proteins<sup>34</sup>. In a first set of experiments, we built a biofilm with MG1655-*gfp-F* cells transformed to constitutively express both GFP and FAST (see Materials and Methods). We supplied the fluorogen HBR-3,5-DOM at 2  $\mu\text{M}$  in the biofilm growth medium to form an orange-red fluorescent FAST detected in the ‘red’ channel (593/40 nm) while GFP fluorescence was collected in the ‘green’ channel (536/25nm), having first checked that the presence of the fluorogenic dye did not altered bacteria growth rate (SI, Fig. S3). The expression of FAST and GFP, monitored in the same biofilm, displayed quite distinct fluorescence kinetics (Fig. 6). GFP signal saturated after approx. 5 hours



**Figure 6:** FAST-HBR-3,5-DOM, glowing in red, outperforms both GFP and  $\mu\text{OD}$  signal in a living biofilm. GFP (green line) and FAST-HBR-3,5-DOM (red line) fluorescence kinetics shown together with  $\mu\text{OD}$  (dashed blue line) signal all obtained from the analysis of a central ROI of the same biofilm of *E. coli* MG1655-*gfp-F*- FAST. All the curves have been normalized to unit at time  $t = 5$  h. The adjustment of the experimental curves to exponential increases are shown as dotted lines of the same colour as the data lines. The insert shows a zoom of the GFP signal with the exponential adjustment of the  $\mu\text{OD}$  and FAST-HBR-3,5-DOM kinetics.

growth while FAST fluorescence kept on increasing exponentially up to 20 hours. In between,  $\mu\text{OD}$  signal levelled off after 13 hours of growth as expected due to the saturation of the detection for  $\mu\text{OD}$  values above 0.5<sup>29</sup>. Interestingly, within the first 5 hours of the biofilm development, the three signals increased similarly according to exponential functions characterized by the same constant,  $0.39 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ , showing parallel report of biomass and gene expression over this initial time period (Figure 6 insert).

We also examined the efficiency of the FAST protein in combination with another fluorogen, HBR-2,5-DM which emitted in the green channel. We assessed FAST:HBR-2,5-DM against mCherry, using MG1655-F cells transformed to constitutively express a mCherry-FAST fusion protein (see Materials and Methods). As above, we grew the biofilm in the presence of HBR-2,5-DM  $2\mu\text{M}$  in the medium flow and we collected time-lapse fluorescence and  $\mu\text{OD}$  images. Then we compared, mCherry and FAST fluorescence signals (Fig. 7A) which diverged early in the biofilm development as expected from the results displayed above regarding the dissimilarity between mCherry and GFP saturation stages (see Fig. 5). FAST:HBR-2,5-DM complex behaved quite similarly to FAST:HBR-3,5-DM, increasing exponentially for several hours after mCherry saturation point. Fluorescence images acquired using exposure times enabling the capture of the whole FAST:HBR-2,5-DM fluorescence dynamics show the colour shift induced by mCherry saturation (Fig. 7B and movie S1) whereas FAST:fluorogen exhibits photophysical properties comparable to mCherry (Supplementary Information, Table S1).

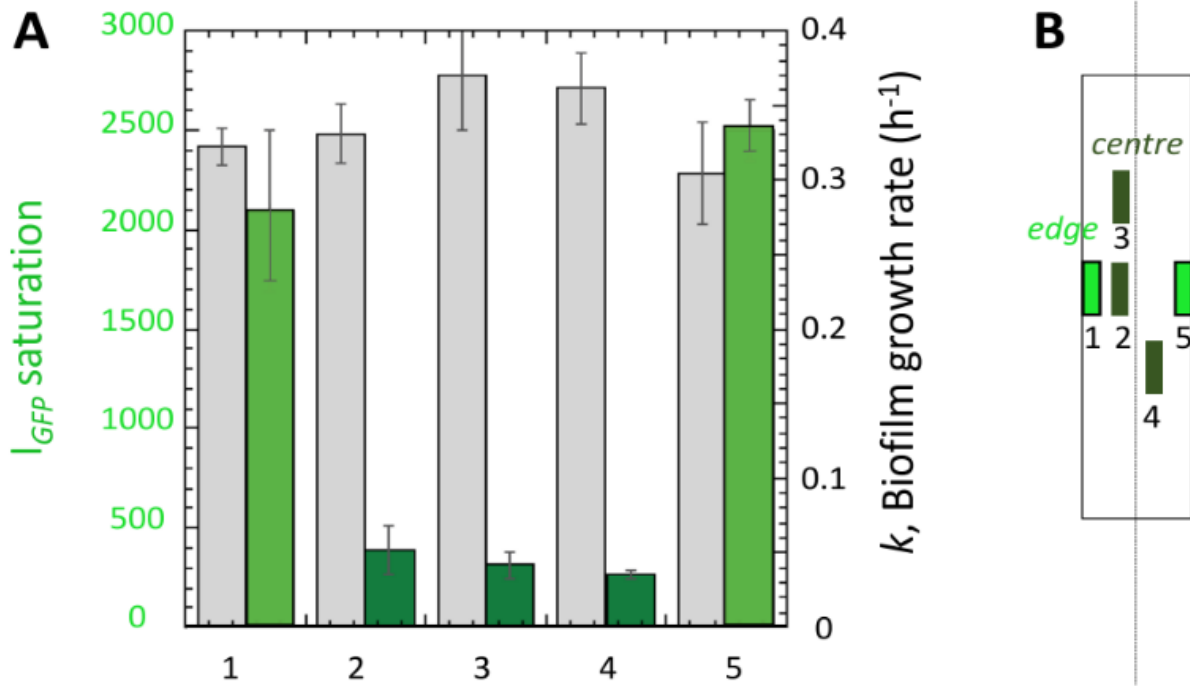


**Figure 7:** FAST, glowing in green with HBR-2,5-DM, early outperforms m-Cherry in a living biofilm. (A) mCherry (red line) and FAST-HBR-2,5-DM (green line) fluorescence intensity kinetics from a growing *E. coli* MG1655-F expressing the FAST-mCherry fusion protein. The signal on the graph has been normalized to unit at time  $t = 2 \text{ h}$  which corresponds to mCherry saturation time. The insert shows a zoom in of the first five hours of the biofilm growth. (B) Overlay of mCherry and FAST fluorescence images collected of different times of the biofilm growth. Image acquisition time in each channel was chosen to capture the whole signal dynamics inducing a striking colour switch from the mCherry red emission, dominating the signal in the first 2 hours of the growth, to the yellow-green emission of FAST which largely overpasses mCherry's after a few hours of growth.

We conclude that the FAST:Fluorogen complexes provide efficient and accurate reporters of gene expression in the heterogeneous and low- $\text{O}_2$  context of a growing biofilm.

As FAST enables quantitative gene expression measurements beyond the development limits imposed by  $\mu\text{OD}$  signal saturation it also provides a larger time scale to determine biofilm cell biomass growth rate. We made this analysis for several characteristic *edge* and *centre* regions using exponential adjustment of the FAST fluorescence intensity versus time curves,  $I_{\text{FAST}} = I_0 e^{kt}$  to derive  $k$ , the biofilm growth rate. Fig. 8 shows the plot of  $k$  for the different ROIs together with the saturation value of GFP at the same location which reflected the amplitude of the lack of  $\text{O}_2$  as shown above. Interestingly, we observed that  $\text{O}_2$  shortage which caused GFP fluorescence failure did not affect biofilm growth rate (Fig. 8). This means that the

reduction of oxygen concentration, although blocking oxygen-sensitive reactions such as those controlling GFP or mCherry fluorescence appearance, does not alter significantly biofilm growth.



**Figure 8:** Biofilm growth rate is not affected by the local concentration of oxygen. (A) Biofilm growth rates derived from exponential adjustment of the FAST kinetics in an *E. coli* MG1655-gfp-F-FAST growing biofilm (grey bars, right axis) together with the saturation value of GFP fluorescence at the distinct channel locations. (B) Channel positions sketch.



# Discussion and conclusions

Bacterial biofilm research currently goes through a rapid-fire expansion due to the diversity and the complexity of the questions raised by such a living community and its tremendous impact on our human lives and natural environment. Here, we focus our attention on biofilm real time optical imaging approaches aiming at capturing dynamically the features of the adherent community *in situ*, with a sufficient spatio-temporal resolution. In this context, quantitative analysis of the microscopy data is essential and very promising but raises the issue of the labels accuracy. Our work brings into question the use of the prototypical genetically encoded fluorescent reporters of the extended GFP family to do this in the living biofilm. We show that GFP and mCherry exhibit high sensitivity to the local level of oxygen, not only improper for anaerobic conditions use as Tsien and co-workers have warned the scientific community from the beginning of the introduction of the tool, but demonstrating a strict dependence on an O<sub>2</sub> threshold concentration which values are quickly experienced under the concentrated and confined conditions of a growing biofilm, even under continuous flow. This leads to a spatial distribution of fluorescence intensities depending on both the number of contributing cells and the local O<sub>2</sub> concentration but also the cells history involving number of divisions or biomass transport processes.

We show here the details of the results obtained with GFP and mCherry, though we also observed similar behaviours using, YFP, Venus or mKate2 (data not shown). This O<sub>2</sub>-dependence is all the more critical that O<sub>2</sub> distribution within a living bacterial biofilm very much depends on the details of the experimental configuration in which the biofilm grows. The geometry of the setup, the O<sub>2</sub> permeability of the device material, the flow rate which controls the amount of advected O<sub>2</sub> but also all the conditions that will impact cell division rate and consequently cell consumption of O<sub>2</sub> such as growth medium or temperature. As well, the topography of the biofilm development will play a role. Thus, oxygen distribution is hardly predictable in such complex systems. Nevertheless, considering the bacterial O<sub>2</sub> consumption given in Riedel *et al.*<sup>35</sup> for an exponentially growing population of *E. coli*, i.e.  $1.7 \times 10^6$  molec./s and an O<sub>2</sub> medium concentration equal to  $3 \times 10^{22}$  molec./m<sup>3</sup>, we can calculate that the O<sub>2</sub> contained in a cubic micro-volume of 100 μm side length in equilibrium with an atmospheric pressure of O<sub>2</sub> or at the contact of a PDMS interface itself in equilibrium with atmosphere<sup>36</sup>, is fully consumed in less than 2 s by 10<sup>4</sup> bacterial cells, which corresponds to a 20 μm thick layer of cells at a 20% volume fraction on a 100μm side square. Besides, using an O<sub>2</sub> diffusion coefficient in water of  $3 \times 10^{-9}$  m<sup>2</sup>/s, it can also be evaluated that the characteristic time for an O<sub>2</sub> molecule to leave the 100μm side cubic micro-volume is about 6 s. This emphasizes the high degree of O<sub>2</sub> consumption by the bacteria in the confined environment of a growing biofilm, consistently with the severe gradient of O<sub>2</sub> observed in the channel for a mature biofilm. It is also worthwhile to consider the amount of O<sub>2</sub> advected by the flow working at 1 ml/h. Using the same O<sub>2</sub> concentration and consumption values as above, it can be shown that the 10<sup>13</sup> molec./s contributed by the flow in the whole channel are fully consumed by a mature biofilm, underlining the micro-aerobic environment that should be expected in a millifluidic channel impermeable to the gas such as a glass channel but also the key role of the oxygen diffusing by the channel wall in a PDMS device. However, it should also be kept in mind that bacterial oxygen consumption is expected to fluctuate a lot depending on many environmental and physiological parameters.

Therefore, quantitative interpretation of the fluorescence intensity of GFP and its homologs is not possible in a living biofilm. We propose here an alternative approach based on FAST, a small inducible chemical-genetic fluorescent marker composed of a protein part interacting reversibly with an exogenously applied fluorogenic chromophore that is non-fluorescent until labelling occurs. Fluorescence arises from the conformational locking of the fluorogenic chromophore within the binding cavity of FAST<sup>28,37</sup>. This unique fluorescence activation mechanism does not require molecular oxygen, making FAST a very good candidate for imaging proteins and cells in low-O<sub>2</sub> environments. We demonstrate here that the FAST:fluorogen complexes efficiently labelled the biofilm, the small fluorogenic dyes diffusing freely and quickly in the biofilm. They allowed the reporting of exponential bacterial biofilm growth in flow at development stages where both GFP or mCherry fluorescence signal stagnated or decayed for hours. The ability to vary FAST colour changing the applied fluorogen opens exciting possibilities for various combinations with classical

proteins. Indeed, beyond the measurement of a given gene expression *per se*, using the FAST system in combination with colour-complementing prototypical FP should allow real time monitoring of O<sub>2</sub> variations in ratio mode. Moreover, assuming effectively that below a given O<sub>2</sub> concentration threshold, no more fluorescent protein is produced and the cells are sharing the pre-existing pool could allow one to deduce the number of cell division number occurring locally by considering the FAST/FP fluorescence ratio to calculate the FP dilution factor.

Other families of non-prototypical genetically encoded proteins have emerged in the recent years<sup>38</sup>. Although devoid of O<sub>2</sub> sensitivity, due to their exogenous fluorogen-activated fluorescence, they show little irrigation of the microbe imaging field compared to the iconic GFP and no one has been implemented in biofilm characterizations to the best of our knowledge. The LOV family proteins<sup>39-41</sup> which fluoresce upon flavin binding detain photophysical properties, interesting for metallic ions or oxygen singlet biosensing but potentially restrictive for gene reporting, which possibly explains its limited spread. UnaG, a recently discovered protein<sup>42</sup> from the Japanese eel, *Anguilla japonica*, fluoresces upon bilirubin binding in an O<sub>2</sub>-independent mechanism. Starting to be used in mammals as a hypoxia reporter and serum bilirubin sensor<sup>43</sup>, it might also offer an interesting tool for biofilm investigations.

The work we present here aims at stressing the absolute necessity to implement, in quantitative imaging studies dedicated to biofilms, fluorescent reporters displaying robust fluorescence whatever the local O<sub>2</sub> level in order to be able to use the fluorescence signal as an accurate reporter of the protein expression level. We show that this is not the case for the classical FPs such as GFP because of their oxygen-dependent fluorescence and we propose an alternative method based on the system FAST that we successfully implemented in an *E. coli* biofilm. Further developments of multicolour orthogonal tag:fluorogen pairs should enable the study of multispecies biofilms.

# Materials and methods

## Plasmids, strains and fluorogens:

*Plasmids:* pAG87pR and pAG101pR were engineered from pAG87 and pAG101 described in Plamont *et al.*<sup>28</sup> to replace T7 promoter with the lambda promoter pR for the expression of FAST and FAST-mCherry fusion in *E. coli* (details in SI). FAST is a variant of the photoactive yellow protein (PYP) containing the mutations C69G, Y94W, T95M, F96I, D97P, Y98T, Q99S, M100R, T101G<sup>28</sup>.

*Strains:* We used an *E. coli* MG1655-F strain carrying a non-conjugative plasmid, a strain carrying the F pilus to promote biofilm formation<sup>30</sup> and its fluorescent variant, MG1655-*gfp*-F carrying *gfp-mut3* gene inserted on the chromosome under the control of the lambda-promoter pR. These strains were transformed with pAG101pR and pAG87pR, respectively, providing MG1655-F-FAST-mCherry which expressed the FAST-mCherry fusion protein and MG1655-*gfp*-F-FAST which expressed GFP and FAST proteins separately (details in SI).

*Fluorogens:* FAST fluorescence was activated using synthetic fluorogenic analogues of hydroxybenzylidene rhodanine (HBR) prepared as previously described<sup>28,34</sup>. We used HBR-2,5-DM (4-hydroxy-2,5-dimethylbenzylidene rhodanine) that fluoresces green light under blue light excitation when bound to FAST and HBR-3,5-DM (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene rhodanine), that fluoresces red light under green light excitation when bound to FAST.

## Microfabrication and biofilm:

*Millifluidic device:* Millifluidic polydimethylsiloxane (PDMS) channels of 30 mm in length, 1 mm in width and height were micro-fabricated and bound to glass coverslips using oxygen plasma activation of the surfaces. Stainless steel connectors (0.013" ID and 0.025" OD) and microbore Tygon tubing (0.020" ID and 0.06" OD) supplied by Phymep (France) were used to connect fluid flow as described into more details previously<sup>29</sup>. The medium was pushed into the channels at a controlled rate using syringe pumps. When specifically required, we also used square glass capillaries, 800- $\mu$ m internal-side (Composite Metal Services, Shipley, UK).

*Biofilm growth:* All cultures were performed from LB agar plate colonies grown overnight in LB medium at 37°C in an agitated Erlenmeyer flask in the presence of 7.5  $\mu$ g/ml tetracycline, then diluted in M63B1 minimal medium supplemented with 0.4% glucose to provide an exponentially growing culture with an OD<sub>600</sub> equal to 0.2 after a few hours incubation at 37°C. Biofilm growth was then initiated by injecting — approx.  $3 \times 10^6$  cells — of exponentially growing cells with an optical density at 600 nm equal to 0.2 in the channel and allowing static settlement for 90 min before starting culture medium flow at 1 ml/h and imaging bacterial development in the channel. The whole experiment was thermostated at 37°C.

## Imaging

*Microscope:* We used an inverted NIKON TE300 microscope equipped with motorized x, y, z displacements and shutters. Images were collected using a 20  $\times$  S plan Fluor objective, NA 0.45 WD 8.2-6.9. Bright field images were collected in direct illumination (no phase). Fluorescence acquisitions were performed using either the green channel filters for GFP and FAST:HBR-2,5-DM (Ex. 482/35, DM 506 Em. FF01-536/40) or the red ones for mCherry and FAST:HBR-3,5-DM (Ex 531/40nm DM 562 Em. 593/40). Excitation was performed using a LEDs box (CoolLed pE 4000).

*Image acquisition:* We used a Hamamatsu ORCA-R2 EMCCD camera for time-lapse acquisitions of 1344 $\times$ 1024 pixels images with 12 bits grey level depth (4096 grey levels) and captured an xy field of view of 330  $\mu$ m  $\times$  430  $\mu$ m. Bright field and fluorescence images were usually collected for 24 hours at the frequency of 12 frames per hour. Excitation LEDs were set at a 50% power level and exposure times were 50 ms or 500 ms for the green emissions and 800ms for the red emissions.

*Image analysis:* Image intensity per pixel averaged on defined regions of interest (ROIs) was collected using

the NIKON proprietary software NIS. The data sheets edited by NIS were next exported to Matlab for further analysis of the biofilm development kinetics and growth parameters determination. Microscopic optical density ( $\mu\text{OD}$ ) was derived from transmitted light images according to  $\mu\text{OD} = \ln(I_0/I)$ , where  $I_0$  is the intensity (averaged gray level per pixel) recorded on a channel filled with medium only and  $I$  the intensity recorded on a channel containing a growing biofilm<sup>29</sup>, the presence of which attenuates incident light transmission. Fluorescence intensities were subtracted for their respective background using the contribution to the fluorescence intensity of a channel of medium in the absence of bacteria.

### **Oxygen measurement:**

*FLIM imaging:* Lifetime images were acquired using a wide field frequency domain fluorescence lifetime imaging microscopy (FD-FLIM) setup, and a single plane illumination (SPIM) obtained using a beam expander and a cylindrical lens 45 mm of focal length. The thickness of the illuminated plane was determined to be  $7 \pm 2 \mu\text{m}$  in the object plane of the microscope. The setup was equipped with a 445 nm laser diode module and an intensified CCD camera that can both be modulated synchronously from 0.1 to 200 MHz. Fluorescence lifetime was derived from the phase shift and relative modulation of the fluorescence sample when compared with a reference sample of known lifetime — here a hypericin solution, 3 ns lifetime. *Oxygen probe:* Dissolved  $\text{O}_2$  was measured by quenching a Ruthenium complex (Ruthenium–tris(4,7–diphenyl–1,10-phenanthroline) dichloride (Ru(dpp)); Fluka) encapsulated in micelles of (1,2–Dipalmitoyl–sn–Glycero–3–Phosphoethanolamine–N[Methoxy(Poly–ethylene glycol)–2000] (DMPC–PEG2000) phospholipids; Avanti. The encapsulation of the Ru(dpp) complex in the micelles<sup>44</sup> yields it biocompatible whereas free Ru(dpp) is strongly toxic for cells. Ru–micelles were added to the millifluidic channels with or without biofilm at a concentration of  $8 \mu\text{M}$  for fluorescence lifetime imaging. Oxygen level was converted from fluorescence lifetime values using the Stern-Volmer relation<sup>45</sup> and values of the quenching constant and of the zero-oxygen lifetime equal to  $4.33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  and 3809 ns, respectively.

## **Acknowledgements**

The work was supported in part by a grant from French Agence Nationale pour la Recherche (ANR-15-CE02-0001-01 ACToP).

## **Author Contributions Statement**

A.M, P.T, H.J, F.S. and N.H. performed experiments, J.F.C, C.D. C.L and M.A.P. provided experiment material, A.G., P.T. and N.H. designed experiments and supervised the work N.H. wrote the manuscript text. All authors reviewed the manuscript.

## References

- 1 Watnick, P. & Kolter, R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**, 2675-2679 (2000).
- 2 Lopez, D., Vlamakis, H. & Kolter, R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000398, doi:cshperspect.a000398 (2010).
- 3 Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11**, 1034-1043, (2009).
- 4 Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322, (1999).
- 5 Flemming, H. C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**, 563-575, (2016).
- 6 Persat, A. *et al.* The mechanical world of bacteria. *Cell* **161**, 988-997, (2015).
- 7 Schembri, M. A., Kjaergaard, K. & Klemm, P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **48**, 253-267 (2003).
- 8 Wood, T. K. Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environ Microbiol* **11**, 1-15, (2009).
- 9 Lazazzera, B. A. Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms. *Curr Opin Microbiol* **8**, 222-227, (2005).
- 10 Stewart, P. S. & Franklin, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**, 199-210, (2008).
- 11 Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P. & Hall-Stoodley, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*, (2017).
- 12 Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science (New York, N.Y)* **312**, 217-224 (2006).
- 13 Neu, T. R. *et al.* Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol Ecol* **72**, 1-21, (2010).
- 14 Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. & Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* **35**, 322-332, (2010).
- 15 Moller, S. *et al.* In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl Environ Microbiol* **64**, 721-732 (1998).
- 16 Christensen, B. B. *et al.* Establishment of new genetic traits in a microbial biofilm community. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2247-2255 (1998).
- 17 Bridier, A., Briandet, R., Bouchez, T. & Jabot, F. A model-based approach to detect interspecific interactions during biofilm development. *Biofouling* **30**, 761-771, (2014).
- 18 Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* **50**, 61-68 (2003).
- 19 Sanchez-Vizueté, P. *et al.* Identification of ypqP as a New *Bacillus subtilis* biofilm determinant that mediates the protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial agents in mixed-species communities. *Appl Environ Microbiol* **81**, 109-118, (2015).
- 20 Vidakovic, L., Singh, P. K., Hartmann, R., Nadell, C. D. & Drescher, K. Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection. *Nat Microbiol*, (2017).
- 21 Andersen, J. B. *et al.* gfp-based N-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl Environ Microbiol* **67**, 575-585, (2001).

- 22 Sternberg, C. *et al.* Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4108-4117 (1999).
- 23 Rybtke, M. T. *et al.* Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **78**, 5060-5069, (2012).
- 24 Kim, M. K., Ingremeau, F., Zhao, A., Bassler, B. L. & Stone, H. A. Local and global consequences of flow on bacterial quorum sensing. *Nat Microbiol* **1**, 15005, (2016).
- 25 Nair, H. A., Periasamy, S., Yang, L., Kjelleberg, S. & Rice, S. A. Real Time, Spatial, and Temporal Mapping of the Distribution of c-di-GMP during Biofilm Development. *J Biol Chem* **292**, 477-487, (2017).
- 26 Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12501-12504, (1994).
- 27 Tsien, R. Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-544, (1998).
- 28 Plamont, M. A. *et al.* Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 497-502, (2016).
- 29 Thomen, P. *et al.* Bacterial biofilm under flow: First a physical struggle to stay, then a matter of breathing. *PLoS ONE* **12**, e0175197, (2017).
- 30 Ghigo, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442-445 (2001).
- 31 Ochs, C. J., Kasuya, J., Pavesi, A. & Kamm, R. D. Oxygen levels in thermoplastic microfluidic devices during cell culture. *Lab Chip* **14**, 459-462, (2014).
- 32 Shaner, N. C. *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**, 1567-1572, (2004).
- 33 Miyawaki, A., Shcherbakova, D. M. & Verkhusha, V. V. Red fluorescent proteins: chromophore formation and cellular applications. *Curr Opin Struct Biol* **22**, 679-688, (2012).
- 34 Li, C. *et al.* Dynamic multicolor protein labeling in living cells. *Chem Sci* **8**, 5598-5605, (2017).
- 35 Riedel, T. E., Berelson, W. M., Neelson, K. H. & Finkel, S. E. Oxygen consumption rates of bacteria under nutrient-limited conditions. *Appl Environ Microbiol* **79**, 4921-4931, (2013).
- 36 Shiku, H., . *et al.* Oxygen Permeability of Surface-modified Poly(dimethylsiloxane) Characterized by Scanning Electrochemical Microscopy. *Chemistry Letters* **35**, 234-235, (2006).
- 37 Li, C. *et al.* Design and characterization of red fluorogenic push-pull chromophores holding great potential for bioimaging and biosensing. *Org Biomol Chem* **14**, 9253-9261, (2016).
- 38 Rodriguez, E. A. *et al.* The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins. *Trends Biochem Sci* **42**, 111-129, (2017).
- 39 Buckley, A. M., Petersen, J., Roe, A. J., Douce, G. R. & Christie, J. M. LOV-based reporters for fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* **27**, 39-45, (2015).
- 40 Drepper, T. *et al.* Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* **25**, 443-445, (2007).
- 41 Drepper, T. *et al.* Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative in vivo real-time reporters. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5990-5994, (2010).
- 42 Kumagai, A. *et al.* A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. *Cell* **153**, 1602-1611, (2013).

- 43 Erapaneedi, R., Belousov, V. V., Schafers, M. & Kiefer, F. A novel family of fluorescent hypoxia sensors reveal strong heterogeneity in tumor hypoxia at the cellular level. *EMBO J* **35**, 102-113, (2016).
- 44 Douarche, C., Buguin, A., Salman, H. & Libchaber, A. E. Coli and oxygen: a motility transition. *Phys Rev Lett* **102**, 198101 (2009).
- 45 Sud, D., Zhong, W., Beer, D. G. & Mycek, M. A. Time-resolved optical imaging provides a molecular snapshot of altered metabolic function in living human cancer cell models. *Opt Express* **14**, 4412-4426, (2006).

## Supplementary Materials

# The inducible chemical-genetic fluorescent marker FAST outperforms classical fluorescent proteins in the quantitative reporting of bacterial biofilm dynamics

Amaury Monmeyran<sup>1</sup>, Philippe Thomen<sup>1</sup>, Hugo Jonquière<sup>1</sup>, Franck Sureau<sup>1</sup>, Chenge Li<sup>2</sup>, Marie-Aude Plamont<sup>2</sup>, Jean-François Casella<sup>1</sup>, Arnaud Gautier<sup>2</sup> and Nelly Henry<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Sorbonne Université, UPMC Univ Paris 06 & CNRS, UMR 8237, Laboratoire Jean Perrin, F-75005, Paris, France

<sup>2</sup> PASTEUR, Département de Chimie, École Normale Supérieure, PSL University, Sorbonne Université, CNRS, 75005 Paris, France.



## Supplementary Information

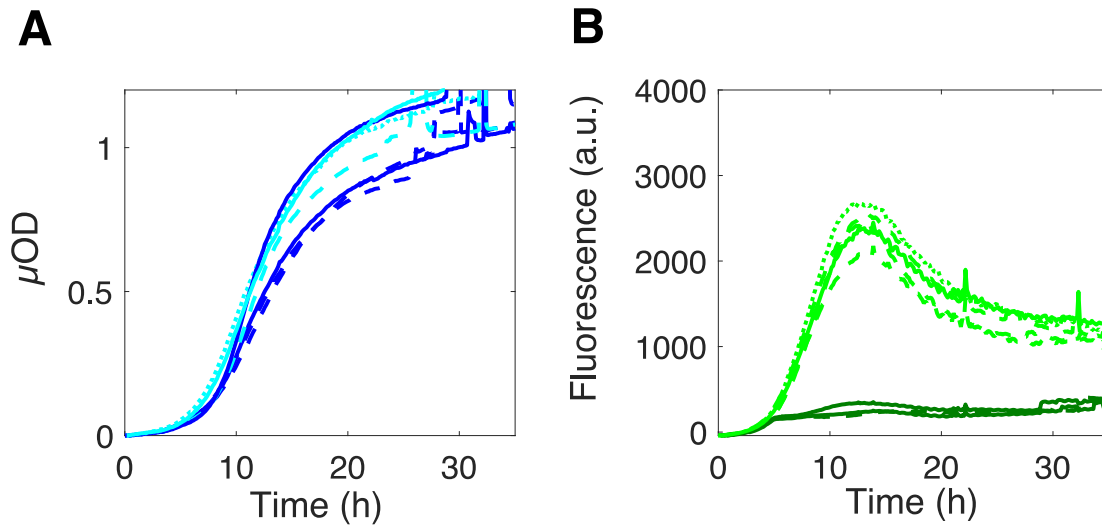
### Plasmids:

pAG87pR and pAG101pR were engineered from pAG87 and pAG101 — carrying respectively FAST gene and FAST-mCherry gene fusion under the control of T7 promoter with a kanamycin resistance<sup>1</sup> as follows: T7 promoter was replaced by pR promoter digesting plasmid vectors with BglII and XbaI (Fast Digest enzymes, Fermentas) and purifying them on agarose gel. The pR promoter sequence was obtained by hybridizing two DNA oligonucleotides sequences (Eurofins):  
GATCGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGCATGTACTAAGGAGGTTG  
and  
CTAGCAACCTCCTTAGTACATGCAACCATTATCACCGCCAGAGGTAAAATAGTC

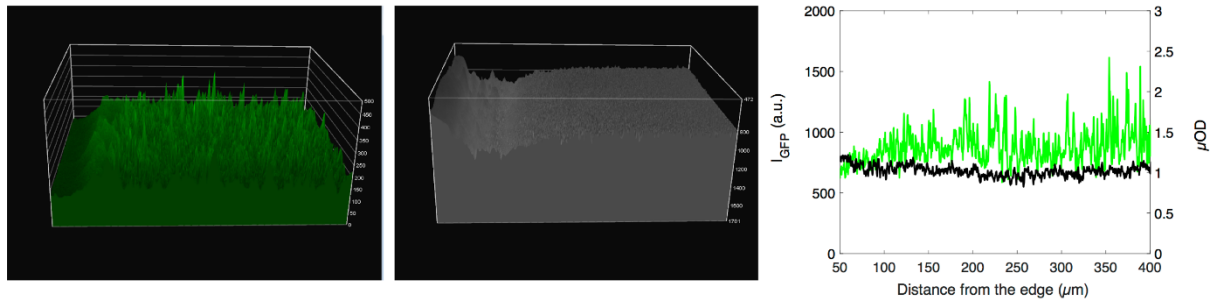
The digested and purified plasmids were mixed with hybridized oligonucleotides and ligated using a DNA Ligation Kit (ThermoFisher). *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  strain was prepared to be heat shock transformed with the ligation product, then streaked on kanamycin selective plates. After overnight growth, the colonies were screened by adding HBR-3,5 DOM on plates and observing colonies fluorescence under the microscope. Fluorescent clones were recovered. The sequence of each clone was checked by DNA sequencing before plasmid extraction. MG1655-F and MG1655-gfp-F strains were prepared to be heat shock transformed with pAG101pR and pAG87pR, respectively.

[1] Plamont, M. A., Billon-Denis, E., Maurin, S., Gauron, C., Pimenta, F. M., Specht, C. G., Shi, J., Querard, J., Pan, B., Rossignol, J., Morellet, N., Volovitch, M., Lescop, E., Chen, Y., Triller, A., Vrız, S., Le Saux, T., Jullien, L., and Gautier, A. (2016) Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 497-502.

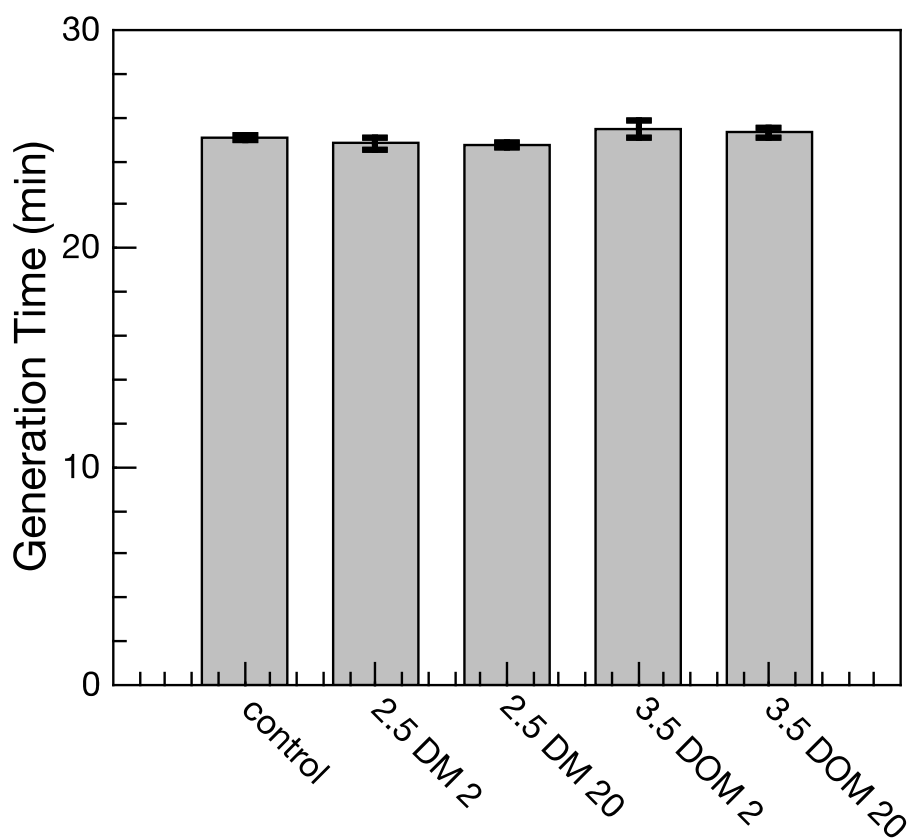
## Supplementary Figures



**Figure S1:  $\mu$ OD and fluorescence signals display very distinct dependence on their location in the channel.** (A)  $\mu$ OD and (B) GFP fluorescence kinetics are shown for *edge* (cyan in A and light green in B) and *centre* (dark blue in A and dark green in B) ROIs from three different channels defined by their line stroke (solid, dashed, dotted). It appears that  $\mu$ OD signal (A) which reports biomass up to values of approx. 0.5 does not significantly depend on the reported position — edge or centre. In this case, the bundle of curves only gives the statistical dispersion of the measurements for distinct experiments. Indeed, no larger difference is observed between equivalent positions from distinct or same channel and edge or centre positions from the same channel. By contrast, GFP fluorescence curve collection exhibits two distinct bundles of curves clearly depending on the reported position — edge or centre. This difference largely overpasses the experimental dispersion observed for equivalent positions coming from different channels, same line stroke as for A.



**Figure S2: GFP fluorescence displays even spatial distribution in a glass channel.** (A) Three-dimensional distribution of GFP fluorescence (left image) and transmitted light intensity (right image) in a mature biofilm of *E. coli* MG1655-*gfp-F*, grown during 20 hours, continuously supplied with a 1ml/h medium flow. (B) Graph of the two signals according to a transversal cross-section from the channel edge to the channel centre, the first 50  $\mu\text{m}$  close the channel wall are not represented due to the optical perturbations generated by the glass wall thickness. In the glass channel the fluorescence intensity is evenly low due the absence of oxygen supply through the side walls by contrast with PDMS channels.



**Figure S3: GFP Fluorogens do not affect bacterial growth at the concentration used in experiments and up to 20  $\mu\text{M}$ .**

Overnight culture of *E. coli* was diluted in LB medium supplemented or not with fluorogen HBR-2.5-DM or HBR-3,5-DOM, at 2 or 20  $\mu\text{M}$  in a multiwell plate. Cell growth was measured for all samples using a TECAN plate reader at 37°C with agitation for 24 hours. The growth curves were adjusted to exponential functions providing the generation time for each condition which were monitored in triplicate. Histograms indicate the mean value of the generation time, and bars indicate standard error.

## Supplementary Table

	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	$\phi$	Brightness
GFP	488	507	56000	0.60	34
mCherry	587	610	72000	0.22	16
FAST:HBR-2,5-DM	494	552	50000	0.29	14.5
FAST:HBR-3,5-DOM	518	600	39000	0.31	12

**Table S1: Proteins and fluorogens photophysical properties.** Excitation and emission wavelength ( $\lambda_{\text{abs}}$  and  $\lambda_{\text{em}}$ ), molecular extinction coefficient ( $\epsilon$ ), quantum yield ( $\phi$ ) and Brightness.

## Supplementary Movie

**Movie S1: Biofilm growth imaging over the first 12 hours of growth.** MG1655-F-FAST-*mCherry* was grown in the presence of HBR-2,5-DM  $2\mu\text{M}$  and mCherry (red channel) and HBR-2,5-DM (green channel) stacks of images have collected in parallel using a 400 ms and 100 ms acquisition time at a frequency of one frame every 4 mins and overlaid. Other details as in Fig. 4.



## III.2. Etude cinétique du développement d'un biofilm quatre espèces sous flux

Dans ce chapitre, nous allons présenter l'étude du développement en canaux millifluidiques sous flux d'un biofilm formé de 4 espèces de bactéries, issues d'un biofilm naturel.

### III.2.A. L'origine du biofilm 4 espèces

Le biofilm fut initialement isolé dans une usine de l'industrie laitière après s'être développé au niveau d'un joint à l'extérieur d'une cuve de pasteurisation du lait (Mettler & Carpentier, 1997). Initialement composé de 13 souches de 7 espèces réparties dans 5 phyla, ce biofilm a été réduit à 4 souches qui purent être cultivées en milieu liquide et assemblées en biofilm immergé au laboratoire par nos collaborateurs de l'INRA à l'Institut MICALIS (Baliarda, Winkler, Tournier, Aymerich, & Tinsley, n.d.). Dans l'assemblage final, 4 des 5 phyla constituant le biofilm initial sont représentés, en effet le 5<sup>e</sup> phylum *Staphylococcus* s'est trouvé systématiquement exclu des assemblages. Le groupe de MICALIS a choisi de conserver une souche par phylum pour aboutir à un biofilm à 4 souches : *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Kocuria varians* et *Rhodocyclus sp.*. Notons également que dans cet assemblage, la souche sauvage de *Bacillus cereus* est remplacée par la souche de laboratoire *B. cereus* ATCC14579<sup>T</sup>, étudiée dans le groupe et génétiquement manipulable.

Sur cette base, nos collaborateurs ont étudié la formation d'un biofilm immergé dans des conditions statiques après ensemencement sur un coupon stérile en acier inoxydable. Un changement de milieu toutes les 24h est appliqué. Ils ont pu montrer en dénombrant les souches toutes les 24 heures que ces 4 espèces formaient une communauté adhérente atteignant après environ 48h, un état où les quantités et les rapports des 4 souches semblent avoir atteint un plateau. De plus, cet état stable s'est avéré robuste à des perturbations telles que l'altération des rapports initiaux d'ensemencement des différentes souches, suggérant que des interactions inter-espèces pouvaient dominer la formation de cet état stable.

L'examen de cette hypothèse sur des assemblages réduits leur a d'ailleurs permis de mettre en évidence une interaction moléculaire négative de *B. cereus* vers *K. varians* — *B. cereus* produisant en effet une thiocilline, toxique pour *K. varians*. Néanmoins les mécanismes par lesquels cet effet se retrouve modulé en contexte 4-espèces n'ont pu être éclaircis.

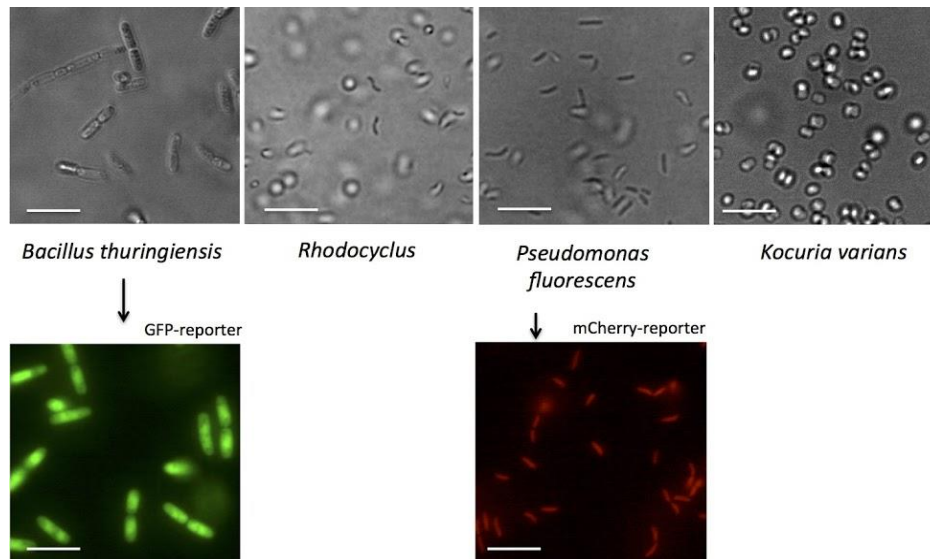


Ces travaux ont permis d'entrevoir la possibilité d'étudier au laboratoire un modèle de biofilm multi-espèces et de tenter d'en comprendre les mécanismes de formation. Ils ont également soulevé de nombreuses interrogations sur le rôle des effets locaux à la fois du point de vue spatial et temporel ainsi que sur l'impact des échanges ponctuels de milieu lié aux investigations de biofilm en statique.

C'est ainsi que, sur la base de ces observations, nous avons initié une étude du biofilm multi-espèces. Nos choix stratégiques ont été guidés par le souci (1) de travailler dans des conditions parfaitement contrôlées du point de vue physique, physicochimique et biologique (2) de pouvoir produire des données cinétiques avec une résolution temporelle suffisante (au moins l'échelle d'une demi division cellulaire), (3) d'accéder à l'information de la distribution spatiale des espèces dans le biofilm.

Ces objectifs nous ont amenés à l'étude du biofilm 4S dans des canaux milli-fluidiques calibrés sous flux contrôlé de nutriments permettant la maîtrise des paramètres physico-chimiques mais aussi la discrimination de la population réellement en biofilm, les bactéries non-attachées étant emportées par le flux.

Nous avons également fait évoluer légèrement la composition de la communauté par rapport à nos collègues du groupe de l'institut MICALIS afin d'accéder à un suivi cinétique. Deux espèces furent échangées pour des souches très similaires, afin d'avoir des marqueurs quantitatifs de leur développement. Ainsi, nous avons substitué la souche de *Bacillus cereus* par deux souches différentes de *Bacillus thuringiensis* 407 Cry- exprimant soit de la GFP soit la protéine FAST, et la souche de *Pseudomonas fluorescens* par une souche de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 exprimant la mCherry (Lagendijk et al., 2010). De plus, l'analyse du séquençage de la souche *Kocuria varians* a montré *a posteriori* que cette souche est en fait un *Kocuria salsicia*. Finalement, les quatre espèces du biofilm étudié dans ce chapitre sont *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.* (cf. II.1.A et fig. III.2.1).



**Fig. III.2.1** : Images au x60 des 4 espèces de la communauté 4S, en transmission (ligne du haut), en fluorescence (ligne du bas) verte (GFP) pour *Bacillus thuringiensis* et rouge (mCherry) pour *Pseudomonas fluorescens*. Les barres d'échelle représentent 5 $\mu$ m.

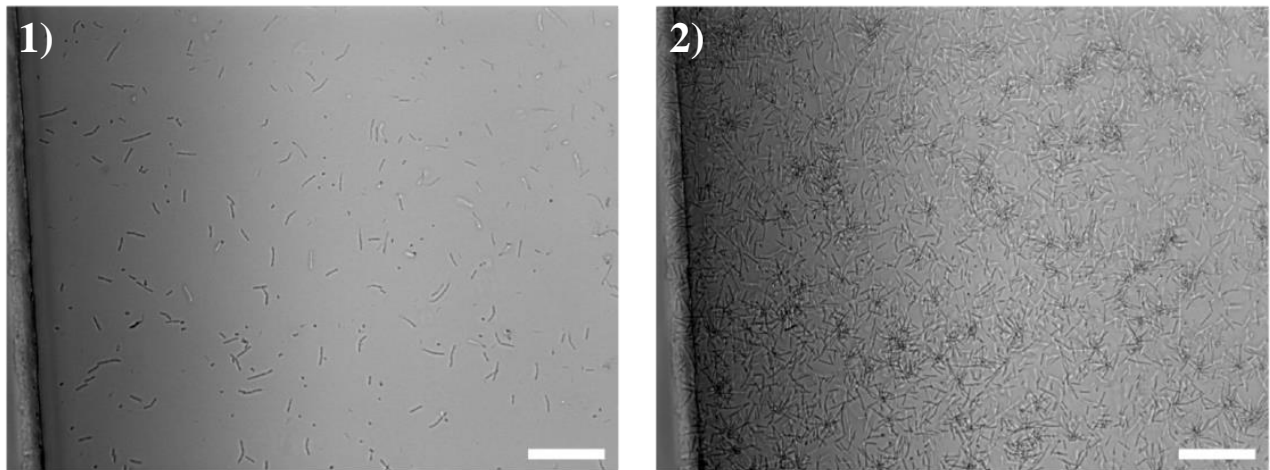
Nous avons ensuite installé l'ensemble du dispositif sur la platine du microscope dans une enceinte thermostatée. Après avoir mis au point le dispositif expérimental, la première étape de notre travail fut de déterminer si un biofilm 4S pouvait se former en flux puis d'étudier sa cinétique de formation en temps réel, ainsi que sa structure. Ensuite, la deuxième étape de notre travail fut de rechercher de potentielles interactions inter-espèces en étudiant la combinatoire des différentes espèces de la communauté (cf. III.3).

## III.2.B. Formation et développement d'un biofilm 4 espèces en flux

Pour rappel, nous avons utilisé des canaux de dimension 1mm de haut, 1mm de large et 30mm de long (cf : II.2.). Le flux appliqué était de 1 mL/h de milieu Mb (cf : II.1. et Annexe B) et les inocula toujours d'une concentration de  $10^6$  cellules par ml pour chaque espèce de bactéries, soit  $1.2 \times 10^5$  cellules au total par canal (cf : II.1.D.2.). Nous avons choisi ce système sur la base des expériences de biofilms réalisées au laboratoire avec *Escherichia coli* (Thomen et al., 2017) . Ce choix représente un bon compromis entre la vitesse d'advection des nutriments du milieu dans le canal, la force de cisaillement appliquée par le flux sur les biofilms, et la faisabilité de l'expérience à long terme (entre 30h et 65h) sans avoir à perturber le système.

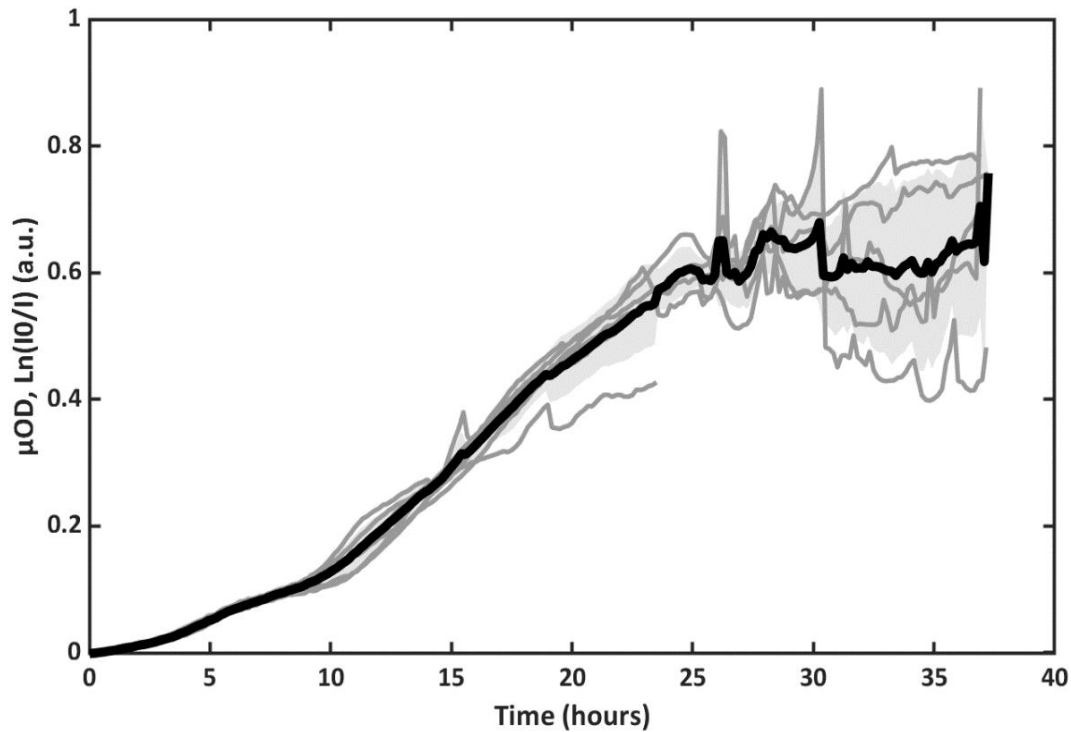
Les canaux sont inoculés avec  $10^6$  cellules par mL de chaque souche de bactérie en phase de croissance exponentielle, puis ces inocula sont laissés à incuber dans les canaux pour 1h sans flux. Les bactéries se répartissent de manière homogène dans le canal et sédimentent durant la phase d'incubation sur la surface de verre du canal suivie au cours du temps (fig. III.2.2-1). Après le temps d'incubation, un flux de Mb de 1 mL/h est appliqué sur toute la durée de l'expérience. La vidéo-microscopie débute quelques images avant le démarrage du flux.

Il semblerait que les bactéries ne subissent pas de temps de latence après la dilution des cultures exponentielles et l'injection, et qu'elles commencent à croître durant l'heure d'incubation. Cependant les premières divisions ont lieu 1 à 2 heures après l'inoculation dépendant des espèces, donc après le début du flux. Les bactéries se développent à la surface basse du canal et commencent à former le biofilm (fig. III.2.2-2).



**Fig. III.2.2 :** Images en transmission de la surface en verre et au bord d'un canal milli-fluidique inoculé avec les 4 souches de notre communauté. 1) 30min après inoculation, 2) 4h30 après inoculation, soit 3h30 sous flux à 1mL/h. Les barres blanches servent d'échelles et représentent  $55\mu\text{m}$ .

En se basant sur l'acquisition de la lumière transmise des images de vidéo-microscopie au cours du temps d'une même position dans un canal, on peut suivre le développement de la biomasse de la communauté bactérienne en définissant la micro densité optique ( $\mu\text{OD}$ ) comme étant  $\text{Ln}(I_0/I)$  (cf. II.3). Ainsi l'on obtient des données quantitatives permettant d'analyser la cinétique de formation de nos biofilms (Fig. III.2.3).

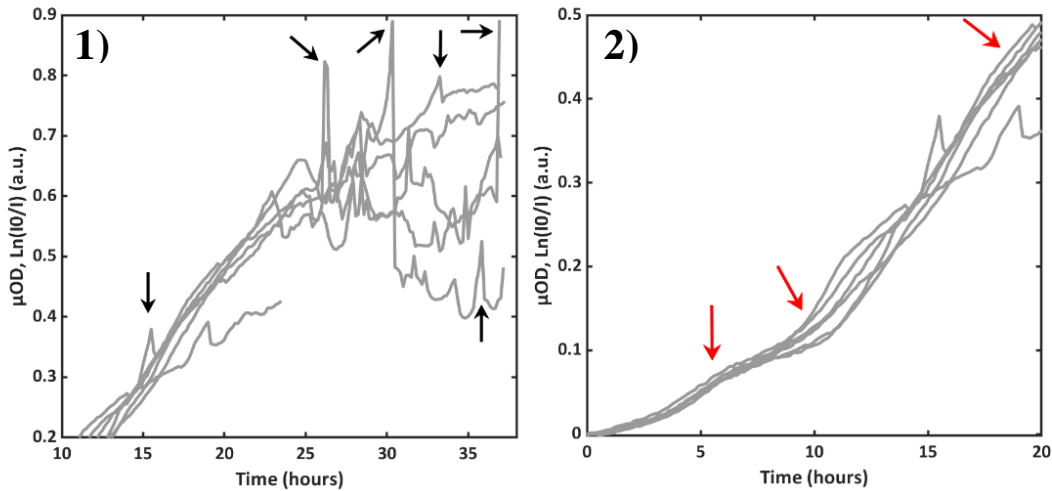


**Fig. III.2.3 :** Les courbes grises sont des répliques de 6 expériences identiques (à l'exception de l'une des expériences interrompues après seulement 24h contre 38h pour les autres), la courbe noire représente la moyenne des 6 courbes et la zone grisée l'écart type.

La  $\mu OD$  peut être calibrée et rendre compte du nombre de cellules présentes en biofilm mono-espèce (Thomen et al., 2017). Elle est ici à considérer avec précaution dans le système multi-espèces. En effet, la  $\mu OD$  est ici un descripteur global de la population du biofilm, représentant la biomasse totale que l'on ne peut pas relier à un nombre de cellules car chaque espèce a une taille et une morphologie différentes contribuant de manière très hétérogène à la valeur de ce descripteur. Par ailleurs, tout comme dans le système simple, la  $\mu OD$  est une grandeur qui sature à l'instar de la spectrophotométrie. Au-delà d'un certain seuil, sa valeur ne varie plus linéairement par rapport à la population suivie. Cependant, ce descripteur reste semi-quantitatif et permet d'appréhender les tendances de croissance du biofilm, et particulièrement d'en détecter les changements de régime.

Une première observation cruciale est que ces courbes de cinétique présentent une très bonne reproductibilité, particulièrement sur les 10 premières heures de la croissance. De 10 à 30h, des fluctuations qui restent néanmoins limitées apparaissent d'une courbe à l'autre. Enfin la dernière partie de ces courbes, caractérisée par une moyenne stable dans le temps est fortement bruitée. Si l'on regarde plus précisément la courbe de  $\mu OD$ , on observe — principalement dans les stades les plus avancés (Fig. III.2.4-1) — la présence de fluctuations ou pics aléatoires provenant le plus souvent du passage de floccs détachés emportés par le flux. Ces événements ont

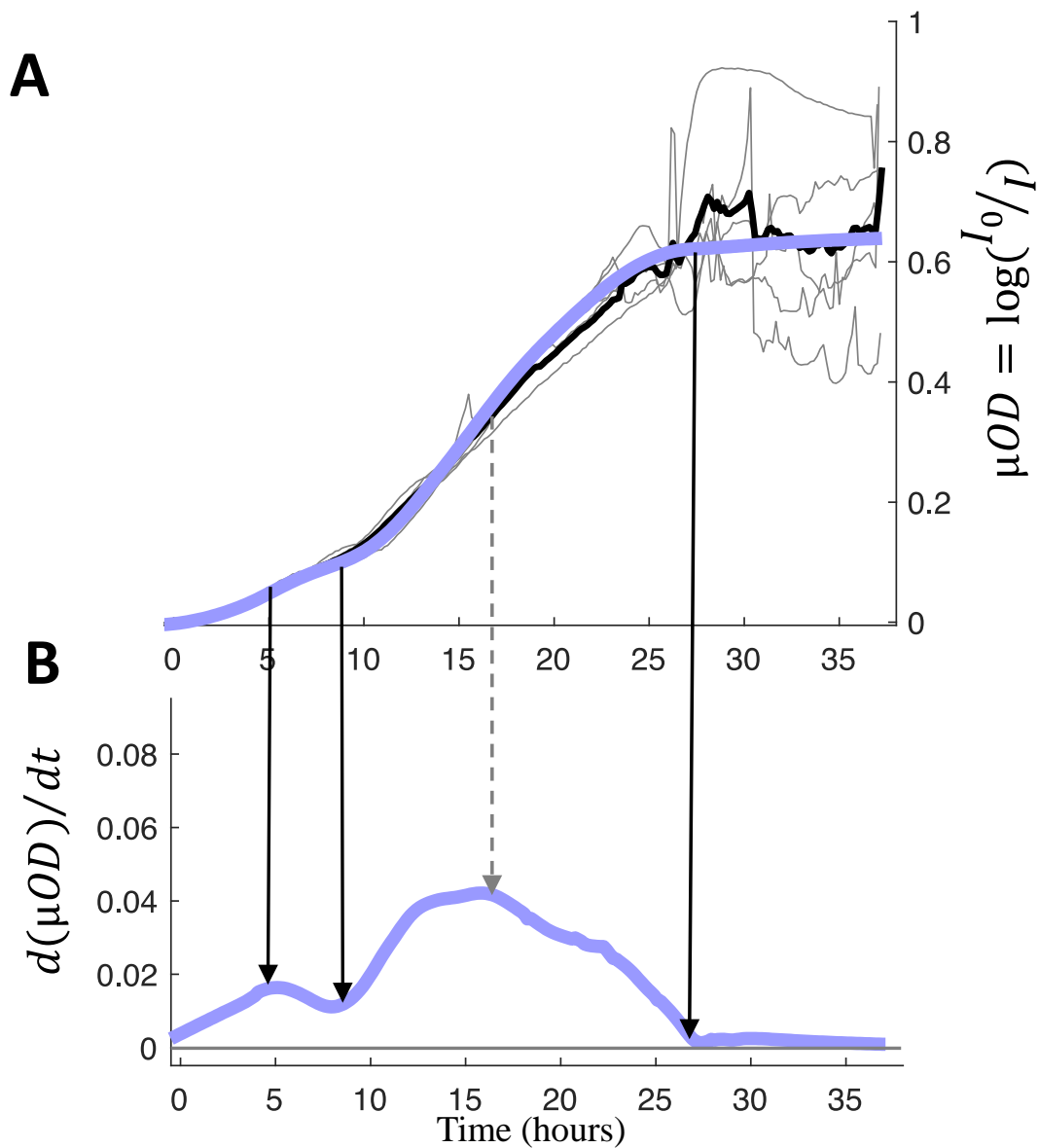
tendance à bruyier le signal moyen. Par ailleurs et de façon plus intéressante, on observe dans les phases plus précoces, la présence de plusieurs épaulements que l'on retrouve sur toutes les courbes de façon synchrone (Fig. III.2.4-2). Ceci suggère qu'ils correspondent à des stades caractéristiques que l'on cherchera à mieux définir.



**Fig. III.2.4 :** Courbes de cinétiques de la  $\mu\text{OD}$  en fonction du temps de différents biofilms 4S, 1) de 10h à 38h avec des flèches noires indiquant des passages de floccs, et 2) de 0 à 20h avec des flèches rouges indiquant des épaulements.

Afin de confirmer cela, on applique à la courbe moyenne un lissage (rloess avec un coefficient de 0.25) de façon à s'affranchir des fluctuations ponctuelles aléatoires et à conserver la signature des épaulement synchrones (Fig. III.2.5-A), puis on calcule le signal dérivé de la courbe moyenne lissée (Fig. III.2.5-B).

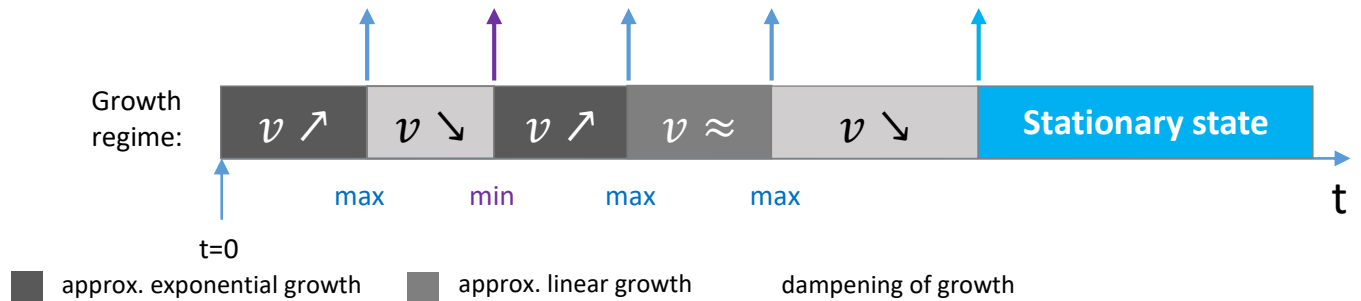
On constate que la dérivée reste positive tout au long du développement indiquant une croissance continue, mais on fait aussi apparaître distinctement des maxima et des minima qui signifient que la croissance est non-monotone. Sur cette base, on détermine alors plusieurs stades correspondant à une suite de séquences où la vitesse apparente de croissance de la biomasse augmente (stade 1), puis diminue (stade 2), augmente de nouveau jusqu'à une valeur maximale (stade 3) avant de s'amortir (stade 3') pour atteindre l'état stationnaire où la vitesse apparente de croissance est nulle (Tab. III.2.1).



**Fig. III.2.5 :** A) Courbes de cinétiques de la  $\mu OD$  en fonction du temps de différents biofilms 4S (en gris), avec la courbe moyenne de ces cinétiques (en noir) et la courbe moyenne lissée (en lavande). B) Courbe dérivée de la courbe moyenne lissée au cours du temps. Les flèches indiquent la correspondance temporelle des temps caractéristiques entre la partie A) et la partie B), avec en pointillé le moment de la vitesse de croissance du biofilm maximale.

Dans la suite, nous nous attacherons à comprendre plus avant la correspondance entre ces stades définis sur la base des variations de biomasse globale et le comportement des différentes souches.

characteristic time (h)	5	8	13	17	27
Biomass index	0,0494	0,0912	0,2131	0,3776	0,621



**Tab. III.2.1 :** Tableau récapitulatif des temps caractéristiques de la croissance du biofilm 4S déterminé via la  $\mu$ OD. La frise résume les régimes de croissance du biofilm 4S entre chaque temps caractéristique. L'indice de biomasse est donné par la valeur moyenne de la  $\mu$ OD au temps concerné.

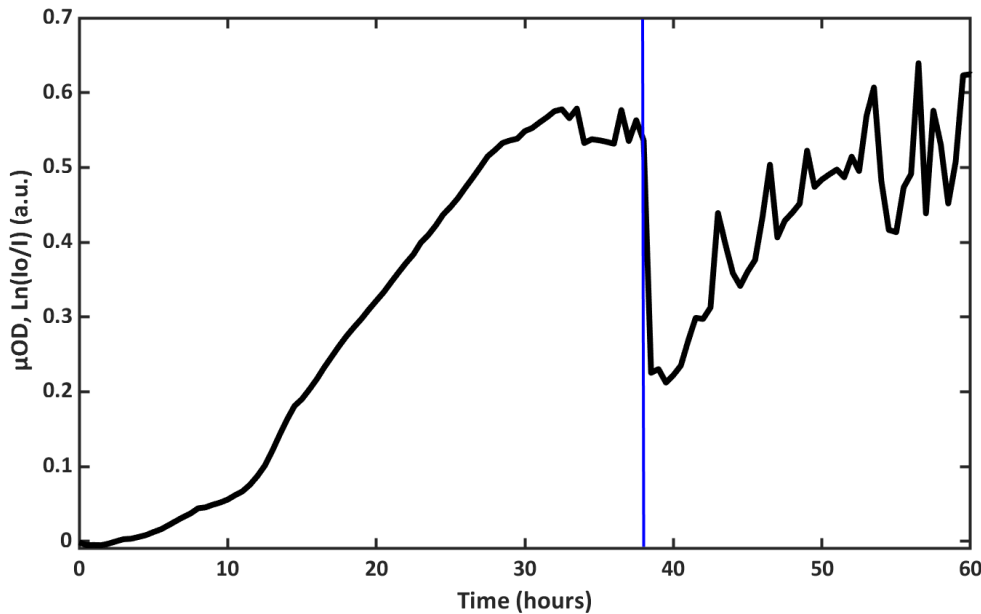
Pour confirmer l'hypothèse de la formation d'une communauté 4S stable et tester sa résilience, nous avons réalisé une expérience de perturbation physique (Fig. III.2.6). Après avoir suivi le protocole classique d'expérience de biofilm 4S durant 38h, nous avons fait passer dans le canal une bulle d'air de 100 $\mu$ L destinée à provoquer une érosion physique importante du biofilm. Nous avons alors remarqué que la  $\mu$ OD de notre biofilm baissait d'environ 40%, et que 2h après le passage de cette perturbation, la croissance du biofilm reprenait suivant une pente similaire à celle de croissance de 10h à 30h mais en plus bruitée dû au passage de floccs. De plus, après 17h de croissance, le biofilm semble avoir retrouvé la même phase stable qu'avant la perturbation. L'importance du bruit associé au passage de floccs, suggère que cette phase stable correspond bien à un état stationnaire résultant de la combinaison d'un certain niveau de croissance et d'évènements de détachement.

Ainsi, notre communauté multi-espèces forme un biofilm sous flux. La formation de ce biofilm atteint un état stationnaire reproductible, ce qui suggère un développement déterministe obéissant à des règles. De plus, ce biofilm semble capable de retourner à cette phase stationnaire après perturbation montrant sa résilience. Cette propriété définit la stabilité d'une communauté pour plusieurs auteurs en écologie théorique (Gonze, Coyte, Lahti, & Faust, 2018).

Nous disposons donc d'un modèle de communauté adhérente 4-espèces vivantes issues d'une communauté naturelle et non assemblée artificiellement dans un objectif précis. Le développement défini de cette communauté dans un système milli-fluidique parallélisable monté

sur la platine d'un microscope, et donc observable en vidéo-microscopie, constitue le premier acquis de mon travail de thèse.

A ce stade, nous nous sommes intéressés à comprendre plus en détail la structure de ce biofilm, c'est-à-dire sa composition, la distribution spatiale des espèces et la dynamique de leur évolution.



**Fig. III.2.6 :** Courbes de cinétiques de la  $\mu OD$  en fonction du temps de biofilms 4S avec une perturbation physique à 38h de croissance (ligne bleue), en phase d'équilibre pseudo-stationnaire.

Pour mener à bien cette analyse, nous avons dû chercher des grandeurs quantitatives permettant de décrire plus précisément le comportement de chaque espèce au sein du biofilm et d'établir la cinétique de leur développement respectif dans le contexte 4S.

### III.2.C. Etude des marqueurs quantitatifs du biofilm 4S

Afin de pouvoir suivre la cinétique de développement individuel des espèces dans la communauté 4S, nous avons utilisé deux souches fluorescentes : *Pseudomonas fluorescens*

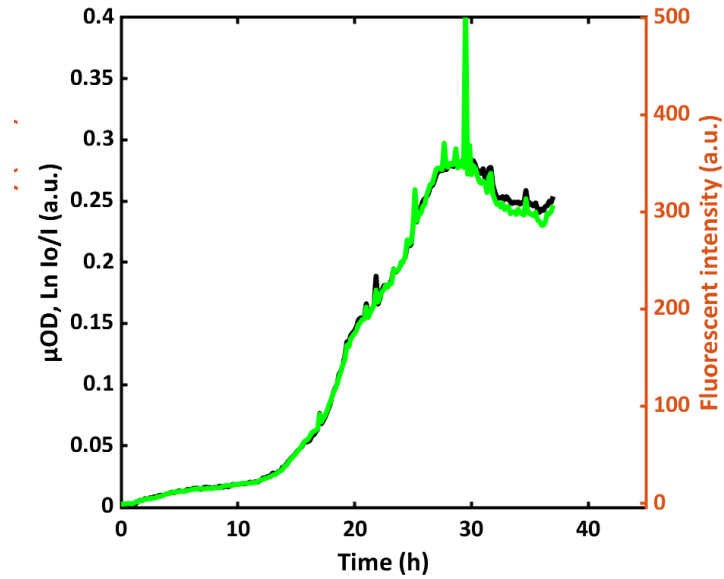


produisant de la mCherry et *Bacillus thuringiensis* produisant de la GFP, que nous avons ensuite substitué par *Bacillus thuringiensis* produisant la protéine FAST (cf. III.1) capable de fluorescer en complexe avec une petite molécule (dans ce chapitre, la molécule utilisée est l'HBR 2.5 DM, créant un complexe avec FAST qui fluoresce en vert). Dans cette partie du chapitre III.2, nous allons montrer la calibration et les limites de ces fluorophores pour l'étude du biofilm 4S.

### III.2.C.1 Protéines fluorescentes : Limitations en biofilm 4S

Comme démontré dans le chapitre III.1, le contexte du milieu confiné sous flux pose des difficultés pour utiliser des protéines fluorescentes classiques. Rapidement la croissance du biofilm crée une forte déplétion en dioxygène ( $O_2$ ) et dès lors les protéines fluorescentes synthétisées par les bactéries, telles que la GFP ou mCherry ne sont plus conformées correctement et donc ne sont pas fluorescentes.

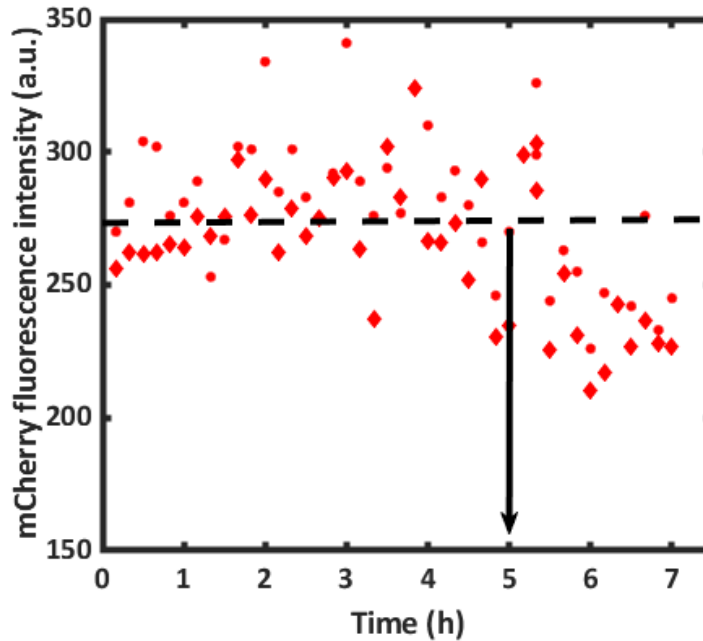
Dans l'optique de pallier ce problème, nous avons mis en place l'alternative que représente la protéine FAST et la fluorescence qu'elle produit lorsqu'elle forme un complexe avec une autre molécule (ici, l'HBR 2.5 DM), comme décrit précédemment dans le chapitre III.1 sur la souche *Escherichia coli*. Nous avons donc remplacé la production de la GFP par celle de FAST dans la souche de *Bacillus thuringiensis*. Nous pouvons d'ailleurs voir sur un biofilm simple de *Bacillus thuringiensis* mono-espèce que la fluorescence suit parfaitement le signal de  $\mu OD$  (Fig. III.2.7).



**Fig. III.2.7 :** Courbes de cinétiques de la  $\mu OD$  (noir) et de l'intensité de fluorescence de FAST :HBR (vert) en fonction du temps d'un biofilm mono-espèce de *Bacillus thuringiensis*.

Il sera intéressant dans la suite de suivre en parallèle le signal GFP et le signal FAST-HBR pour avoir un indicateur indirect de la possible déplétion locale en dioxygène.

Reste la question de la fluorescence de mCherry que nous n'avons pas encore pu remplacer. Nous savons que comme la GFP cette protéine est sensible au taux d' $O_2$  et que sa fluorescence ne va plus relier proportionnellement l'abondance de *Pseudomonas fluorescens* à partir du moment où l' $O_2$  sera plus faible que le seuil requis pour la cyclisation finale du chromophore. Nous cherchons à identifier ce stade de manière à pouvoir utiliser la mCherry comme descripteur quantitatif sur le début de la croissance du biofilm et comme indicateur de tendance au-delà du seuil de linéarité. Nous avons évalué cette limite en mesurant sur un film type du développement du biofilm 4S (acquisition de mCherry permettant de visualiser *Pseudomonas fluorescens*) l'évolution dans le temps de la fluorescence des *Pseudomonas fluorescens* uniques. (Fig. III.2.8). On constate que la fluorescence propre des *Pseudomonas fluorescens* commence à diminuer dès  $t=5h$ .



**Fig. III.2.8 :** Mesure de l'intensité de fluorescence de cellules uniques de *Pseudomonas fluorescens* durant les 7 premières heures de biofilm.

### III.2.C.2 Quantification des signaux de fluorescence

Ici, nous allons déterminer quel est le rapport entre l'intensité mesurée de ces rapporteurs et le nombre d'individus qu'ils représentent dans le biofilm dans leur régime linéaire. Pour déterminer cela, nous allons définir plusieurs paramètres de nos images de microscopie en fluorescence (Fig. III.2.9). De ces paramètres, nous avons déduit la relation de proportionnalité suivante (Tab. III.2.2, pour la définition des paramètres) :

$$I = \frac{a \cdot I_{sc} + b \cdot I_b}{a + b} = \frac{a \cdot I_{sc} + (S_T - a) \cdot I_b}{S_T}$$

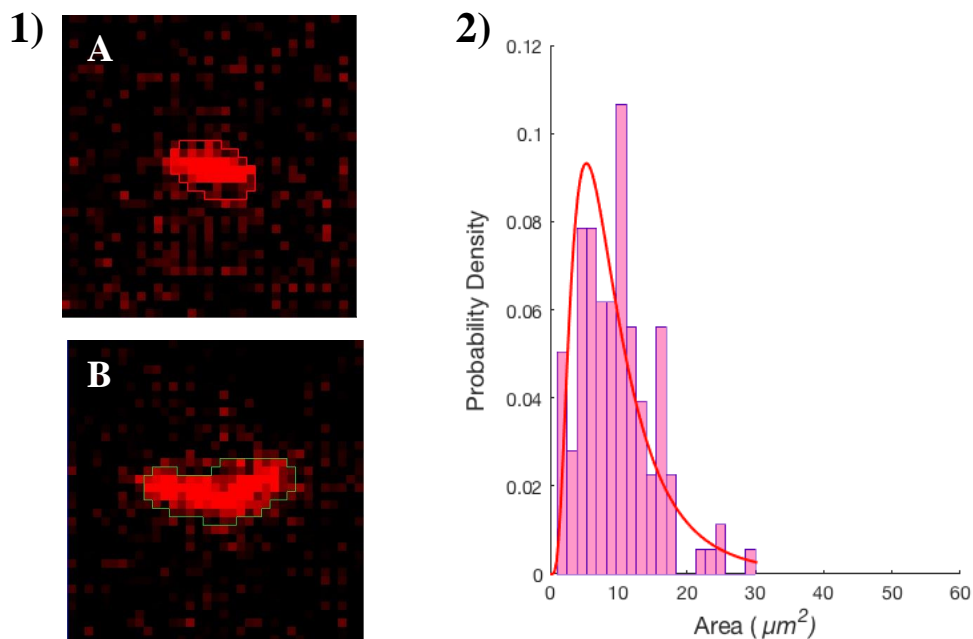
$$I = \frac{a \cdot (I_{sc} - I_b) + S_T \cdot I_b}{S_T} \Rightarrow a = \frac{S_T \cdot (I - I_b)}{I_{sc} - I_b}$$

$$N = \frac{a}{s} = \frac{S_T \cdot (I - I_b)}{s \cdot (I_{sc} - I_b)} \Rightarrow N \propto (I - I_b)$$

Paramètres	Grandeur
I	Intensité moyenne d'une image par pixel
$S_t$	Taille totale de l'image (1376256 pixels)
s	Taille moyenne d'une cellule (en pixels)
$I_{sc}$	Intensité moyenne d'une cellule
$I_b$	Intensité moyenne par pixel du fond typique d'une image
a	Nombre de pixels au dessus de $I_b$ (aire totale des objets détectés)
b	Nombre de pixels de fond
N	Nombre de cellules contribuant au signal fluorescent

**Tab. III.2.2 :** Tableau des paramètres utilisés pour déterminer le rapport entre l'intensité de fluorescence d'une image et le nombre de cellules fluorescentes s'y trouvant.

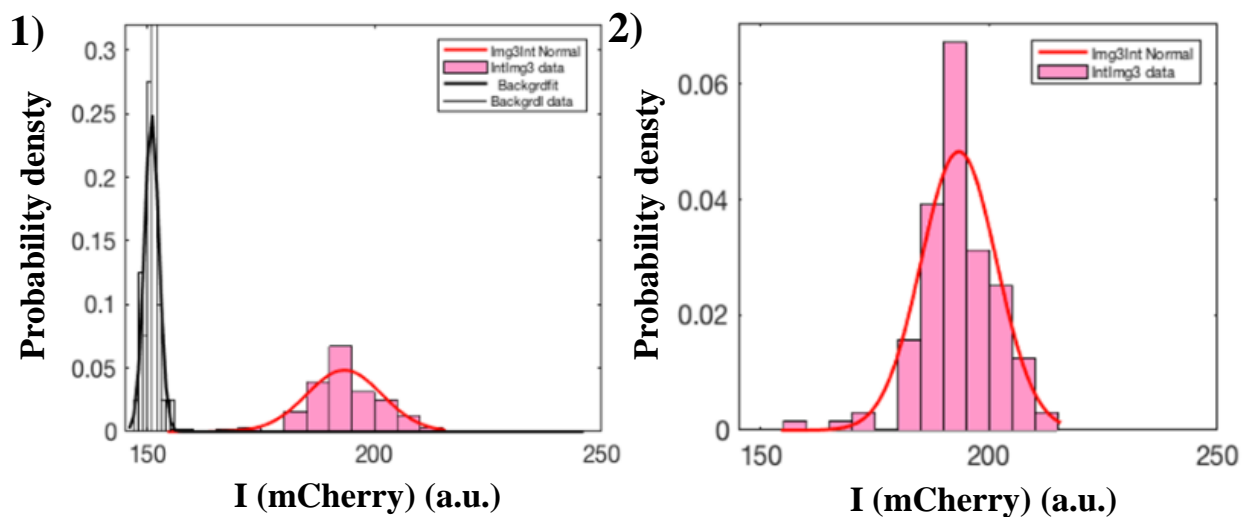
Nous avons défini la taille des cellules comme étant l'empreinte de fluorescence des cellules sur une image. Cette taille est cependant quelque peu différente de la taille réelle de la cellule. Cette taille  $s$  est obtenue sur l'image aux temps courts d'acquisition (Fig. III.2.9-1), durant le temps d'incubation du biofilm. Nous obtenons cette empreinte de fluorescence en binarisant les images à l'aide du logiciel NIS et sa fonction autodetect ou smart-threshold. Une suspension planctonique de cellules individuelles présente une distribution log-normale de la taille des cellules (Soifer, Robert, & Amir, 2016). Par conséquent, nous ajustons la distribution des objets détectés automatiquement sur l'image à une fonction log-normale (Fig. III.2.9-2). Nous observons



**Fig. III.2.9 :** Détermination de la taille des cellules  $s$ . 1) Images en fluorescence de la mCherry de *Pseudomonas fluorescens* A) après inoculation, B) une heure plus tard. 2) Distribution de la taille de la population de *Pseudomonas fluorescens* basée sur la détermination des cellules seuillées comme en 1.A).

que la distribution expérimentale présente une asymétrie droite supérieure à celle attendue de la loi log-normale. Cela se comprend aisément du fait que les cellules venant de se diviser peuvent être adhésives entre elles (cellules filles et cellules mères), et que ces ensembles de cellules sont analysés comme un objet unique par opposition à ce qui se passe dans des conditions planctoniques où les cellules sont le plus souvent isolées et donc où ce genre de problèmes est de moindre importance. En utilisant le mode de cette distribution, nous avons déterminé que la taille moyenne, via la surface occupée sur l'image, d'une cellule de *Pseudomonas fluorescens* est de 48.6 pixels, soit  $5.29\mu\text{m}^2$ , et que celle d'une cellule de *Bacillus thuringiensis* est de 99.86 pixels, soit  $10.86\mu\text{m}^2$ .

D'autre part, nous avons déterminé l'intensité moyenne d'un cellule unique  $I_{sc}$ , avec nos paramètres d'acquisition. Sur les mêmes images que pour la détermination de la taille des cellules  $s$ , nous avons porté notre intérêt sur l'intensité de fluorescence (Fig. III.2.10). Sur ces images, on mesure l'intensité moyenne par pixel du fond  $I_b = 151 \pm 1.2$  a.u. pour le canal d'acquisition de l'intensité de la mCherry (Fig. III.2.10-1), et de  $126.6 \pm 2.2$  a.u. pour le canal d'acquisition de l'intensité du complexe FAST:HBR. Puis, on mesure l'intensité des cellules  $I_{sc}$ , sur la première heure de vidéo-microscopie, soit  $192.6 \pm 2.3$  a.u. pour les cellules de *Pseudomonas fluorescens* fluorescentes via la mCherry (Fig. III.3.10-2), et de  $144.91 \pm 4.41$  a.u. pour les cellules de *Bacillus thuringiensis* fluorescentes via le complexe FAST:HBR.



**Fig. III.2.10 :** Détermination des intensités moyennes des cellules et du fond. 1) Distribution de l'intensité de fluorescence de mCherry. Deux pics apparaissent, en gris l'intensité du fond du milieu, et en rose la population de cellules de *Pseudomonas fluorescens*. 2) Zoom sur la distribution de l'intensité de la population de cellules de *Pseudomonas fluorescens*.

Ainsi, en mesurant l'intensité globale d'une image nous avons pu déterminer le nombre de cellules fluorescentes de chaque canal d'acquisition de fluorescence. Par exemple, pour une intensité moyenne d'une image de 200 a.u., on obtient un nombre de cellules de *Pseudomonas fluorescens* (via mCherry) de  $2.7 \times 10^4$  cellules par image et de *Bacillus thuringiensis* (via FAST:HBR) de  $5.5 \times 10^4$  cellules par image, soit respectivement  $5.78 \times 10^6$  et  $1.2 \times 10^7$  cellules par canal.

	s (μm <sup>2</sup> )	I <sub>sc</sub> (a.u.)	I <sub>b</sub> (a.u.)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2.29	192.6	151
<i>Bacillus thuringiensis</i>	10.86	144.91	126.6

**Tab. III.2.3 :** Tableau récapitulatif des valeurs clés de la quantification des signaux fluorescents.

### III.2.C.3 Le coefficient de corrélation et la dynamique spatiale au sein du biofilm.

De manière à évaluer la dynamique spatiale des bactéries au sein du biofilm, nous avons mené une analyse de corrélation d'images par paires successives (image n versus image n+1). Nous avons appliqué le plugin Image correlation<sup>\*</sup> dont le principe est le suivant :

La similarité entre 2 images est évaluée en calculant le coefficient de corrélation de Pearson, R d'après l'équation suivante :

$$R = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (f(m_i, n_j) - \bar{f})(g(m_i, n_j) - \bar{g})}{(mn-1)\sigma_f \sigma_g}$$

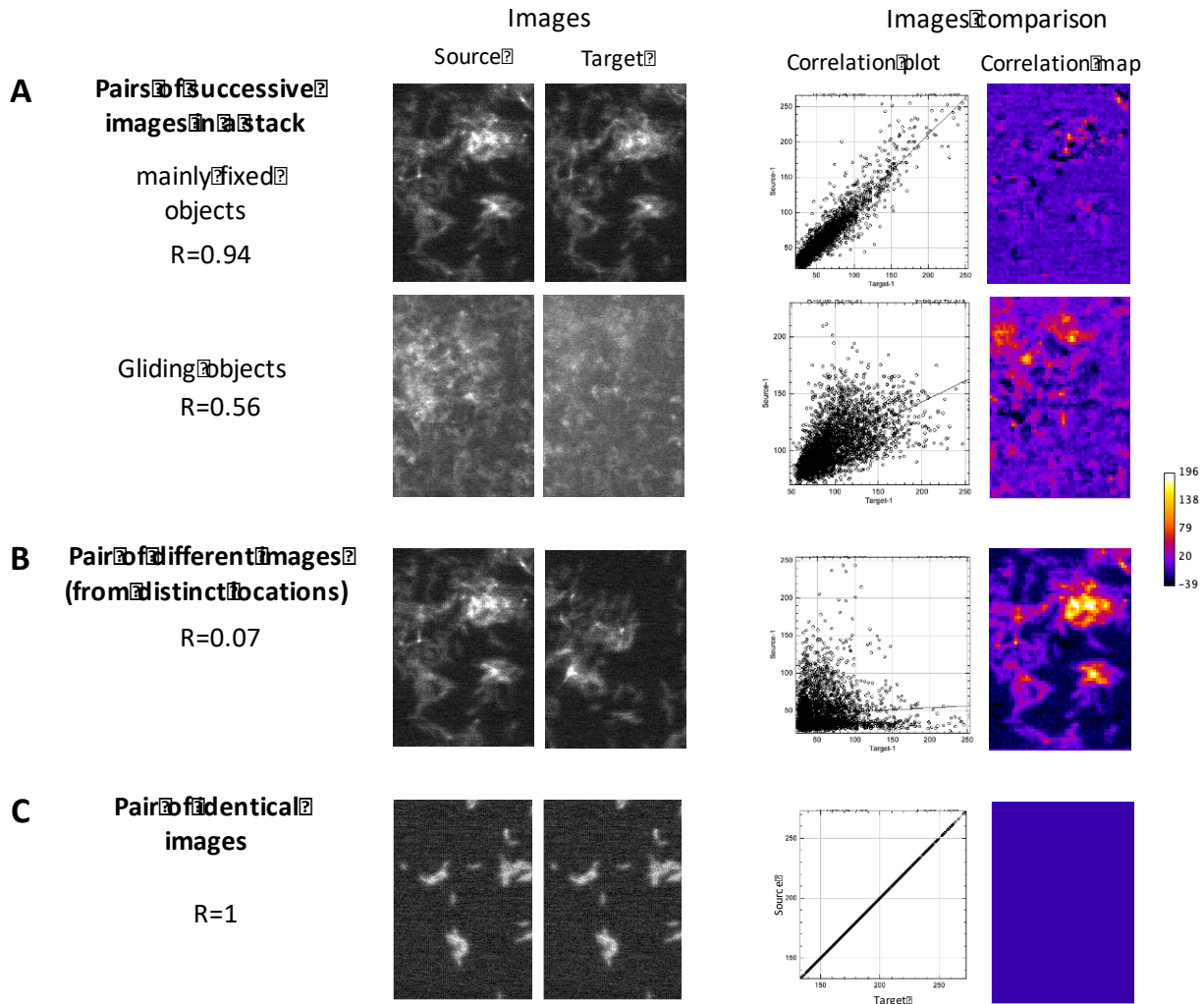
où  $m$  et  $n$  sont le nombre de pixels ou groupe de pixels (nous utilisons une région unitaire de 3 pixels de côté) dans les directions  $x$  et  $y$  respectivement,  $f(m_i, n_j)$  et  $g(m_i, n_j)$  sont les valeurs locales à la position locale  $(m_i, n_j)$  de l'intensité de l'image (dans notre cas l'intensité de FAST moyennée sur le groupe de pixels),  $\bar{f}$  et  $\bar{g}$  sont les moyennes respectives de l'intensité des images entières,  $\sigma_f$  et  $\sigma_g$  sont les écarts-types correspondants.

Les données collectées sur l'image pour calculer R permettent également de comparer les images plus en détails en éditant le graphe de correspondance des valeurs moyennes d'intensité de l'image 1 dite « source » et de l'image 2 dite « target » pour chaque pixel ou groupe de pixel

<sup>\*</sup> (<http://www.gcsca.net/IJ/ImageCorrelationJ.html>)

(correlation plot) et la carte des différences comparées à la régression du graphe des correspondances (voir détails : (Syverud, Chinga, Johnsen, Leirset, & Wiik, 2007)).

Cette approche nous permettra d'évaluer dans la suite le degré de dynamique des espèces fluorescentes dans le biofilm 4S. En effet les objets très mobiles vont changer d'empreinte spatiale d'une image à la suivante, ce qui dégrade la corrélation des deux images et fait diminuer le coefficient de corrélation, alors que des objets fixes ou quasi-fixes vont produire un coefficient de corrélation élevé (Fig. III.2.11). Il faut noter qu'il est crucial d'avoir auparavant aligner les piles d'images sur un objet fixe pour s'affranchir des mouvements parasites pouvant provenir de certaines instabilités du montage (repositionnement de la platine ou micromouvements des canaux).



**Fig. III.2.11 :** Analyses de corrélation de plusieurs paires d'images caractéristiques montrant différents degrés de similitude. Sont représentées pour chaque condition l'image « source », l'image « target », le graphe de corrélation et la carte de corrélation des images. Les conditions montrées ici sont : A) première ligne : objets fixés ; seconde ligne : objets mobiles ; B) une paire d'images non continues ; et C) une paire d'images identiques.

## III.2.D Structure et dynamique de la formation du biofilm 4S.

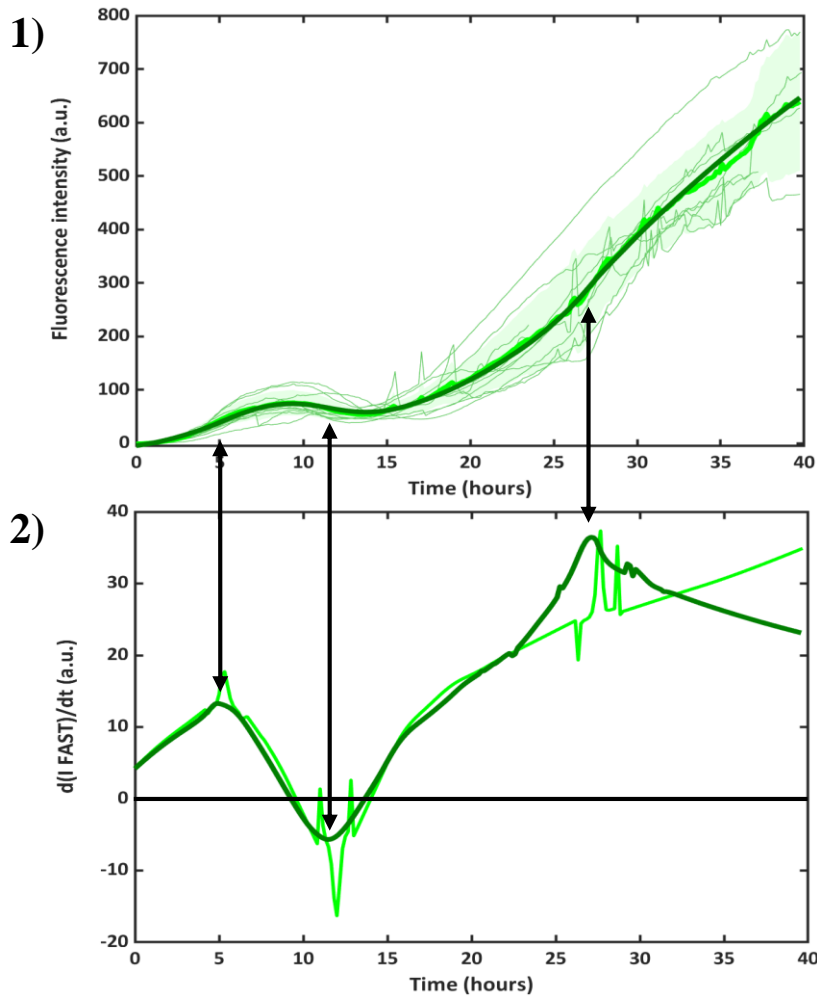
### III.2.D.1 Comportements individuels en contexte 4S



- ***Bacillus thuringiensis***

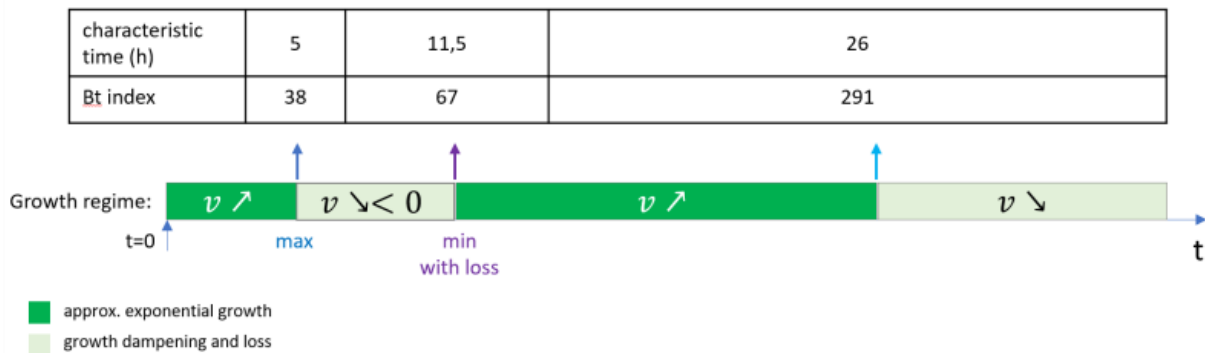
a) Cinétique de croissance

A l'aide de la fluorescence de *Bacillus thuringiensis* (FAST:HBR), nous pouvons maintenant suivre spécifiquement la cinétique de croissance de cette souche dans le biofilm 4S. Sur la base des courbes de fluorescence (Fig. III.2.12-1), on voit apparaître différentes phases de croissance



**Fig. III.2.12 :** 1) Courbes de l'intensité de fluorescence de *Bacillus thuringiensis* dans le biofilm 4S au cours du temps. En vert, les courbes expérimentales acquises dans les mêmes conditions de différents biofilms ; en vert clair, la courbe moyenne de ces premières avec son écart-type représenté par une zone vert pâle ; en vert foncé, la courbe moyenne lissée. 2) Courbes dérivées de la moyenne des cinétiques (vert) et de la moyenne lissée (vert foncé) de l'intensité de fluorescence de *Bacillus thuringiensis* dans le biofilm 4S. Les flèches noires explicitent les moments clés de la dynamique de croissance de *Bacillus thuringiensis* et les lient à sa cinétique de l'intensité de fluorescence. Ces moments représentent dans l'ordre chronologique le premier maximum de vitesse de croissance de *Bacillus thuringiensis*, le minimum de vitesse de croissance (ici, négative, indiquant une décroissance) et le second maximum de vitesse de croissance.

qui sont bien marquées par la courbe dérivée (Fig. III.2.12-2). Cette dérivée est obtenue de la même manière que celle de la  $\mu$ OD, après lissage de la courbe moyenne. Les maxima et minima de la dérivée indiquent un développement incluant la succession de phases d'accélération et de ralentissement de la croissance (Fig. III.2.13). La courbe dérivée fait apparaître un climax à 5h correspondant à la vitesse d'expansion maximale de Bt en 4S et à 11h où c'est la régression de *Bacillus thuringiensis* qui est alors maximale. A partir de 11h la régression s'inverse et le biofilm entre de nouveau dans une phase de croissance continue. Une singularité est mise en évidence par la courbe dérivée entre 26h et 30h sans que son origine soit bien claire.

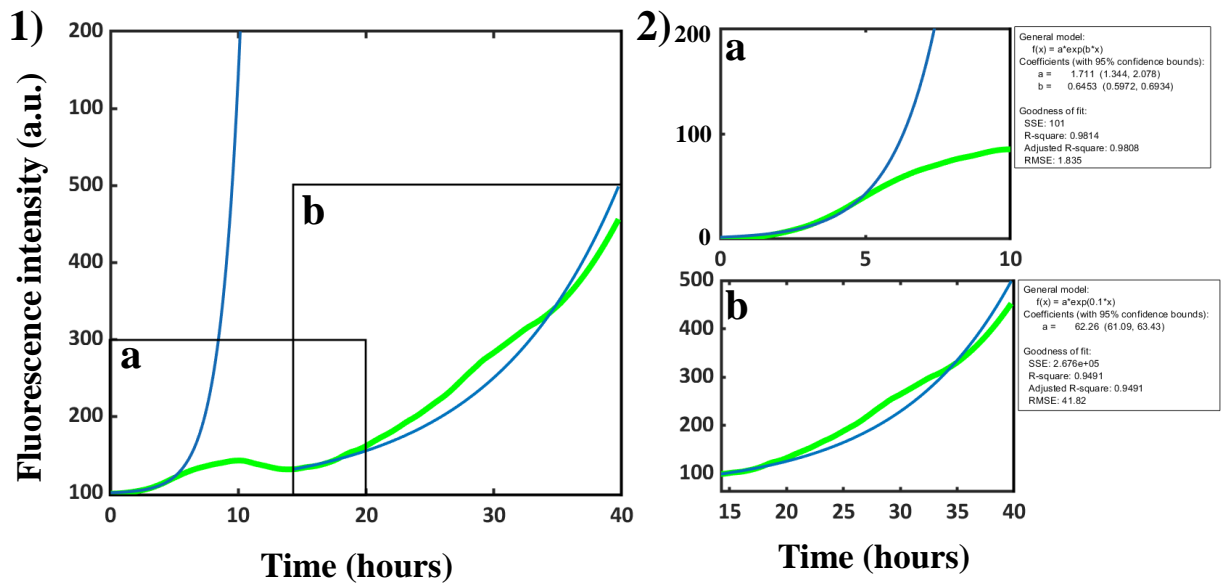


**Fig. III.2.13 :** Figure récapitulative des phases de croissance de *Bacillus thuringiensis* en biofilm 4S.

La première phase de 0 à 5h suit une croissance exponentielle dont la constante est égale à  $r_1 = 0.64 h^{-1}$  (Fig. III.2.14-2.a), ce qui correspond à un temps de doublement de la biomasse produite par *Bacillus thuringiensis* de l'ordre de 1h. En comparaison, on trouve en culture planctonique un temps de doublement de 40 min (Cf. annexe D). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les cellules peuvent être emportées par le flux dans nos conditions de biofilms, ralentissant le temps de doublement apparent de nos bactéries.

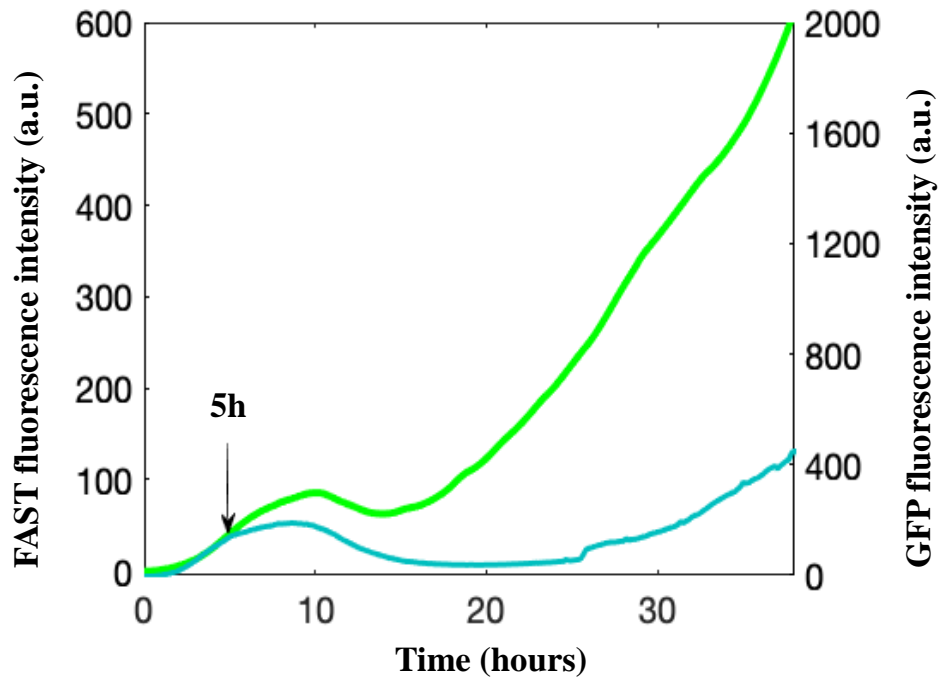
A partir de  $t_1=5h$  à  $t_2=11h$ , la croissance de la population de *Bacillus thuringiensis* s'amortit sensiblement jusqu'à ce que la population elle-même décroisse (valeurs négatives de la dérivée) attestant d'un détachement partiel des Bt résidant à la surface.

Il est probable que la vitesse de développement soit essentiellement modulée par le détachement des *Bacillus thuringiensis* de la couche de biofilm. Cependant, nous n'avons pas pour l'instant d'éléments permettant d'évaluer précisément la vitesse de division à l'échelle cellulaire à ce stade du biofilm car il est devenu difficile de distinguer les cellules individuelles. Il est cependant possible d'estimer grossièrement un temps de doublement de la population de *Bacillus thuringiensis* en assimilant la dernière phase de croissance approximativement à une exponentielle (Fig. III.2.14-2.b). La constante de vitesse apparente est alors significativement plus faible égale à  $r_2 = 0.1h^{-1}$ .



**Fig. III.2.14 :** 1) Courbe de l'intensité moyenne lissée de la fluorescence de *Bacillus thuringiensis* dans le biofilm 4S au cours du temps (vert), avec des fit des deux phases de croissance (bleu). Deux zones, a et b, sont encadrées et correspondent aux zooms en 2). Les cadres accolés aux zooms a et b explicitent les caractéristiques des fit employés.

A ce stade, nous avons voulu comparer les signaux produits par FAST-HBR et par GFP. La figure III.2.15 montre les moyennes obtenues pour chaque marqueur. On peut voir que, très tôt dès les 2-3 premières heures, la fluorescence de GFP diverge à la baisse en comparaison de celle de FAST indiquant une diminution du taux d'O<sub>2</sub> dans le biofilm à un niveau ne permettant plus la maturation complète de la GFP, et donc sa fluorescence non plus. Il est intéressant de constater que cette divergence survient à t=5h, soit t<sub>1</sub>, le temps où la croissance de la population de *Bacillus thuringiensis* commence à s'amortir.

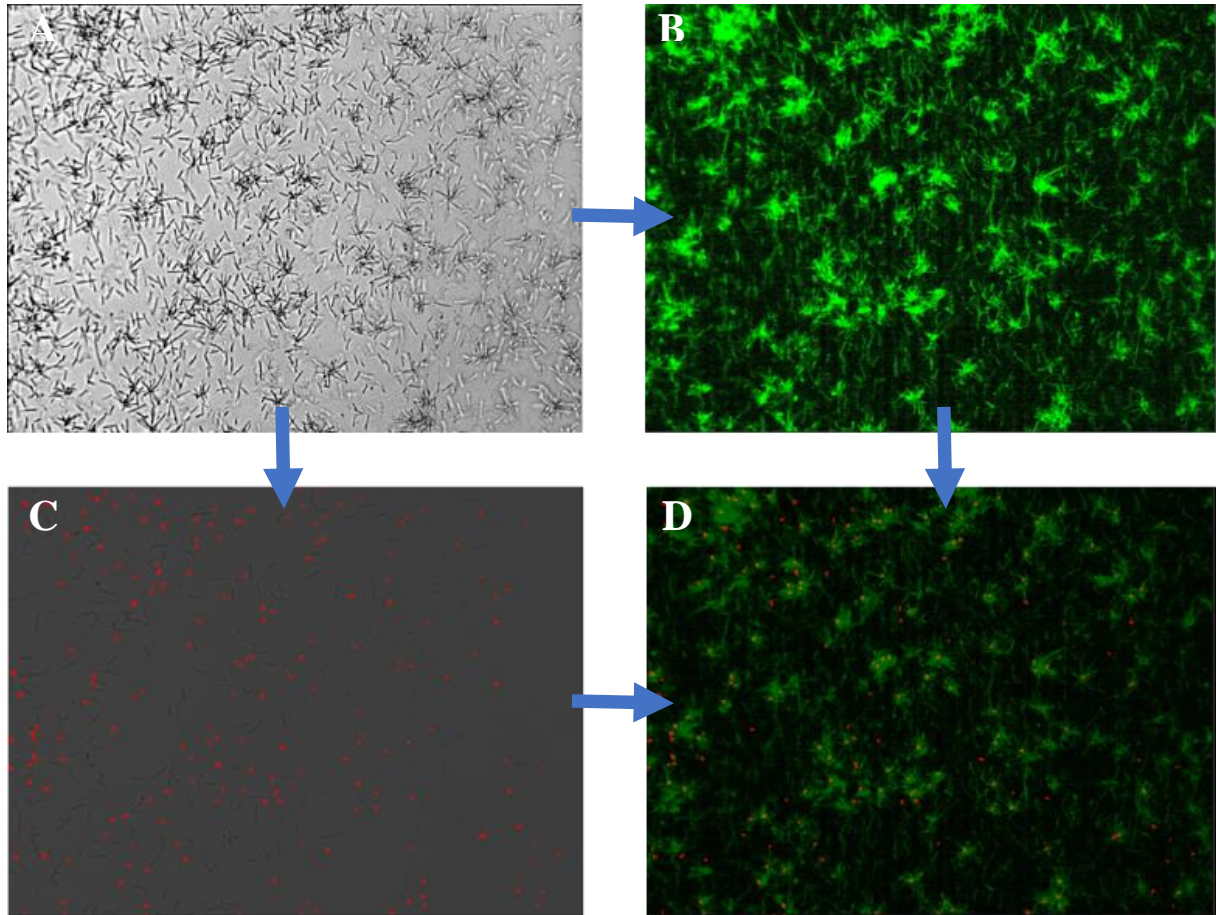


**Fig. III.2.15 :** Comparaison des courbes d'intensité de fluorescence moyenne de *Bacillus thuringiensis* exprimant soit la protéine FAST (vert), soit la protéine GFP (bleu) de biofilm 4S au cours du temps. La flèche noire indique le moment de divergence entre les deux rapporteurs fluorescents.

## b) Distribution spatiale

### Formation d'asters :

Si l'on observe le film de l'installation de *Bacillus thuringiensis* dans le 4S, on note à partir de  $t=2h30$  après le début du flux, la formation d'amas de *Bacillus thuringiensis* en forme d'asters, aléatoirement répartis sur la surface du canal. On peut faire des analyses de co-localisation qui montrent que ces asters se développent majoritairement à des positions initialement occupées par *Kocuria salsicia* dans le canal (Fig. III.2.16). Ainsi, il semblerait que près de 88% de ces structures se co-localisent sur des positions où *Kocuria salsicia* se trouvait initialement à  $t=0h$ . De plus, près de 92% des positions initiales de *Kocuria salsicia* présentent ces structures d'aster avec *Bacillus thuringiensis*. Or, en comparant ces images de transmission à  $t=0h$  et au temps précoce, l'on remarque que le nombre de positions avec *Kocuria salsicia* diminue de 8% et que 10% des positions d'aster sont formées avec de nouveaux *Kocuria salsicia*. Cela peut s'expliquer par un effet du flux qui détachant et emportant quelques *Kocuria salsicia*, tout en en redéposant d'autres dans des proportions similaires. Aucun aster n'est formé en absence de *Kocuria salsicia*.



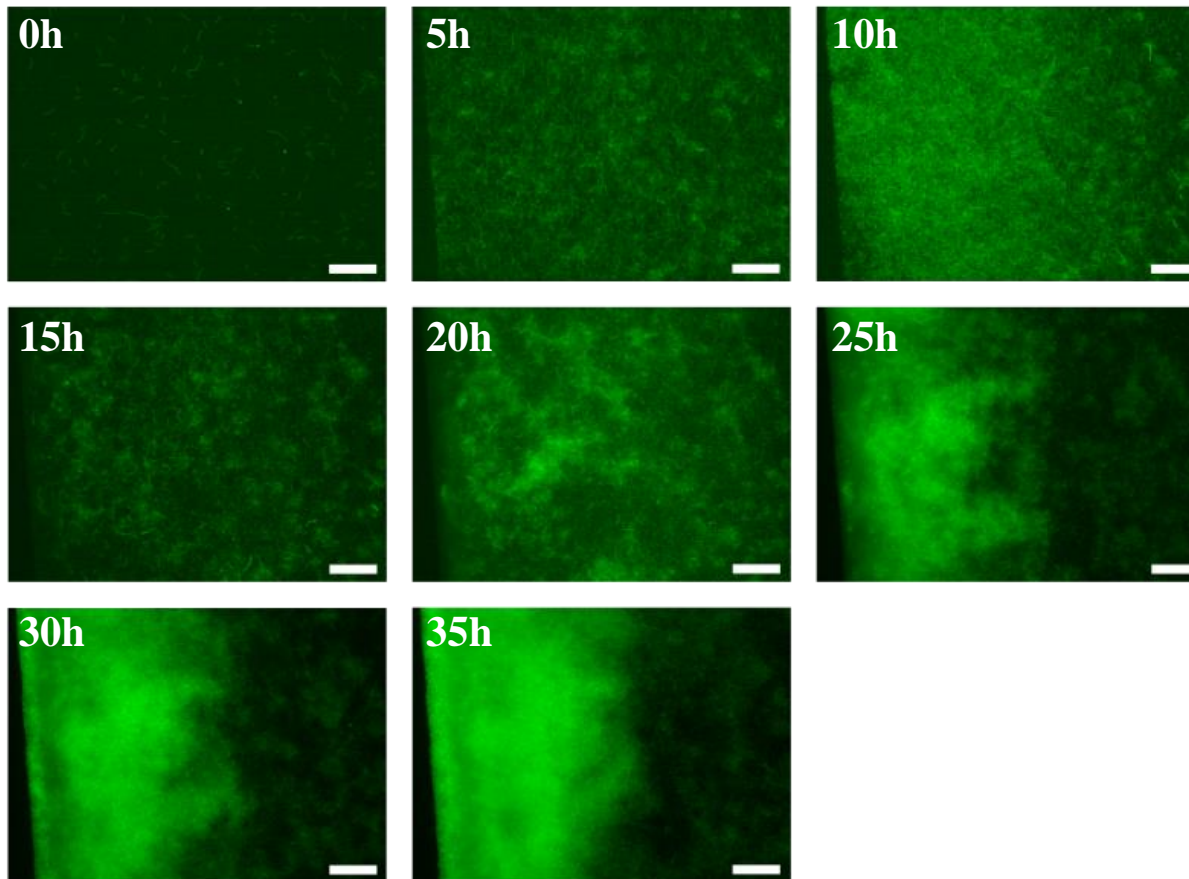
**Fig. III.2.16 :** Images d'un biofilm 4S en début de croissance en TL (A) et en fluorescence de la protéine FAST de *Bacillus thuringiensis* (B). C) Image du même biofilm 4S en TL à t=0h, avec la localisation des *Kocuria salsicia* explicitée par des points rouges (détection automatique des objets sphériques avec le logiciel FIJI). D) Superposition des images de fluorescence au temps précoce et des localisations de Ks à t=0h. Sur l'image D), on dénombre 18 positions initiales de *Kocuria salsicia* sans aster, et 27 asters formés hors d'une position initiale de localisation de *Kocuria salsicia*, sur 226 asters dénombrés.

### Asymétrie latérale :

Si on s'intéresse à la distribution spatiale globale de *Bacillus thuringiensis* dans le 4S sur le long terme (Fig. III.2.17), on voit que sur les 5 premières heures les *Bacillus thuringiensis* se développent de manière assez uniforme sur la surface, puis, progressivement, la densité de fluorescence se concentre de plus en plus fortement aux bords du canal alors que la densité au centre semble stagner.

Cette concentration des cellules au voisinage des parois peut avoir 2 origines. La première est due à une plus faible exposition aux forces de cisaillement. En effet dans un canal carré le cisaillement est plus faible aux parois (Thomen et al., 2017). La seconde pourrait être due au gradient d'oxygène lié à la perméabilité du PDMS et à la consommation de l'oxygène par les

cellules favorise le développement de *Bacillus thuringiensis* dans les zones les mieux oxygénées. Des expériences complémentaires permettant de mesurer le taux local d'O<sub>2</sub> en biofilm et la vitesse de croissance de Bt à différents taux d'oxygène dans le biofilm sont en cours et permettront de valider ces hypothèses.



**Fig. III.2.17 :** Images réalisées en acquisition de la fluorescence verte d'un biofilm 4S à différents temps de vie (dt=5h), avec un seuillage automatique. Les barres blanches servent d'échelles et représentent 55µm.

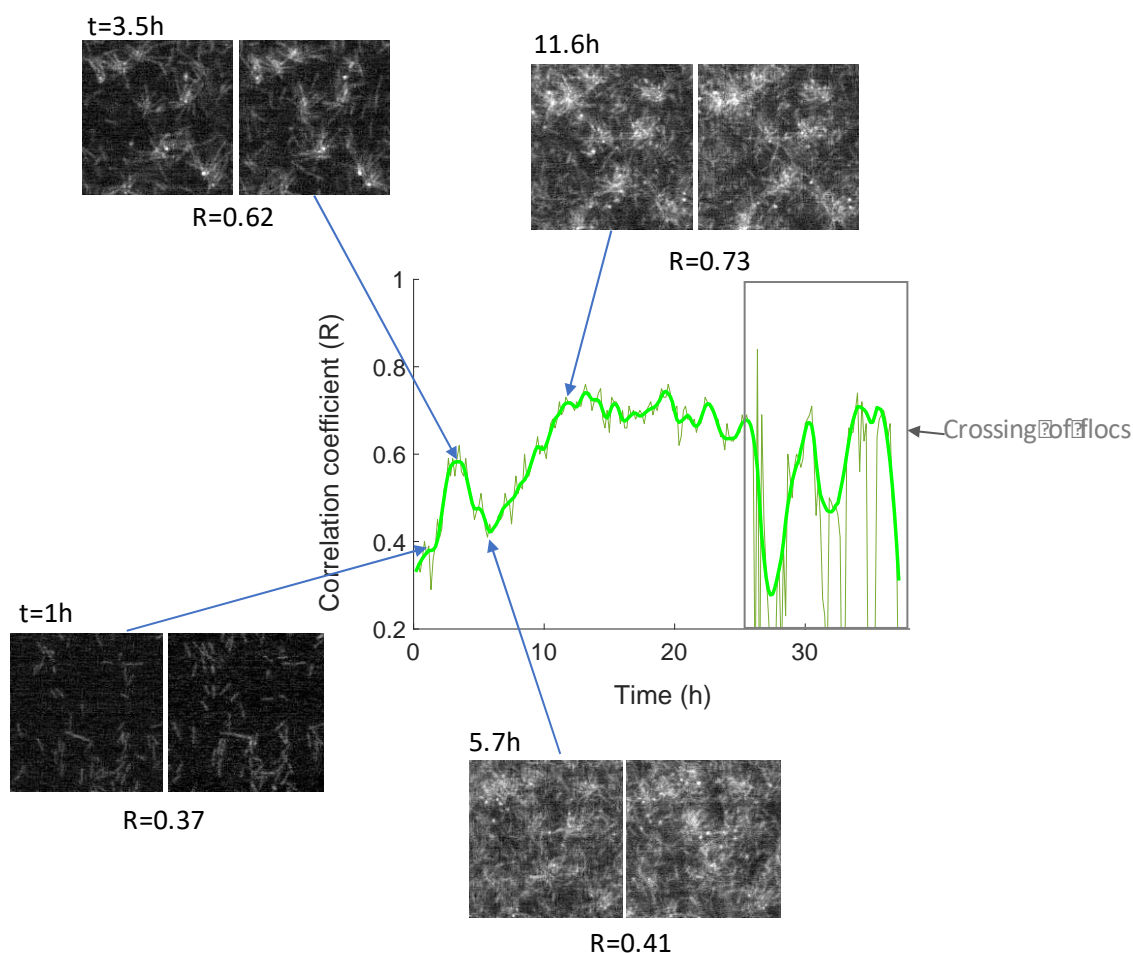
L'observation des images de vidéo-microscopie montre bien que la dynamique des cellules de *Bacillus thuringiensis* varie au cours du développement du biofilm 4S, ce qui confirme les cinétiques des intensités de fluorescence de FAST:HBR et la courbe de dérivée de la vitesse de croissance apparente.



### c) Dynamique spatiale

De façon à caractériser la dynamique de *Bacillus thuringiensis* au sein du biofilm 4S, nous avons analysé la corrélation des images successives sur les films de fluorescence FAST après alignement des images. Nous avons ainsi obtenu le tracé du coefficient de corrélation des paires d'image (n;n+1) au cours du temps (Fig. III.2.18).

On constate tout d'abord que la valeur de ce coefficient reste globalement inférieure à 0.8, ce qui indique que *Bacillus thuringiensis* n'est en moyenne pas très fortement ancré dans le biofilm. On observe ensuite des variations importantes de la corrélation tout au long du développement du biofilm, ce que nous avons essayé de comprendre en examinant plus en détail les paires d'images associées à différentes valeurs du coefficient. Il apparaît alors que les valeurs



**Fig. III.2.18 :** Courbe du coefficient de corrélation de *Bacillus thuringiensis*, basé sur la fluorescence, en fonction du temps dans un biofilm 4S. Différents temps liés à la dynamique de cette courbe sont illustrés avec des images de fluorescence, et la valeur du coefficient de corrélation de ces temps.

de corrélation faibles correspondent à une contribution proportionnellement plus importante des cellules uniques alors que la formation des asters autour des *Kocuria salsicia* est un facteur de stabilisation. Ainsi, sur les 2 premières heures, on observe principalement des cellules isolées dont le temps de résidence en un point donné du canal est, pour la majorité des cellules, inférieur à l'intervalle qui sépare les 2 images d'une paire ( $\Delta t=10$  min dans l'exemple présenté Fig. III.3.18). Lorsque les asters commencent à se former, la corrélation augmente — ce qui traduit une plus grande localisation des cellules à travers l'interaction physique avec les *Kocuria salsicia* qui, elles, ont un ancrage fort à la surface. Lorsque de nouveau le développement du biofilm apporte une proportion plus importante de cellules isolées, la corrélation diminue de nouveau pour retrouver de façon plus stable un niveau plus élevé après quelques heures. Le maximum de la corrélation est atteint après environ 11 à 12 heures de croissance. Lorsque le biofilm entre dans la phase stationnaire, le passage de floccs perturbe la corrélation. Nous reviendrons plus avant sur ces oscillations dynamiques à la lumière des cinétiques de croissance.

En résumé, nous avons trouvé que le développement de *Bacillus thuringiensis* dans le biofilm 4S se caractérise par 4 points :

- La succession de 2 phases de croissance exponentielle séparées par une phase de régression que nous pensons principalement due à du détachement. La première phase de croissance présente une constante de vitesse similaire à celle mesurée en planctonique dans le même milieu à la même température. La deuxième phase montre une constante apparente beaucoup plus faible (environ 7 fois plus faible).

- Une capacité d'adhésion à la surface du canal assez faible : les cellules isolées et en division montrent un temps de résidence dans le biofilm inférieur à 10 min.

- Une interaction physique *Bacillus thuringiensis* – *Kocuria salsicia* qui permet d'ancrer une partie des *Bacillus thuringiensis* à la surface du canal.

- Une stratégie d'ancrage aux bords du canal qui s'amplifie avec le temps de développement du biofilm.

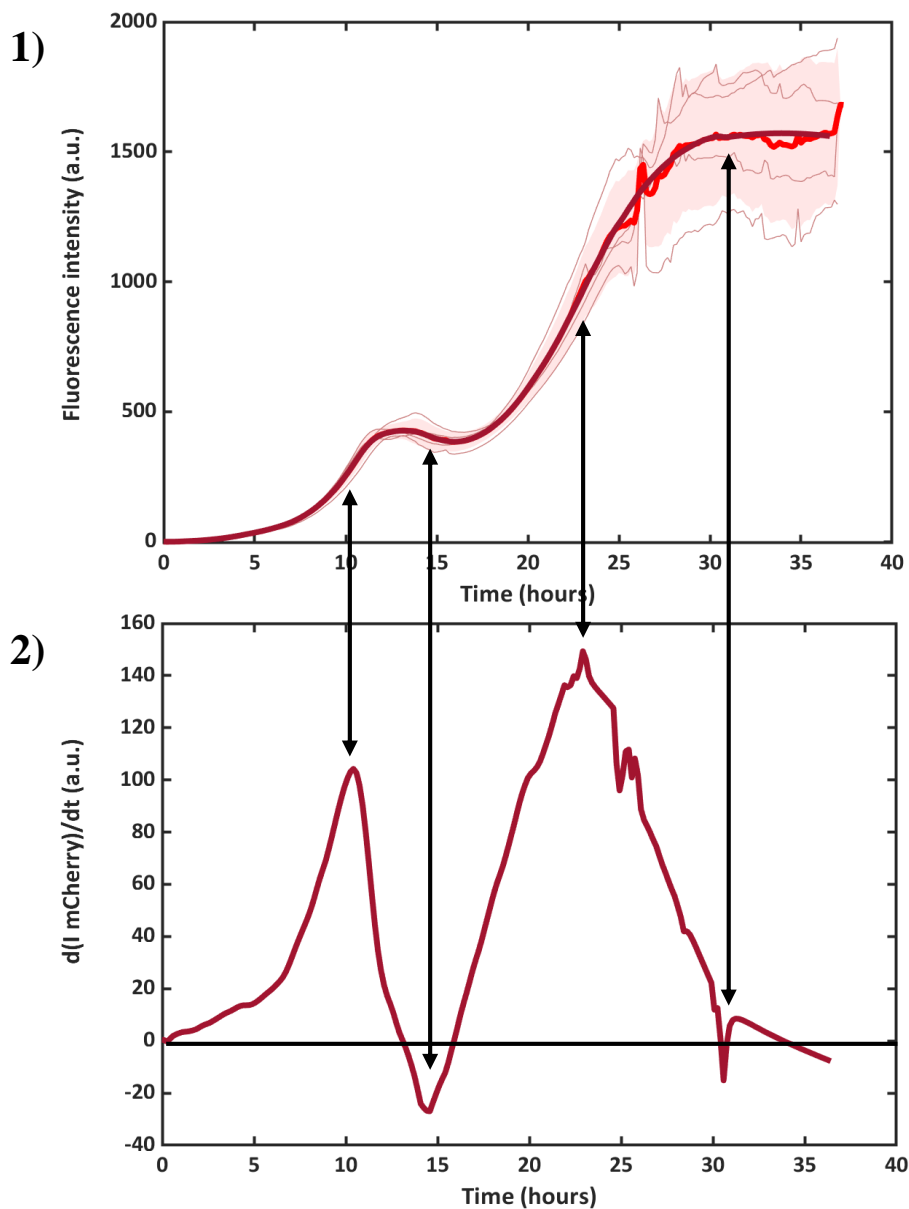
## ● ***Pseudomonas fluorescens***

### a) Cinétique de croissance

A l'aide de la fluorescence de *Pseudomonas fluorescens* liée à la mCherry, nous pouvons suivre la cinétique de croissance de cette souche dans le biofilm 4S, de la même manière que pour *Bacillus thuringiensis* avec la fluorescence de FAST (Fig. III.2.19-1). Différentes phases de croissance qui se distinguent sur la courbe dérivée (Fig. III.2.19-2) apparaissent de façon similaire



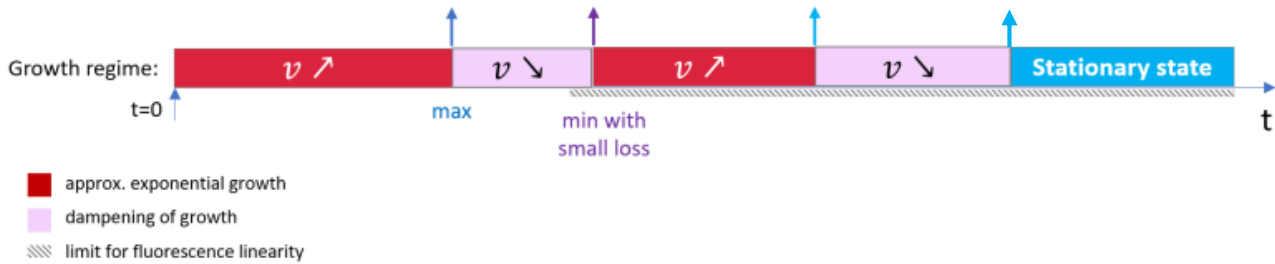
à celles détectées avec *Bacillus thuringiensis* mais avec des temps caractéristiques différents (Fig. III.2.20).



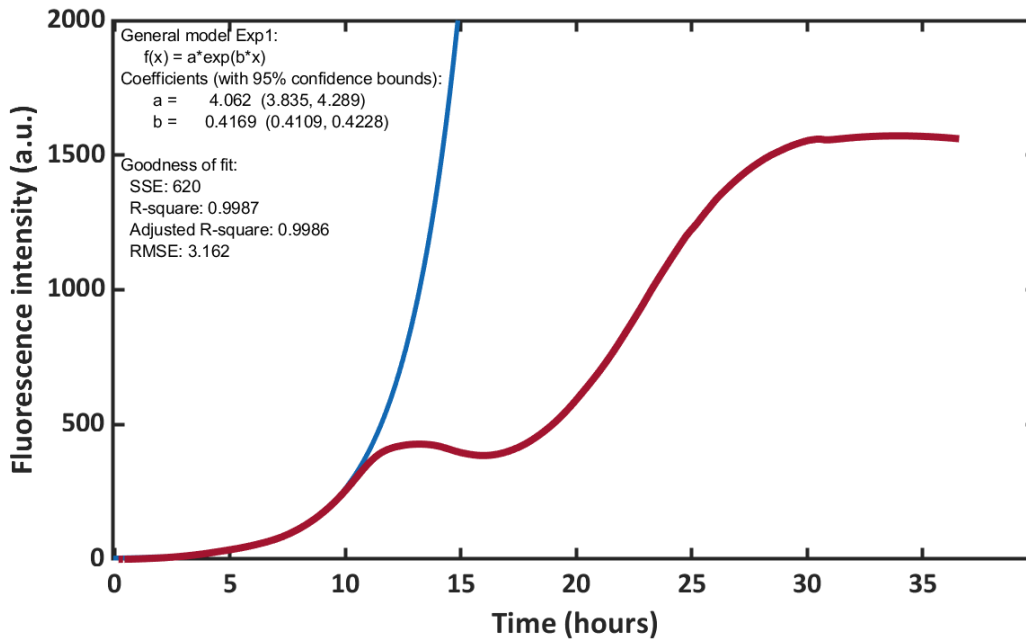
**Fig. III.2.19 :** 1) Courbes de l'intensité de fluorescence de *Pseudomonas fluorescens* dans le biofilm 4S au cours du temps. En rouge, les courbes expérimentales acquises dans les mêmes conditions de différents biofilms ; en rouge gras, la courbe moyenne de ces premières avec son écart-type représenté par une zone rouge pâle ; en rouge foncé, la courbe moyenne lissée. 2) Courbes dérivées de la moyenne lissée des cinétiques (rouge foncé) de l'intensité de fluorescence *Pseudomonas fluorescens* dans le biofilm 4S. Les flèches noires explicitent les moments clés de la dynamique de croissance de *Pseudomonas fluorescens* et les lient à sa cinétique de l'intensité de fluorescence. Ces moments représentent dans l'ordre chronologique le premier maximum de vitesse de croissance de *Bacillus thuringiensis*, le minimum de vitesse de croissance (ici, négative, indiquant une décroissance), le second maximum de vitesse de croissance et l'atteinte d'une phase d'équilibre stationnaire.

La première phase d'expansion se déroule de 0 à 10h30. On peut l'assimiler à une croissance exponentielle dont la constante est égale à  $r_1 = 0.42 \text{ h}^{-1}$  (Fig. III.2.21), soit un temps de doublement de l'ordre de 1h40, ce qui est faible comparé à ce que l'on trouve en culture planctonique d'une valeur de 47min (Cf. annexe D).

characteristic time (h)	10,5	14,5	23	31
Pf index	313	393	974	1555



**Fig. III.3.20 :** Figure récapitulative des phases de croissance de *Pseudomonas fluorescens* en biofilm 4S.



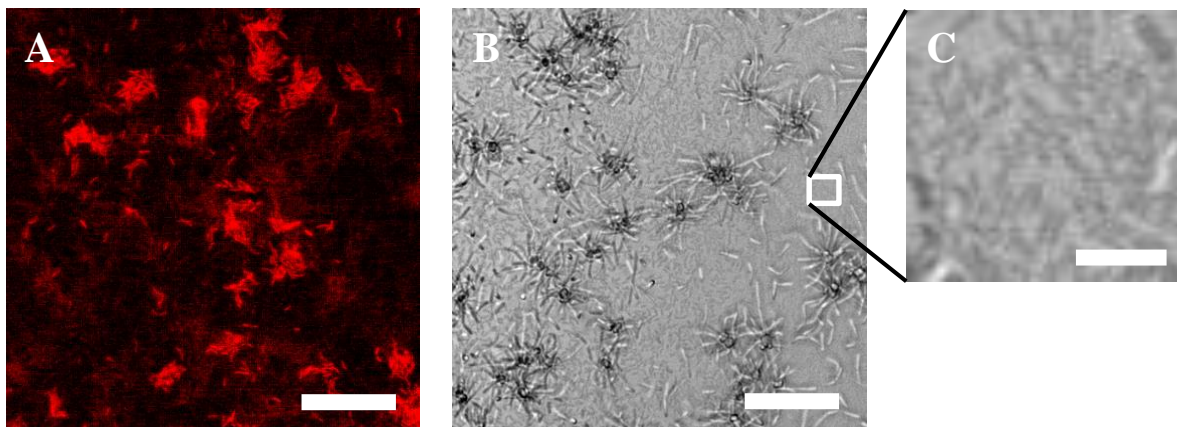
**Fig. III.2.21 :** Courbe de cinétique de l'intensité de fluorescence moyenne lissée de *Pseudomonas fluorescens* en biofilm 4S (rouge foncé) et le fit (en bleu) de la première phase de croissance (où le signal de fluorescence est quantitatif).

A partir de  $t_1=10h30$  jusqu'à  $t_2=14h30$ , mCherry rapporte un ralentissement sensible de la croissance de la population de *Pseudomonas fluorescens* allant jusqu'à la régression (valeurs négatives de la dérivée, Fig. III.2.19-2). L'interprétation de ces courbes est difficile car après quelques heures, le rapporteur fluorescent ne répond plus de façon linéaire, ce qui pourrait conduire à surévaluer le ralentissement de la croissance. Néanmoins, la diminution de l'intensité propre de mCherry ne peut être responsable de la diminution nette du signal. L'évolution de la fluorescence témoigne donc bien d'une perte de biomasse de *Pseudomonas fluorescens* ce que l'on peut confirmer visuellement sur les acquisitions de vidéo-microscopie où l'on observe un détachement partiel des cellules résidant sur la surface.

A 14h30, la variation du signal fluorescent s'inverse pour croître à nouveau. Cette croissance du signal s'accélère jusque vers 23h. C'est également le moment où la fréquence et l'amplitude des fluctuations du signal liées au passage de floccs, très logiquement de façon synchrone avec ce que l'on a observé sur les autres signaux (TL et FAST), augmentent. A partir de ce moment, la croissance ralentit pour atteindre un état stationnaire vers 31h.

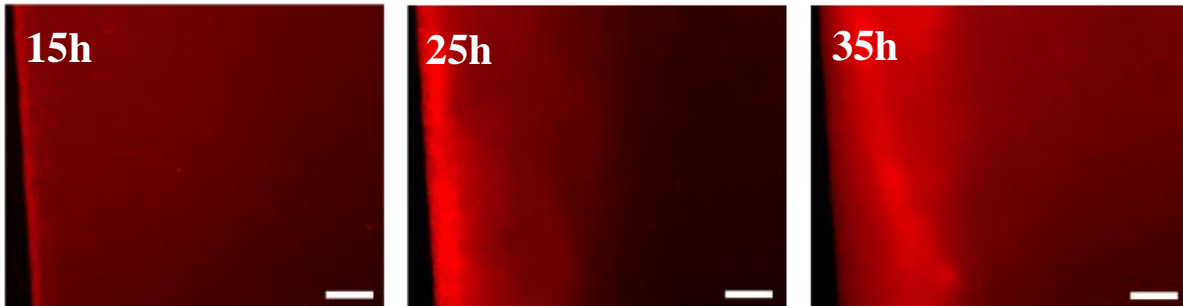
## b) Distribution spatiale

Nous nous sommes ensuite intéressés à la distribution globale de *Pseudomonas fluorescens* dans le biofilm 4S sur le long terme. Durant les 10 premières heures, les *Pseudomonas fluorescens* se développent en micro-colonies compactes à la surface du canal (Fig III.2.22), puis à  $t=11h$ , nous observons un détachement et un écoulement des micro-colonies ne laissant à la surface qu'un tapis de cellules éparses dont la faible fluorescence ne les distingue quasiment pas du fond mais dont on peut deviner la présence en TL. (Fig. III.2.23).



**Fig. III.2.22 :** A) Image des micro-colonies de *Pseudomonas fluorescens* réalisées en acquisition de la fluorescence rouge d'un biofilm 4S. B-C) Images du biofilm 4S en lumière transmise : B) d'un champ équivalent en taille A), et C) un zoom permettant de distinguer les *Pseudomonas fluorescens* en transmission. Les barres blanches servent d'échelles et représentent  $20\mu\text{m}$  pour A, B), et  $3\mu\text{m}$  pour C).

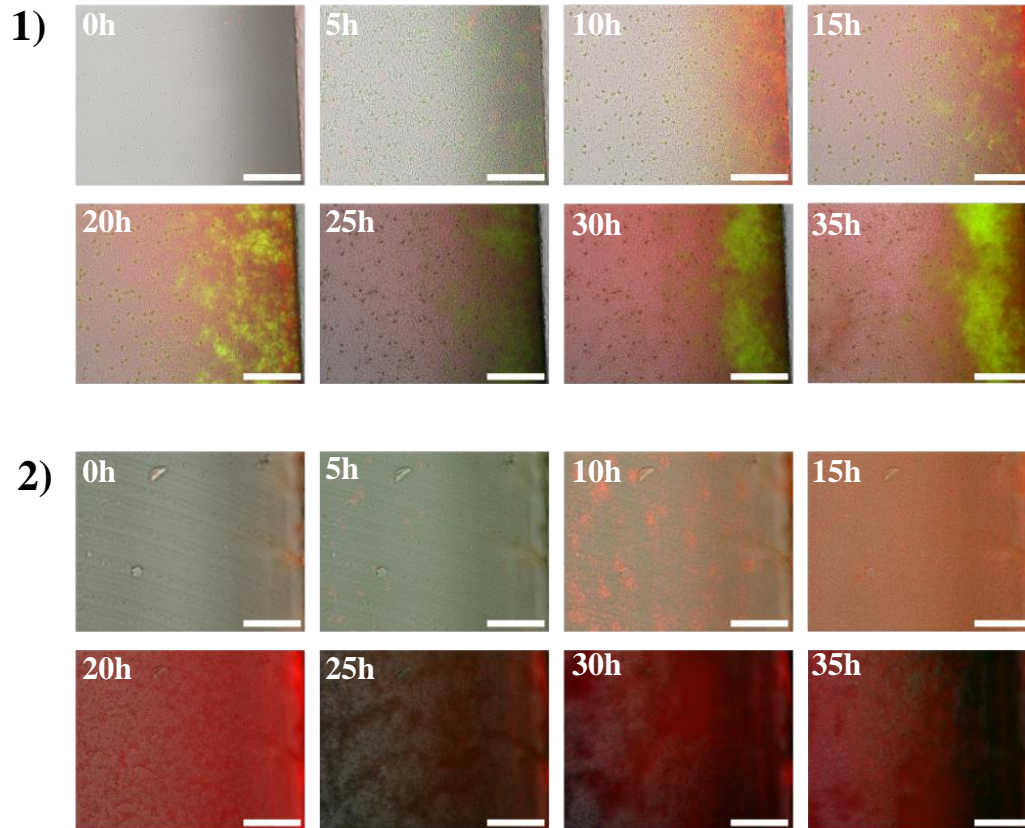
A partir de  $t_1$ , la fluorescence devient très diffuse dans le canal et sa valeur augmente au cours du temps, croissant plus vite aux bords du canal (Fig. III.2.23). On formule, pour expliquer cette concentration de la biomasse de *Pseudomonas fluorescens* aux bords du canal, les mêmes hypothèses que pour la concentration de *Bacillus thuringiensis* : faible exposition au cisaillement hydrodynamique et/ou meilleure disponibilité de l' $O_2$ .



**Fig. III.2.23 :** Images réalisées en acquisition de la fluorescence rouge d'un biofilm 4S à différents temps de vie (indiqués en haut à gauche de chaque image), avec un seuillage automatique. Les barres blanches servent d'échelles et représentent 55 $\mu$ m.

Nous avons ensuite cherché à comprendre l'origine de la fluorescence diffuse. Pour cela, nous avons exploré l'ensemble du canal, et il s'est avéré que *Pseudomonas fluorescens* se développait également sur la surface supérieure du canal ('plafond') et qu'elle était la seule souche à y parvenir (Fig. III.2.24-1 & 2). La raison de ce développement dans cette niche spécifique à *Pseudomonas fluorescens* pourrait être due à sa motilité lui permettant de coloniser cette surface. De plus, cette surface est en PDMS, or le PDMS est perméable à l' $O_2$  favorisant la croissance de cette souche qui est aérobie exclusive

Il est ainsi apparu que *Pseudomonas fluorescens* dans sa deuxième phase de croissance s'était préférentiellement développé sur la surface interne supérieure du canal.

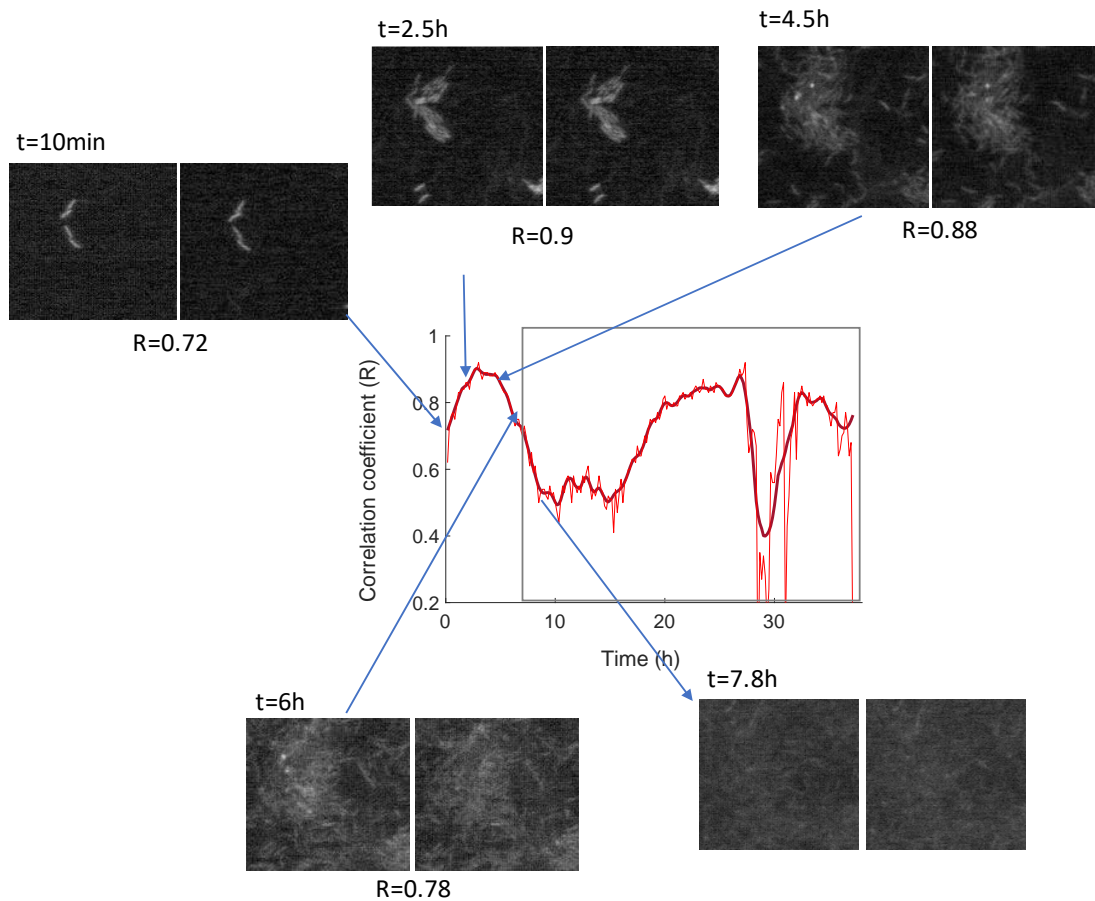


**Fig. III.2.24 :** Comparaison du développement de *Pseudomonas fluorescens* à la lamelle et au plafond. 1-2) Images en superposition de la transmission et des fluorescences de la mCherry et du complexe FAST:HBR au cours du temps (toutes les 5h) d'une biofilm 4S 1) à la surface basse du canal (en verre) et 2) à la surface haute du même canal en (PDMS). Les images de 0 à 20h sont sous les mêmes conditions de seuillage, et de 25 à 35h le seuillage est modifié. Les barres blanches servent d'échelles et représentent 55µm.

### c) Dynamique spatiale

De la même façon que pour *Bacillus thuringiensis*, nous avons mené l'analyse de corrélation sur le signal mCherry, rapporteur de *Pseudomonas fluorescens* (Fig. III.2.25). Dans ce cas, le signal de corrélation ne peut être suivi que sur une très faible fenêtre temporelle. Sur la première heure, le nombre de cellules de *Pseudomonas fluorescens* est relativement faible. De plus, cette cellule est petite et la contribution du signal des mCherry des bactéries à l'ensemble de l'image est faible. Ceci a tendance à faire baisser artificiellement le niveau de corrélation des paires d'images car les fluctuations du fond prédominent et sont peu corrélées. Néanmoins, sur les heures suivantes, la division des *Pseudomonas fluorescens* permet de dépasser ce problème et le coefficient de corrélation s'établit à des valeurs élevées autour de 0.9 indiquant une très

forte localisation, ou ancrage des cellules à la surface, à l'opposé de la forte instabilité de *Bacillus thuringiensis*. Cependant très vite — aux alentours de 5h — la baisse de la fluorescence par cellule rend difficile l'interprétation des variations ultérieures du coefficient de corrélation.



**Fig. III.2.25 :** Courbe du coefficient de corrélation de *Pseudomonas fluorescens*, basée sur la fluorescence, en fonction du temps dans un biofilm 4S. Différents temps liés à la dynamique de cette courbe sont illustrés avec des images de fluorescence, et la valeur du coefficient de corrélation de ces temps. La fenêtre explicite la zone dans laquelle l'interprétation de ce graphique ne rend plus directement compte de la corrélation d'image.

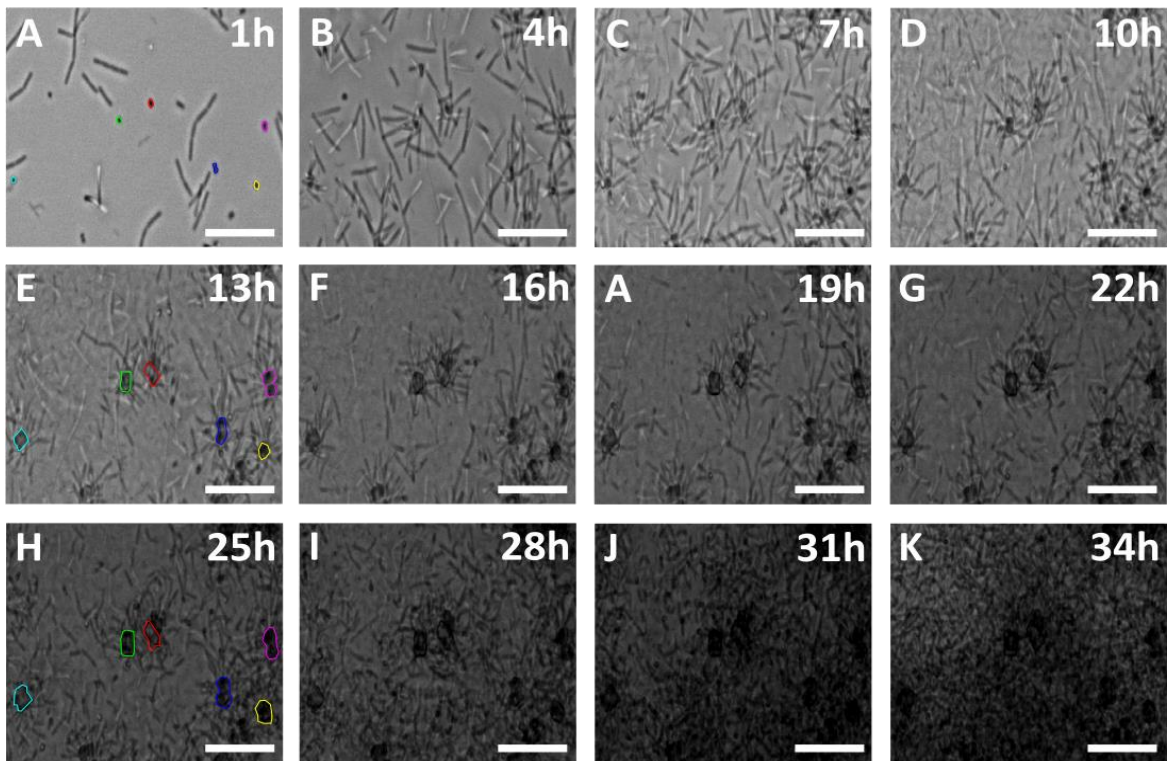


En résumé, pour *Pseudomonas fluorescens* dans le biofilm 4S, nous avons trouvé :

- La succession de 2 phases de croissance séparées par une phase de régression.
- Une installation initiale avec une capacité d'adhésion à la surface forte suivie par un détachement concerté qui s'étend de t1 à t2.
- Une colonisation préférentielle de la face supérieure interne du canal dans la deuxième phase d'expansion de la population.
- Une concentration aux bords de la lamelle (surface interne inférieure).
- La présence d'une phase stationnaire bien établie à partir de 30h.

### • *Kocuria salsicia*

En étudiant les *Kocuria salsicia* sur les images de transmission, nous avons pu les repérer grâce à leur forme sphérique très distincte des autres bactéries de la communauté (Fig. III.2.26).



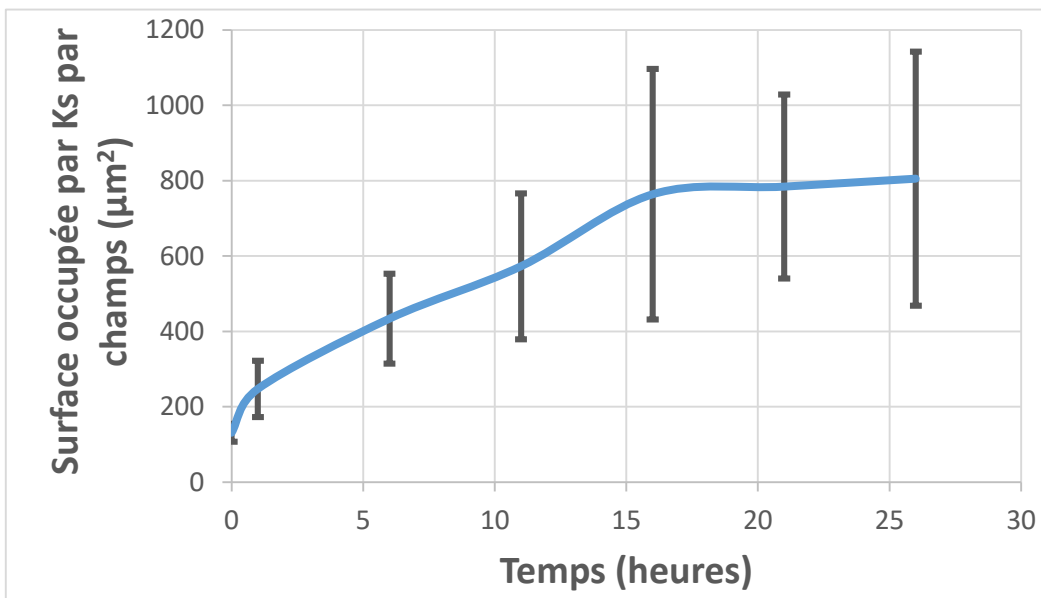
**Fig. III.2.26 : Formation d'aster Bt-Ks.** Images de la formation d'aster Bt-Ks au cours du temps de A à K, avec un délai de 3h entre chaque image. Sur les images A, E et H, sont délimités les *Kocuria salsicia*, afin de calculer leur surface passant d'une moyenne de  $1.8\mu\text{m}^2$  à 1h, à  $11.51\mu\text{m}^2$  à 13h, et enfin de  $17.45\mu\text{m}^2$  à 25h. Les barres blanches servent d'échelle et représentent  $15\mu\text{m}$ .

Une détection des objets sur ce critère morphologique nous permet de les localiser et de les dénombrer au cours du temps.

Nous avons observé sur les films de vidéo-microscopie que ces cellules conservaient, quasiment toutes, leur localisation initiale sur la surface au long du développement du biofilm et qu'elles se développaient suivant un schéma particulier. En effet, elles restent fortement adhérentes les unes aux autres après des divisions successives. D'autre part, nous avons déterminé que *Kocuria salsicia* servait d'ancrage à *Bacillus thuringiensis*, l'aidant à se maintenir à la surface du canal en formant des structures que nous appelons des « asters » (Fig. III.2.26).

La souche de *Kocuria salsicia* n'étant pas fluorescente, nous avons utilisé une stratégie alternative pour suivre sa croissance dans la communauté 4S. Pour différencier ces cellules des autres espèces, nous avons tiré parti de leur plus fort contraste et utilisé le logiciel ImageJ, pour binariser et isoler les *Kocuria salsicia* sur toutes les images. L'outil « Analyse particules » nous a ensuite permis d'extraire la surface occupées par chaque cellule ou groupe de cellules, en effet les divisions de *Kocuria salsicia* forment des agrégats multicellulaires fixes (Fig. III.2.26 A,E,H). Ainsi, nous évaluons indirectement la croissance de la population. Il apparaît que la surface moyenne d'un agrégat *Kocuria salsicia* augmente de  $1.8\mu\text{m}^2$  à  $17.45\mu\text{m}^2$  entre de 0 à 16h avant d'atteindre un plateau strict où visiblement plus aucune division n'a lieu (Fig. III.2.27).

On conclut que cette espèce se développe pendant les 16 premières heures avant un état 'arrêté' où les *Kocuria salsicia* sont spatialement fixés, une sorte d'état persistant que nous assimilons également à un état stationnaire.



**Fig. III.2.27 :** Dénombrement moyen de *Kocuria salsicia* au cours du temps en biofilm 4S basé sur l'analyse d'occupation de surface. La moyenne est obtenue via l'analyse de 7 expériences différentes, et les barres d'erreur représentent l'écart-type sur 7 expériences.



En résumé, on retiendra donc au sujet de *Kocuria salsicia* que :

- son expansion dans le biofilm 4S est limitée
- il sert d'ancrage physique partiel à la bactérie *Bacillus thuringiensis*

- ***Rhodocyclus sp.***

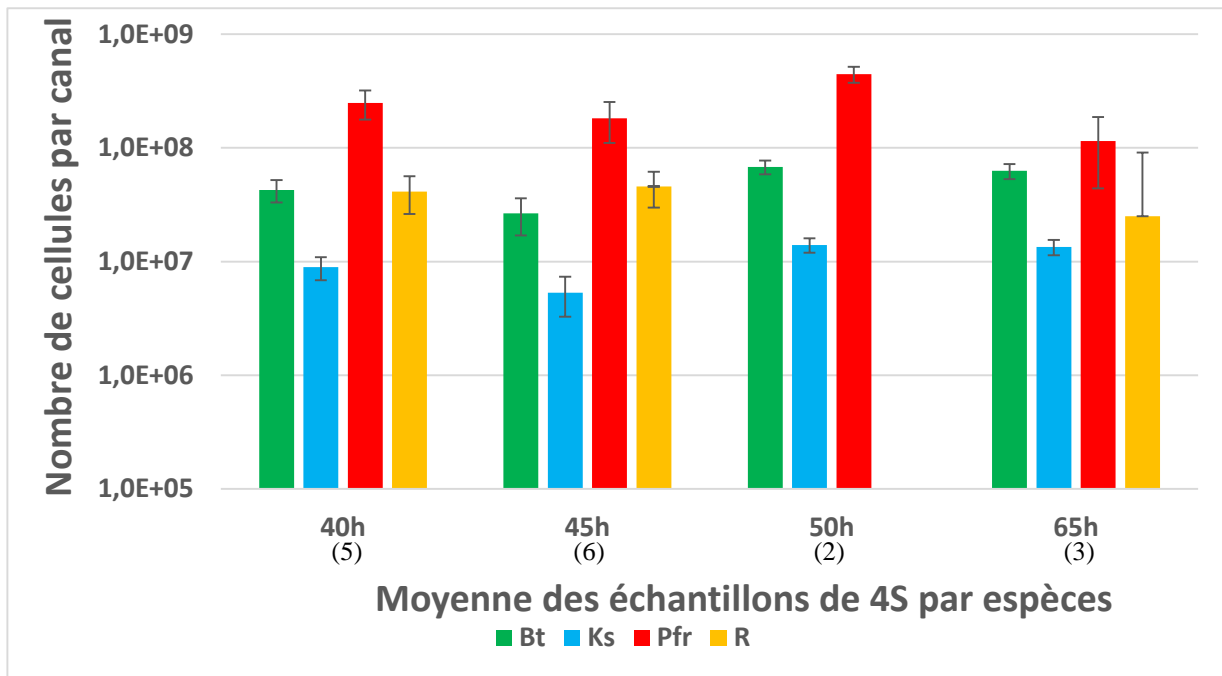
Le développement de *Rhodocyclus sp.* en communauté 4S adhérente est difficile à suivre. Cette souche est la plus petite de notre communauté, ce qui rend très faible sa contribution à la création de biomasse globale du biofilm 4S. De plus, c'est une bactérie très motile ce qui complique encore son suivi en microscopie. Le fait que ce soit une souche sauvage, et peu connue des microbiologistes, n'a pas permis de mener une transformation génétique pour lui faire exprimer une protéine fluorescente. Cependant, nous savons avec certitude que la souche est présente dans le biofilm de l'inoculum à la fin de l'expérience, comme nous allons voir en étudiant le dénombrement des souches à l'état stationnaire.

## III.2.D.2 Composition de l'état stationnaire

Afin de déterminer la composition du biofilm 4S dans son état stationnaire, nous avons entrepris d'extraire le biofilm du canal. Ces mesures ont été effectuées à différents temps de la phase stationnaire. L'extraction est réalisée dans du 0.9% NaCl/H<sub>2</sub>O pour un volume total de 1ml, puis analysée en cytométrie en flux (cf. II.5 et Annexe C). Cette technique d'analyse nous a permis de discriminer les espèces fluorescentes de la communauté, *Bacillus thuringiensis* et *Pseudomonas fluorescens*, par leur fluorescence. Les deux autres espèces, *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.*, sont estimées sur la base de leur taille différente et en utilisant un marqueur fluorescent exogène (cf. II.5.).

Ainsi, avec les résultats obtenus (Fig. III.2.28), nous avons pu confirmer la bonne reproductibilité de nos expériences (faibles écart-types entre les expériences). Il est intéressant d'observer que la composition du biofilm 4S n'évolue pas sensiblement de 40h à 65h.

Nous voyons également que *Pseudomonas fluorescens* domine numériquement la communauté installée dans le canal.



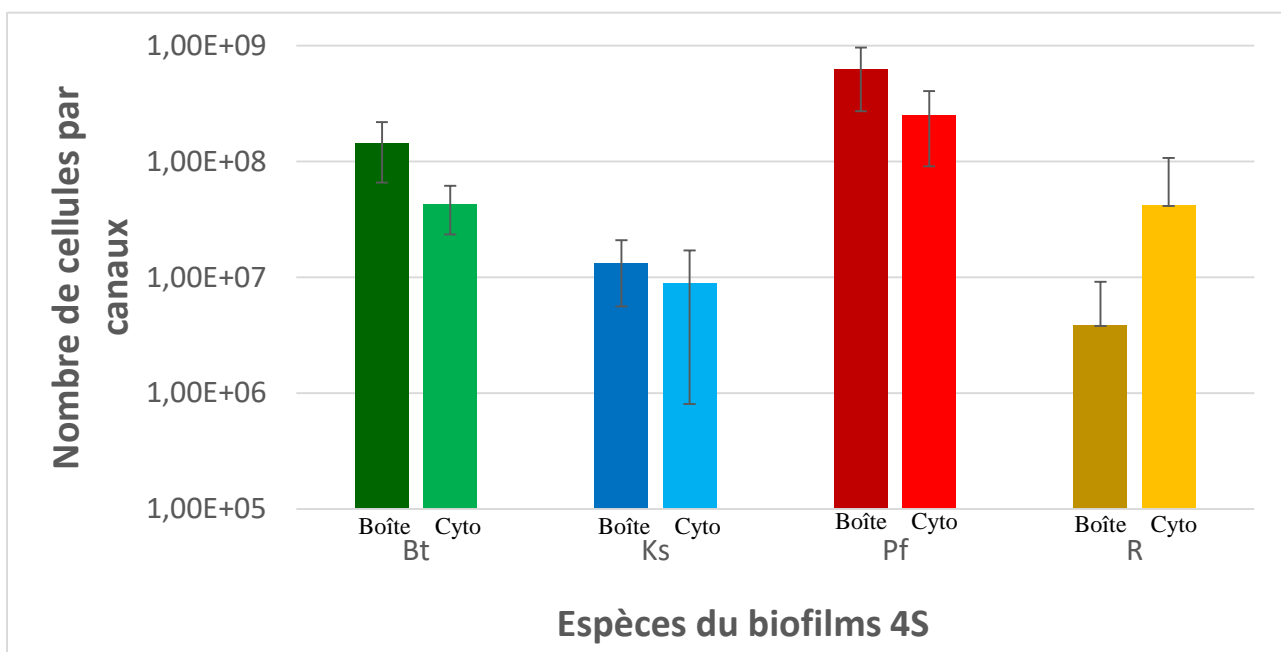
**Fig. III.2.28 : Dénombrement du nombre de cellules par espèces à différents temps de maturité du biofilm 4S.** En Vert, *Bacillus thuringiensis*. En bleu, *Kocuria salsicia*. En rouge, *Pseudomonas fluorescens*. En orange, *Rhodocyclus sp.*. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type du compte de chaque espèce pour chaque temps d'extraction. Entre parenthèses, en ordonnée, le nombre de biofilms extraits par condition.

Par ailleurs, nous mesurons dans les extractions, à partir de 40h de croissance du biofilm 4S, une quantité moyenne de *Rhodocyclus sp.* de  $(4.8 \pm 3.7) \times 10^7$  cellules par canal alors que la quantité de l'inoculum est de  $3 \times 10^4$  cellules dans le canal. Ce résultat suggère que cette bactérie prospère dans le biofilm. C'est la seule information dont nous disposons concernant *Rhodocyclus sp.*, en effet il ne nous a pas été possible de le suivre en vidéo-microscopie. Nous devons aussi reconnaître que son identification en cytométrie en flux est aux limites de la technique.

Les résultats de cytométrie en flux donnent une évaluation de *Kocuria salsicia* dont la croissance est bloquée à un stade relativement précoce en biofilm, d'environ  $(1.1 \pm 0.4) \times 10^7$  cellules/canal, ce qui, en comparant à la quantité ensemencée de  $3 \times 10^4$ /canal indique un facteur de multiplication d'environ 300, soit approximativement 8 divisions.

Le produit de l'extraction des biofilms a également été compté sur boîte par nos collaborateurs de l'institut Micalis (Fig. III.2.29). Un certain volume des biofilms extraits dans du sérum physiologique leur était réservé, conservé à 4°C, et étalé par leur soin dans la journée suivant l'extraction, à différentes dilutions (1/1000 à 1/100000). Les dénombrements sur boîte se sont montrés toujours un peu plus hauts qu'en cytométrie en flux pour *Bacillus thuringiensis*,

*Pseudomonas fluorescens* et *Kocuria salsicia*. Au contraire, pour *Rhodocyclus sp.*, le comptage est toujours plus important en cytométrie que sur boîte. Pour cette dernière espèce, la différence de dénombrement est probablement due à la difficulté à cultiver cette espèce sur boîte. Pour les trois autres espèces, les différences de dénombrement peuvent être liées à divers détails techniques comme la présence de cellules non-fluorescentes qui seraient donc négligées en cytométrie ou peut-être une question de différence de délai entre l'extraction et la mesure. En effet, pour la cytométrie, les échantillons sont mesurés dans l'heure suivant l'extraction. Or, pour l'étalement sur boîte, il a pu y avoir quelques heures entre l'extraction et l'étalement bien que les cellules soient suspendues sans source de carbone et conservées à basse température. Quoiqu'il en soit, les ordres de grandeurs sont respectés ainsi que l'ordre d'abondance.



**Fig. III.2.29 :** Comparaison des comptages effectués sur boîte ou en cytométrie des extractions de canaux de biofilms 4S à 40h. En Vert, *Bacillus thuringiensis*. En bleu, *Kocuria salsicia*. En rouge, *Pseudomonas fluorescens*. En orange, *Rhodocyclus sp.*. Les couleurs foncées correspondent aux comptages sur boîte, et celles claires aux comptages en cytométrie. Les barres d'erreurs représentent l'écart type du dénombrement de chaque espèce.

Un point important à noter est la formation sur boîte de colonies de *Kocuria salsicia* suffisamment nombreuses indiquant très clairement que les *Kocuria salsicia* extraits du biofilm sont aptes à se multiplier alors que leur croissance apparaît comme inhibée en biofilm. Les cellules seraient donc mises en dormance dans le biofilm 4S.

Nous retiendrons donc que l'ordre d'abondance est le suivant :

Pf > Bt  $\approx$  Rhodo > Ks avec environ 5 fois plus de *Pseudomonas fluorescens* que de *Bacillus thuringiensis* et environ 4 fois moins de *Kocuria salsicia* que de *Bacillus thuringiensis*.

### III.2.D.3 Phases individuelles versus phases collectives

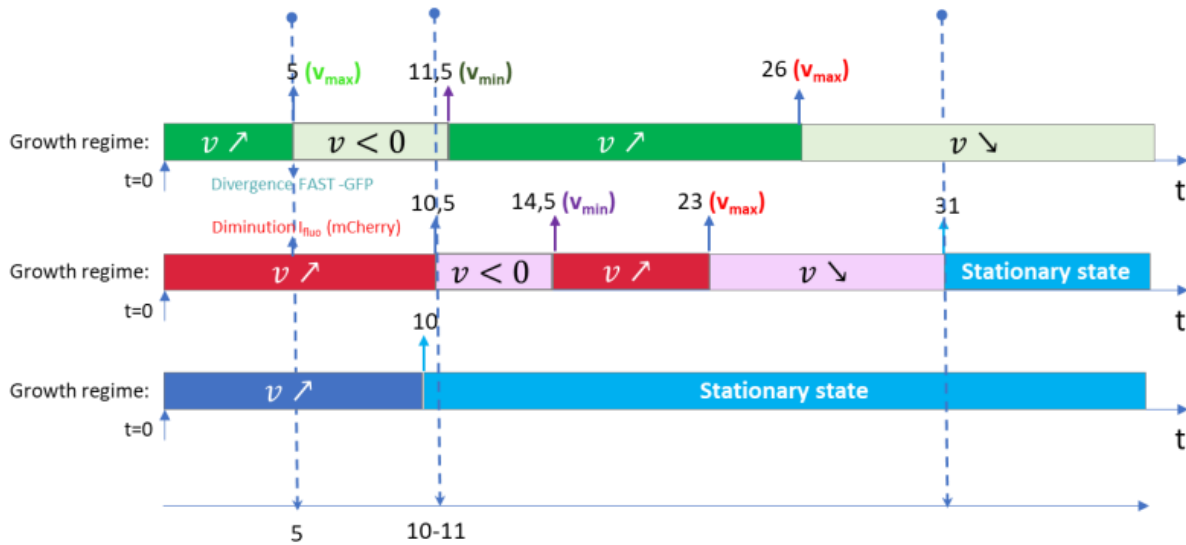
Après avoir exploré le comportement de chaque espèce dans la communauté 4S, nous allons maintenant examiner comment les comportements individuels sous-tendent le comportement d'ensemble et s'il existe certaines synchronisations des espèces au sein du biofilm. La Fig. III.2.30 rassemble les chronologies respectives de *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens* et *Kocuria salsicia* — celle de *Rhodocyclus sp.* n'ayant pu être établie.

Nous pouvons d'abord remarquer que le temps  $t=5h$  marque l'apparition i) de l'amortissement de l'expansion de *Bacillus thuringiensis*, ii) de la divergence des signaux FAST-GFP et iii) de la diminution de la fluorescence propre de mCherry sur *Pseudomonas fluorescens*. Avec ce que nous avons appris au chapitre III.1 sur la fluorescence des rapporteurs protéiques nous pouvons conclure qu'à partir de 5h, le biofilm formé est suffisamment dense pour induire un déficit sensible d'O<sub>2</sub>. Nous faisons alors l'hypothèse que cette réduction du niveau d'O<sub>2</sub> est également responsable de l'amortissement de la croissance de *Bacillus thuringiensis* et ultérieurement de sa décroissance. On peut également noter que l'amortissement de la biomasse globale survient à  $t=5h$ , indiquant que ce signal est initialement dominé par le développement de *Bacillus thuringiensis*.

Un autre temps remarquable est plus exactement une zone temporelle qui s'étend de 10h à 11h où l'on voit i) la reprise de croissance de *Bacillus thuringiensis* (on sait aussi que cette reprise de croissance n'est pas détectée par la GFP (cf Fig. III.2.15)), ii) l'initiation de la croissance de *Pseudomonas fluorescens* avec un décollement, visiblement bien réglé dans le temps, de *Pseudomonas fluorescens* qui commence à quitter massivement la surface de verre du fond du canal, iii) *Kocuria salsicia* entre en arrêt de croissance.

A  $t=14h30$ , la fluorescence de mCherry indique une nouvelle expansion de *Pseudomonas fluorescens* mais on peut voir sur les images de microscopie qu'il s'agit de son développement sur la surface du haut du canal. On constate aussi que la fluorescence de *Pseudomonas fluorescens* qui s'était quasiment totalement éteinte vers 10h a été 'réactivée', ce qui confirme le changement de localisation de *Pseudomonas fluorescens*. Il est très probable que cette colonisation précise correspond à une forme d'aérotaxie où *Pseudomonas fluorescens* quitte la surface du bas pauvre

en O<sub>2</sub> pour se développer largement sur la surface du haut où la perméabilité du PDMS à l'O<sub>2</sub> fournit un environnement gazeux très différent.



**Fig. III.2.30:** Récapitulatif des phases de croissance de *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens* et de *Kocuria salsicia*.

Les autres souches, qui n'ont pas cette capacité de *Pseudomonas fluorescens* à rompre son attachement initial et à migrer vers un environnement plus favorable, ou se déploient sur les bords du canal (c'est le cas de *Bacillus thuringiensis*) ou entrent dans une forme de dormance (c'est le cas de *Kocuria salsicia*). On ne sait pas ce que fait *Rhodocyclus sp.* qui est une cellule très motile.

Il faut noter que *Pseudomonas fluorescens* colonise également les bords du canal où il est co-localisé avec *Bacillus thuringiensis*.

Enfin, un point important est l'existence de la phase stationnaire. Elle apparaît dès 10h pour *Kocuria salsicia* mais c'est en fait une inhibition de croissance et plus tardivement pour *Pseudomonas fluorescens* où elle résulte de la combinaison équilibrée du taux de croissance et du taux de détachement. On notera que la chronologie de la biomasse globale montre également cette phase stationnaire en bon accord avec l'idée d'une prédominance des *Pseudomonas fluorescens* à ce stade.

## III.2.E Conclusion

En conclusion, nous proposons ici un scénario de formation d'un biofilm 4-espèces sous flux hydrodynamique où toutes les souches introduites initialement se maintiennent et se développent à des degrés divers. Nous faisons l'hypothèse que l'organisation spatio-temporelle de la communauté est gouvernée par la déplétion en  $O_2$  induite par la multiplication des bactéries. Dans ces conditions, la bactérie *Pseudomonas fluorescens* est la plus performante grâce à ces capacités à occuper une niche alternative. L'une de ces bactéries, *Kocuria salsicia*, entre en dormance, soit parce qu'elle ne dispose plus de suffisamment d' $O_2$ , soit parce qu'un composé produit par ses voisines l'inhibe.



## III.3. Les différents mélanges de biofilm : analyse combinatoire

Nous avons, dans le chapitre précédent, mis en évidence la formation d'un biofilm stable en flux après co-inoculation de 4-espèces assemblées à partir d'un biofilm naturel. Nous avons montré la formation d'un état stationnaire caractéristique et nous posons maintenant la question des interactions inter-espèces qui, potentiellement, supportent ce biofilm.

Pour ce faire, nous étudierons les cinétiques de développement des différentes combinaisons de biofilm que l'on peut former, hormis la combinaison 4S complète : 4 mono-espèce (1S), 6 bi-espèces (2S), 4 tri-espèces (3S).

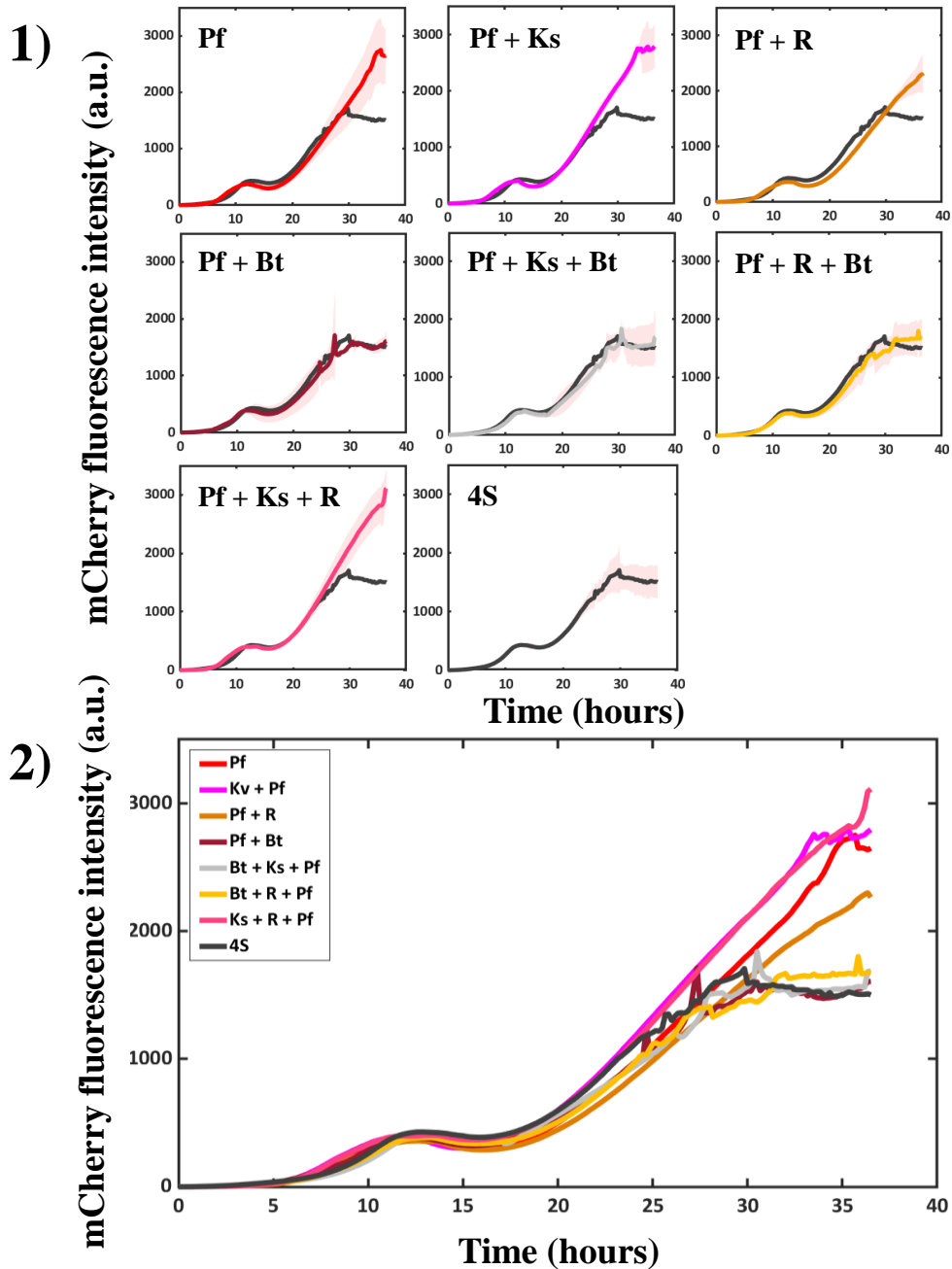
Durant ces expériences de combinatoire, nous avons suivi le même protocole expérimental que pour les expériences de biofilm 4S précédemment décrites (Cf. II.1 et III.2). Les expériences ici présentées ont été maintenues durant 38h, et l'acquisition en vidéo-microscopie a été réalisée en lumière transmise, dont on déduit la  $\mu$ OD des biofilms, et en fluorescence verte et rouge respectivement pour suivre les cinétiques des intensités de fluorescence de FAST:HBR (*Bacillus thuringiensis*) et de la mCherry (*Pseudomonas fluorescens*), comme pour les études de biofilm 4S précédentes.

Dans un premier temps, nous nous placerons du point de vue de *Pseudomonas fluorescens*, contributeur majoritaire du biofilm 4S, puis de *Bacillus thuringiensis*, second contributeur, et enfin de *Kocuria salsicia* et de *Rhodocyclus sp.*.

### III.3.A. Les associations de *Pseudomonas fluorescens*

Nous avons étudié la cinétique de l'intensité de fluorescence de la mCherry des 7 combinaisons de biofilm 1S, 2S et 3S dont *Pseudomonas fluorescens* fait partie, puis nous les avons comparées à celles du biofilm 4S (Fig III.3.1). Nous avons remarqué que deux catégories de cinétique peuvent être distinguées.



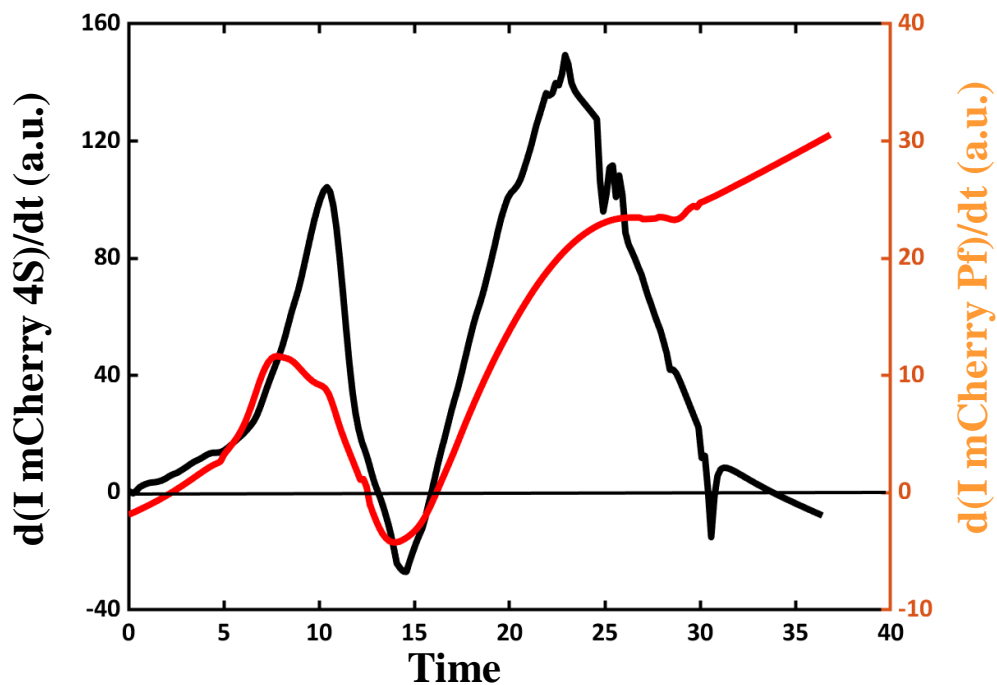


**Fig. III.3.1 :** Courbes de la cinétique de croissance de l'intensité de fluorescence de la mCherry en fonction du temps des différentes combinaisons de mélange de bactérie de la communauté 4S en présence de *Pseudomonas fluorescens*. 1) Les courbes de chaque condition, explicitée dans le coin haut gauche (Pf : *Pseudomonas fluorescens* ; Bt : *Bacillus thuringiensis* ; Ks : *Kocuria salsicia* ; R : *Rhodocyclus sp.*), avec les courbes moyennes respectives (en gras) et leur zone de déviation standard (nuance rose), ainsi que la courbe moyenne de 4S (en noir gras). 2) Superposition des courbes de cinétique moyennes de chaque condition présentée en 1). Les échelles d'intensité de fluorescence et de temps sont les mêmes pour tous les graphiques.

La première catégorie de cinétique de biofilm est constituée de courbes superposables à celle du biofilm 4S, dans les limites de variabilité interne de chaque combinaison. C'est-à-dire que l'on retrouve les mêmes événements caractéristiques de *Pseudomonas fluorescens* en biofilm 4S, en particulier la présence de l'état stationnaire qui s'établit vers 30h.

La seconde catégorie de cinétique dont fait partie la cinétique du mono-biofilm de *Pseudomonas fluorescens*, se distingue par l'absence de l'état stationnaire alors que les variations de l'intensité de fluorescence sont très similaires à celle du biofilm 4S — et donc des courbes de la première catégorie — jusqu'à 26h. On note cependant un léger décalage en temps du premier maximum de la vitesse d'expansion de *Pseudomonas fluorescens* qui survient en moyenne un peu plus tôt qu'en 4S — vers 6-7h au lieu de 10-11h (Fig. III.3.2). Dans cette catégorie, l'expansion de *Pseudomonas fluorescens* continue jusqu'à la fin des expériences

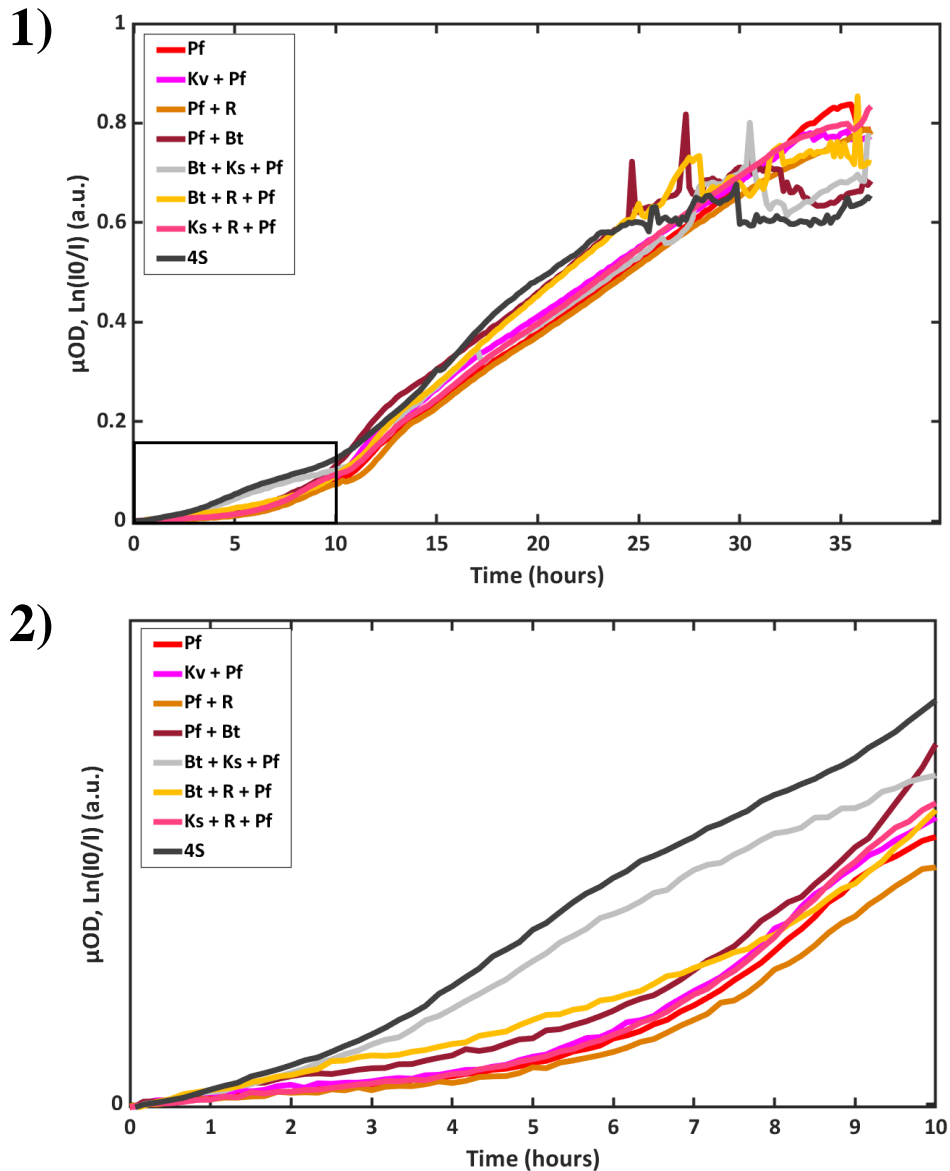
Les biofilms de la première catégorie, présentant un plateau, se distinguent par un point commun : la présence de *Bacillus thuringiensis*, alors que les biofilms de la seconde catégorie n'ont pas cette souche dans leur composition.



**Fig. III.3.2 :** Courbes des dérivés des moyennes d'intensité de fluorescence de la mCherry lissées de la condition 4S (noir) et 1S *Pseudomonas fluorescens* (rouge) en fonction du temps.

- Nous voyons donc que la présence de *Bacillus thuringiensis* induit l'établissement d'une phase stationnaire au moins pour *Pseudomonas fluorescens*.

D'autre part, en étudiant, sur ces mêmes combinaisons, les cinétiques moyennes de  $\mu\text{OD}$  (Fig. III.3.3-1), nous avons observé le même classement des courbes en 2 catégories, avec et sans phase stationnaire, mais aussi des différences supplémentaires. Ainsi, les cinétiques des biofilms de la catégorie 1 comportant *Bacillus thuringiensis* ne sont pas toutes équivalentes au regard de la  $\mu\text{OD}$  et se subdivisent en 2 nouvelles sous-catégories : la première contenant 4S et (Bt:Ks:Pf) et la deuxième contenant (Pf:Bt) et (Pf:Bt:R), soit une sous-catégorie comportant *Kocuria salsicia* et



**Fig. III.3.3 :** 1) Courbes moyennes des cinétiques de croissance de la  $\mu\text{OD}$  en fonction du temps et des différentes combinaisons de mélange de bactérie de la communauté 4S en présence de *Pseudomonas fluorescens*. 2) Zoom sur les 10 premières heures de croissance de ces mêmes courbes. Pf : *Pseudomonas fluorescens* ; Bt : *Bacillus thuringiensis* ; Ks : *Kocuria salsicia* ; R : *Rhodocyclus sp.*.

une sous-catégorie ne comportant pas *Kocuria salsaicia*. En effet, les associations comportant *Kocuria salsaicia* se distinguent par leurs phases initiales comprises entre 0 et 13h. Les biofilm 4S et (Bt:Ks:Pf) contenant donc *Kocuria salsaicia*, présentent une cinétique de croissance spécifique avec une succession de minima et maxima de vitesse d'expansion de la biomasse, ainsi que nous l'avons décrit au chapitre III.2 (Fig. III.2.5). Il apparaît que ce profil cinétique ne figure sur aucune des autres combinaisons qui montrent un développement de biomasse plus lent et des phases moins marquées. On observe que cette spécificité n'apparaît, sur les 8 combinaisons étudiées dans cette section, que sur les associations rassemblant *Bacillus thuringiensis* et *Kocuria salsaicia*.

- Il apparaît donc que l'association (Bt:Ks) favorise la création de biomasse initiale et l'installation précoce du biofilm.

- Les données de  $\mu$ OD montrent également que la présence de *Bacillus thuringiensis* induit l'installation d'une phase stationnaire vers 30h, non seulement pour la population de *Pseudomonas fluorescens* mais aussi pour la biomasse globale.

## III.3.B. Les cas complémentaires contenant *Bacillus thuringiensis*

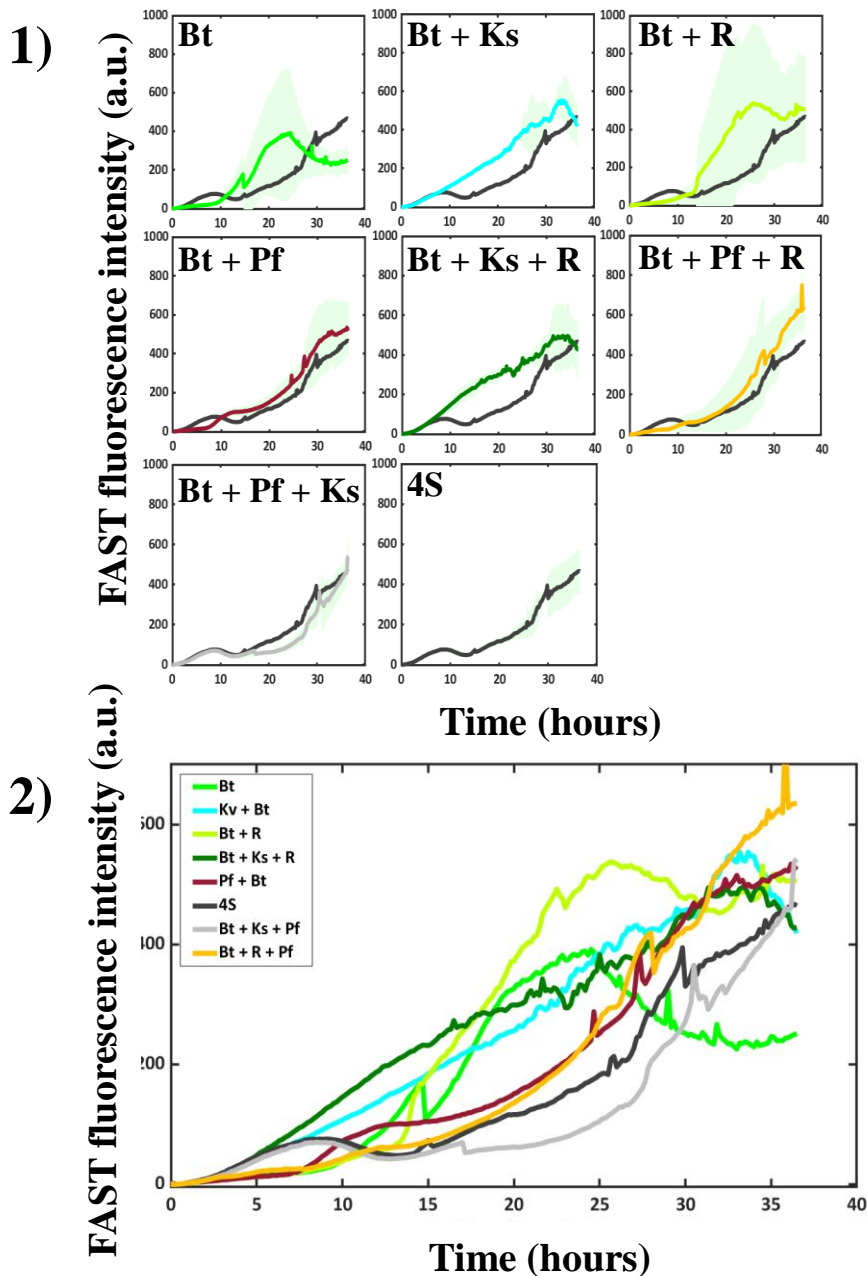
Nous étudions ici les combinaisons contenant *Bacillus thuringiensis* du point de vue de *Bacillus thuringiensis*, c'est-à-dire de la fluorescence FAST:HBR.

Les cinétiques du développement de *Bacillus thuringiensis* dans les différentes combinaisons de biofilm où il est présent (Fig. III.3.4) montrent une assez grande diversité et ne peuvent pas vraiment être regroupées en grandes catégories comme pour les mélanges contenant *Pseudomonas fluorescens*. Nous avons remarqué que *Rhodocyclus sp.* n'affecte pas les cinétiques des biofilms où il est présent. En effet, en comparant les biofilms dont la composition ne diffère que par *Rhodocyclus sp.*, les cinétiques sont très semblables.

- *Rhodocyclus sp.* n'influence pas le développement de *Bacillus thuringiensis* dans les biofilms où il est présent quelle que soit l'association.

Par ailleurs, il apparaît que la présence de *Pseudomonas fluorescens* et/ou de *Kocuria salsaicia* dans ces associations comprenant *Bacillus thuringiensis*, réduit l'écart type élevé des cinétiques du 1S de *Bacillus thuringiensis* et du 2S de (Bt :Ks) reflétant la large dispersion des répliquats. L'observation des films où de très fortes fluctuations aléatoires sont observées avec le

détachement en masse de floccs sous l'effet du flux dès que la biomasse commence à croître, suggère que la très faible stabilité physique des biofilms 1S de *Bacillus thuringiensis* est à l'origine



**Fig. III.3.4 :** Courbes de la cinétique de croissance de l'intensité de fluorescence du complexe FAST:HBR en fonction du temps et des différentes combinaisons de mélange de bactéries de la communauté 4S en présence *Bacillus thuringiensis*. 1) Les courbes de chaque condition, explicitée dans le coin haut gauche (Pf : *Pseudomonas fluorescens* ; Bt : *Bacillus thuringiensis* ; Ks : *Kocuria salsicia* ; R : *Rhodocyclus sp.*), avec les courbes moyennes (en gras), la zone d'écart-type de ces moyennes (en vert pâle) et la courbe moyenne du biofilm 4S (en noir gras). 2) Sommaire des courbes de cinétique moyennes de chaque condition présentée en 1). Les échelles d'intensité de fluorescence et de temps sont les mêmes pour tous les graphiques.

de cette dispersion. La même chose est observée en biofilm 2S de (Bt :R) (Fig. III.3.4-1 : Bt+R).

- La présence de *Pseudomonas fluorescens* et/ou *Kocuria salsicia* limite l'amplitude des fluctuations de biomasse observées sur des biofilms de 1S de *Bacillus thuringiensis* ou en 2S de (Bt:R)

De manière frappante, la présence de *Kocuria salsicia* induit une cinétique spécifique, quasi linéaire ainsi que continue, et favorise significativement l'expansion de *Bacillus thuringiensis* sur les premières 24h du biofilm (Fig. III.3.4-1 : Bt+Ks, Bt+Ks+R). Ceci est en bon accord avec la mise en évidence des interactions physiques Bt-Ks au chapitre III.2.D avec l'observation des asters. Cette interaction directe de *Bacillus thuringiensis* faiblement adhésif avec une bactérie fortement ancrée telle que *Kocuria salsicia* constitue un mécanisme physique de parasitisme.

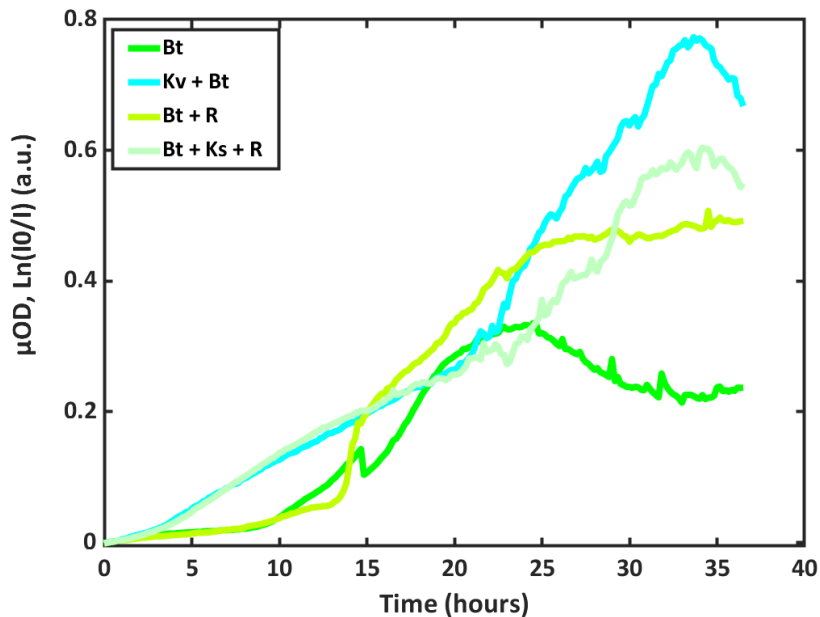
- *Kocuria salsicia* stabilise physiquement *Bacillus thuringiensis* et favorise son installation en biofilm.

D'autre part, on observe que cet avantage a partiellement aboli la stagnation induite par *Pseudomonas fluorescens* (Fig. III.3.4-1 : Bt+Pf). Si l'on compare l'expansion de *Bacillus thuringiensis* en 1S et en présence de *Pseudomonas fluorescens*, on constate que vers t=10h, ce qui correspond au ralentissement de la croissance et au détachement de *Pseudomonas fluorescens*, la présence de *Pseudomonas fluorescens* stoppe transitoirement (elle reprendra après quelques heures) l'expansion de *Bacillus thuringiensis*. Sur la base des éléments mis en évidence au chapitre III.2, nous faisons l'hypothèse que cet effet résulte de la compétition des 2 souches pour l'O<sub>2</sub>. On se rappellera ici que *Bacillus thuringiensis* induit la phase stationnaire de *Pseudomonas fluorescens* à 30h, probablement pour les mêmes raisons.

- La présence de *Pseudomonas fluorescens* induit une phase de stagnation voire de récession de l'expansion de *Bacillus thuringiensis* en biofilm.

En 4S on retrouve la combinaison additive des effets positifs de *Kocuria salsicia* et négatifs de *Pseudomonas fluorescens* sur le développement de *Bacillus thuringiensis*.

Les courbes de cinétique de  $\mu$ OD confirment la lecture des courbes de fluorescence des combinaisons de biofilm contenant *Bacillus thuringiensis* (Fig. III.3.5). Elles permettent aussi de constater que la présence de *Kocuria salsicia* dans les biofilms des différents mélanges examinés ne modifie pas la biomasse mesurée ce qui suggère une très faible contribution de *Kocuria salsicia* au développement global.



**Fig. III.3.5:** Courbes moyennes des cinétiques de croissance de la  $\mu\text{OD}$  en fonction du temps des différentes combinaisons de mélange de bactérie de la communauté 4S en présence de *Bacillus thuringiensis* et sans *Pseudomonas fluorescens*.

En résumé, nous avons mis en évidence les interactions suivantes :

- *Rhodocyclus sp.* n'influence pas la croissance de *Bacillus thuringiensis*;
- L'effet stabilisateur particulier sur la croissance de *Bacillus thuringiensis* de *Kocuria salsicia*;
- L'induction par *Pseudomonas fluorescens* d'une phase de stagnation du développement de *Bacillus thuringiensis*.

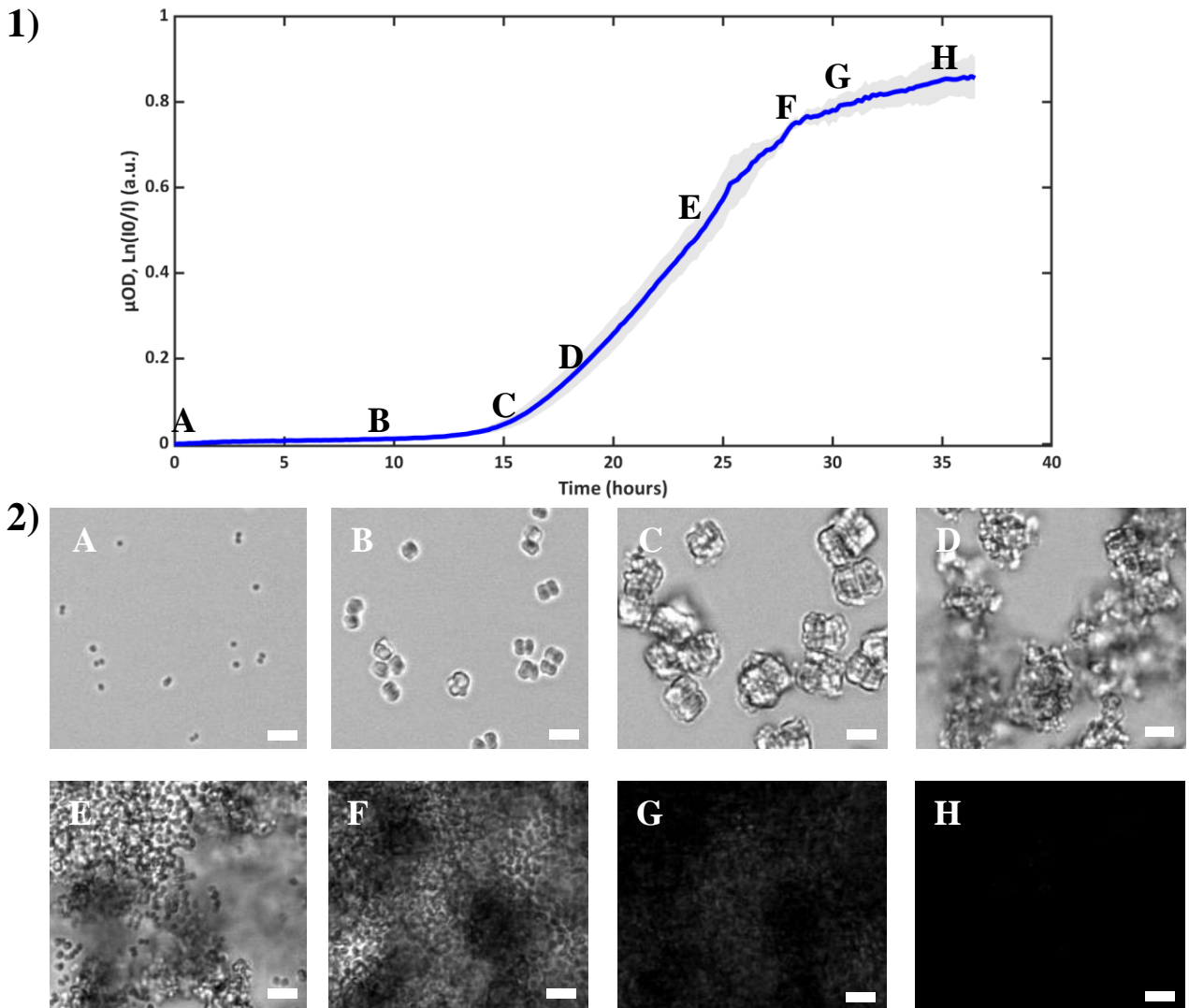
### III.3.C. Les cas particuliers de *Kocuria salsicia* et/ou *Rhodocyclus sp.*

Les deux dernières souches de notre communauté, dont les cinétiques sont plus complexes à obtenir et donc à analyser en combinaison avec au moins *Pseudomonas fluorescens* ou *Bacillus thuringiensis*, deviennent plus accessibles en condition de biofilms mono-espèce.

### III.3.C.1. *Kocuria salsicia*

Pour *Kocuria salsicia*, nous pouvons observer une phase de croissance très lente, induisant peu de changement du signal de transmission, pendant une dizaine d'heure avant que le signal n'augmente significativement (Fig. III.3.6), jusqu'à la saturation du signal de  $\mu\text{OD}$ , et cela avec une faible variabilité.

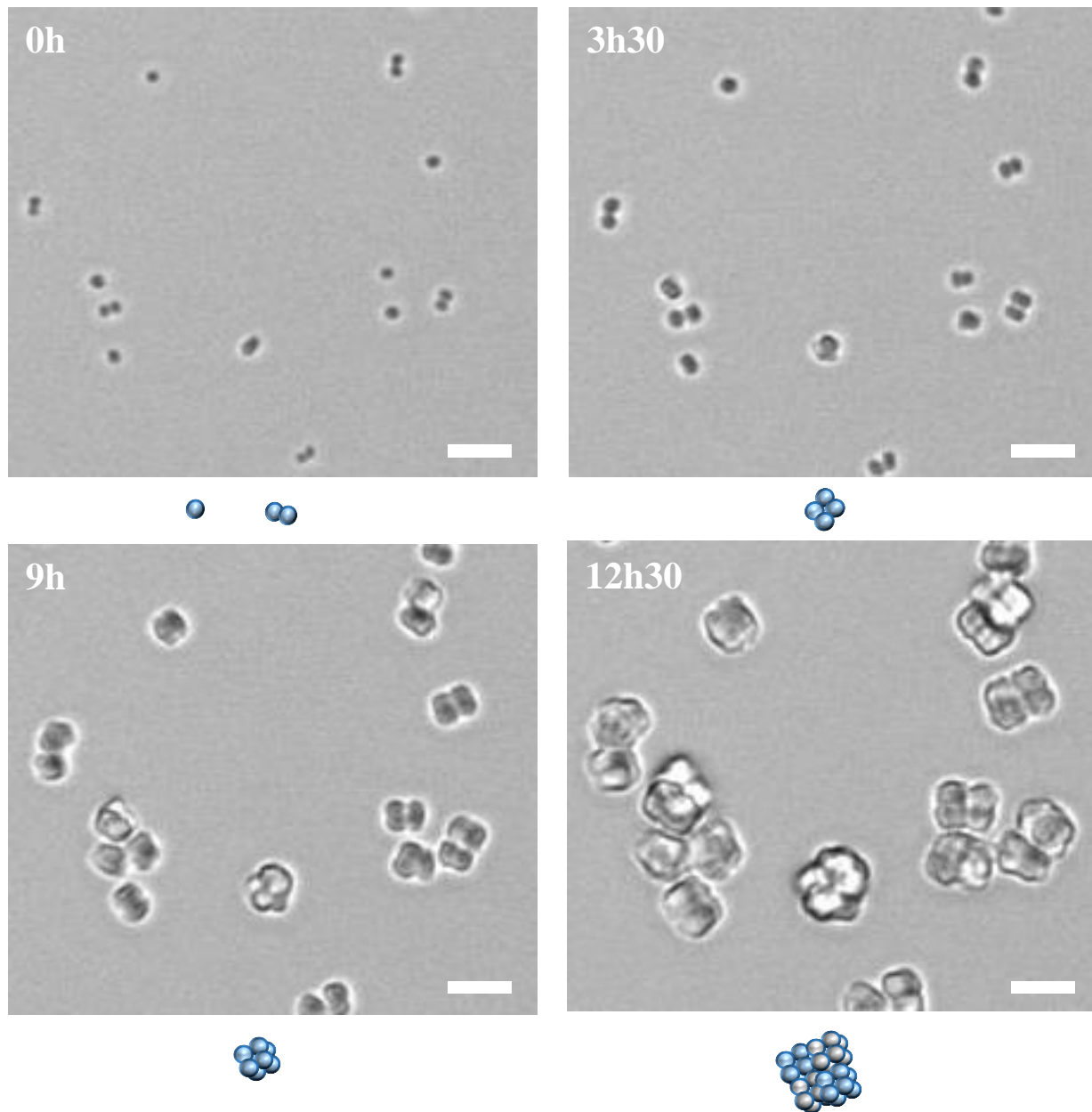
D'autre part, nous avons remarqué sur les films de vidéo-microscopie de *Kocuria salsicia* aux temps précoces durant cette phase de croissance lente que cette souche est en fait très active



**Fig. III.3.6 :** 1) Courbe de cinétique moyenne de la  $\mu\text{OD}$  d'un biofilm mono-espèce de *Kocuria salsicia*. Y est indiqué (A-H) certains moments imagés en lumière transmise moments auxquels ont été prises les images. 2) Images de la formation d'un biofilm mono-espèce de *Kocuria salsicia* au cours du temps (A = 0h, B = 9h, C = 15h, D = 18h, E = 23h30, F = 27h30, G = 30h, H = 35h). Les barres blanches servent d'échelles et représentent 5 $\mu\text{m}$ .



(Fig. III.3.7). Le début de sa croissance en biofilm 1S semble similaire à son développement en biofilm 4S (cf. III.2.D), mais en plus rapide. On voit bien sur les images le mode de division spécial de cette bactérie qui se divise en agrégats multicellulaires de taille croissante jusqu'à 64 cellules par agrégat.



**Fig. III.3.7 :** Images de la formation d'un biofilm mono-espèce de *Kocuria salsicia* aux temps précoces. Pour chaque image, un schéma de la structure des micro-colonies est accolé en-dessous. Les structures observées ressemblent à celles du développement de *Kocuria salsicia* en biofilm 4S, mais se développant plus rapidement. Les barres blanches servent d'échelles et représentent 5μm.

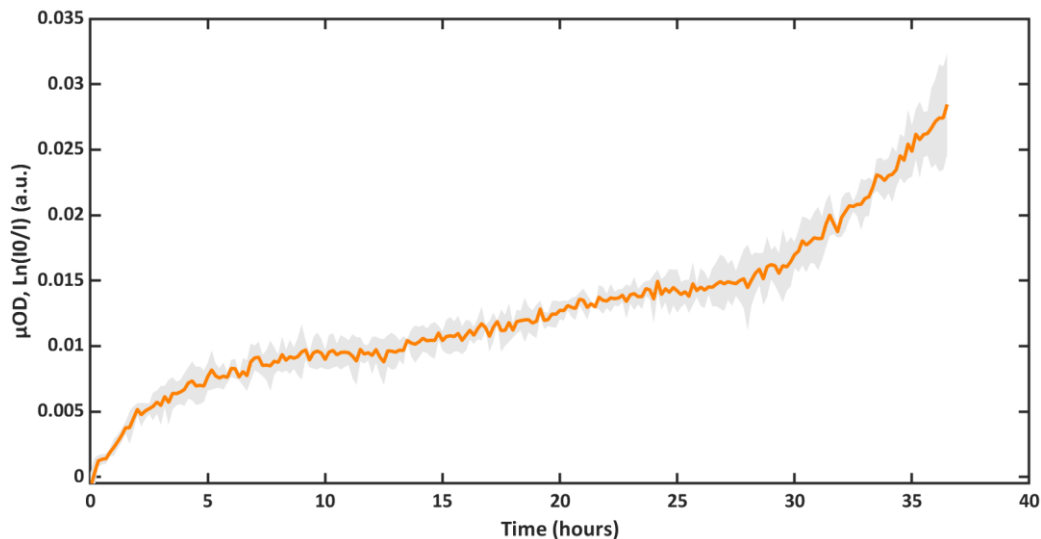
A partir d'une vingtaine d'heures, les agrégats se fractionnent et on assiste à une dispersion massive, par le flux, de cellules uniques dans le canal. Ces cellules colonisent alors de nouvelles surfaces inoccupées jusqu'alors, et se développent à nouveau jusqu'à saturer le signal d'acquisition de la  $\mu\text{OD}$ .

Ainsi, il semblerait que la croissance de *Kocuria salsicia* en biofilm soit fortement limitée lorsque sont présents *Bacillus thuringiensis* et/ou de *Pseudomonas fluorescens*, qui maintiennent *Kocuria salsicia* dans sa phase de croissance en agrégats d'assez petite taille, au stade d'une vingtaine de cellules.

- *Kocuria salsicia* forme un biofilm dense en mono-espèce et en présence de *Rhodocyclus sp.* mais son développement est inhibé par la présence en biofilm de *Pseudomonas fluorescens* et *Bacillus thuringiensis*. Nous n'avons pas encore pu établir clairement le rôle de la déplétion en  $\text{O}_2$  dans ces processus mais c'est actuellement l'hypothèse que nous privilégions.

### III.3.C.2. *Rhodocyclus sp.*

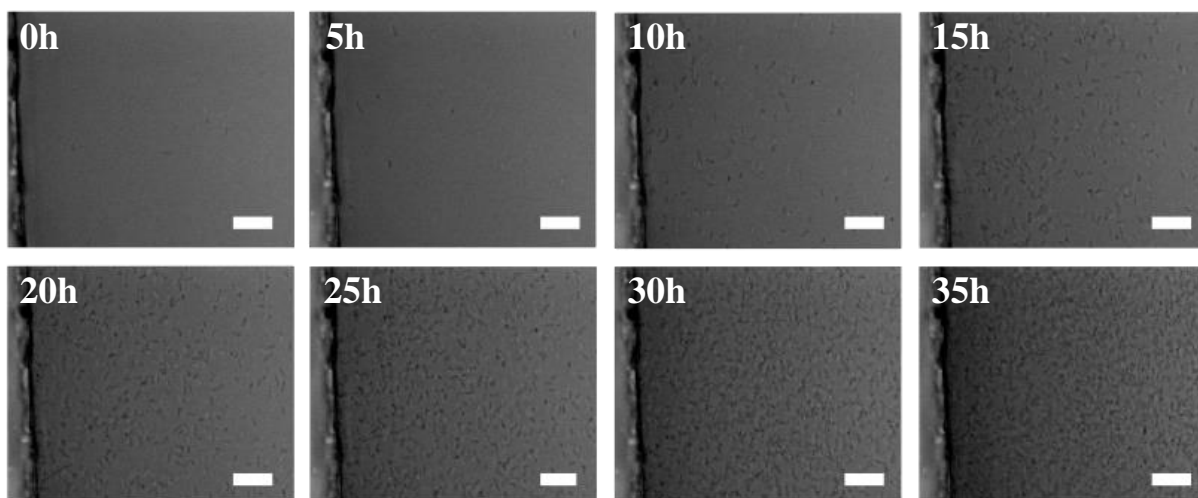
Pour *Rhodocyclus sp.*, en situation mono-espèce, le signal que nous avons obtenu en  $\mu\text{OD}$  tout au long de sa croissance est faible (Fig. III.3.8) conformément à sa petite taille mais aussi son implantation limitée en biofilm, peut être due à sa grande motilité. Il parvient cependant à former une petite couche résidante qui s'amplifie avec le temps. Ces données expliquent sa faible participation à la  $\mu\text{OD}$  en combinaison avec d'autres espèces, malgré sa présence avérée tout au



**Fig. III.3.8 :** Courbe de cinétique moyenne d'un biofilm de *Rhodocyclus sp.* (orange) et la zone de déviation standard (gris) au cours du temps.

long des expériences, grâce à la cytométrie en flux. En effet, la  $\mu\text{OD}$  maximale obtenue dans un biofilm mono-espèce de *Rhodocyclus sp.* est de 0.03 a.u., quand celle d'un biofilm 4S atteint en moyenne une valeur de 0.6 a.u.. Elle nous permet cependant d'observer une croissance très particulière composée de 2 voire 3 phases dont il nous reste à élucider l'origine.

En regardant les films de lumière transmise de *Rhodocyclus sp.* (Fig. III.3.9) pour mieux comprendre sa cinétique de croissance donnée par les courbes de  $\mu\text{OD}$  en fonction du temps (Fig. III.3.8), nous avons observé que *Rhodocyclus sp.* était présent, de manière croissante près de la surface du canal, mais pas de façon très adhérente et principalement sur les bords des canaux, durant les 10 premières heures. Il ne commence à se stabiliser et à se fixer sur la surface aux bords du canal qu'à partir de ce moment-là et jusqu'à la fin des expériences, formant un fin tapis de cellules près des bords. Cependant, ce n'est qu'à partir de 30h qu'il se développe sur toute la surface du canal de proche en proche, depuis les bords, formant une fine couche non-homogène de cellules, avec beaucoup d'évènements de départ de la surface. Ces observations microscopiques confirment la cinétique de développement de la  $\mu\text{OD}$ .

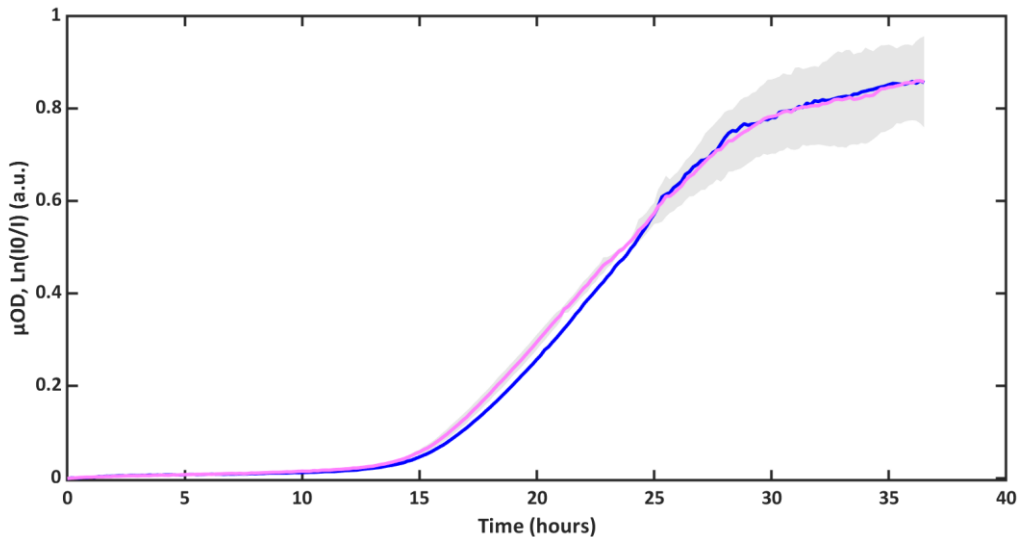


**Fig. III.3.9 :** Images d'un biofilm mono-espèce de *Rhodocyclus sp.* au cours du temps (dt=5h). Les barres blanches servent l'échelle et représentent 15 $\mu\text{m}$ .

### III.3.C.3. Biofilm 2S *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.*

Ce cas de biofilm confirme encore l'absence d'influence sur les cinétiques de croissance de *Rhodocyclus sp.* en combinaison avec une autre espèce de la communauté 4S. En effet, la cinétique de ce biofilm 2S est superposable à celle mono-espèce de *Kocuria salsicia* (Fig. III.3.10),

montrant les mêmes phases de croissance. L'observation des films de vidéo-microscopie confirme les cinétiques, et montre le même développement de *Kocuria salsicia* en 1S et en 2S (Ks:R).



**Fig. III.3.10 :** Courbe de cinétique moyenne d'un biofilm formé de *Rhodocyclus sp.* et de *Kocuria salsicia* (rose) et la zone de déviation standard (gris) au cours du temps, ainsi que la courbe de cinétique moyenne de biofilms mono-espèce de *Kocuria salsicia*.

### III.3.D. Conclusion

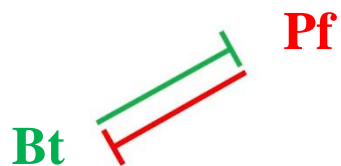
L'analyse des cinétiques de formation des biofilms de toutes les combinaisons des 4 espèces *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Kocuria salsicia*, *Rhodocyclus sp.* nous a permis de mettre en évidence plusieurs interactions inter-espèces que nous récapitulons ici :

#### ***Bacillus thuringiensis* - *Pseudomonas fluorescens***

- La présence de *Pseudomonas fluorescens* dans les biofilms contenant *Bacillus thuringiensis* induit un ralentissement précoce (aux alentours de 5 à 8h suivant les mélanges) de la croissance de la population de *Bacillus thuringiensis* à l'origine de la succession des phases de croissance et récession observées en 4S en coïncidence avec la déplétion sensible de l'O<sub>2</sub> (divergence des fluorescences GFP et MCherry). Ce ralentissement est surmonté après quelques heures alors que *Pseudomonas fluorescens* s'est lui-même délocalisé pour s'étendre dans une niche alternative (surface haute du canal).

- *Bacillus thuringiensis* induit l'installation d'un état stationnaire vers 30h à un stade où le biofilm est largement dominé par *Pseudomonas fluorescens* (10 fois plus de biomasse que *Pseudomonas fluorescens*). En son absence, *Pseudomonas fluorescens* impose une croissance continue du biofilm. L'état stationnaire semble résulter d'un équilibre croissance-détachement observable sur les films. Nous avons identifié deux sources potentielles de son existence en présence de *Bacillus thuringiensis*. La consommation d'oxygène par *Bacillus thuringiensis* qui, à ce stade, limite la croissance de *Pseudomonas fluorescens*, la fragilisation physique de la population de *Pseudomonas fluorescens* dans les zones où les deux bactéries sont co-localisées, essentiellement aux bords du canal.

Nous concluons à la compétition de ces deux espèces pour l'accès à l'O<sub>2</sub>.

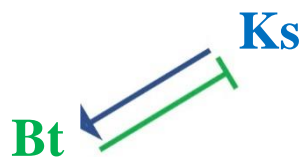


#### ***Bacillus thuringiensis* - *Kocuria salsicia***

- *Kocuria salsicia* favorise l'installation de *Bacillus thuringiensis* en biofilm par stabilisation physique.

- *Bacillus thuringiensis* inhibe la croissance de *Kocuria salsicia* potentiellement par consommation de l'O<sub>2</sub> nécessaire.

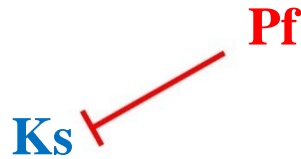
Nous concluons à une relation de parasitisme de *Bacillus thuringiensis* envers *Kocuria salsicia*.



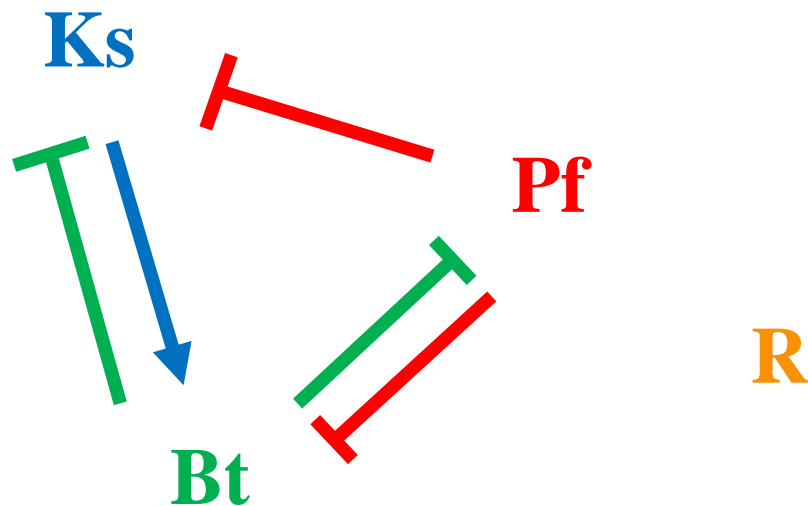
#### ***Pseudomonas fluorescens* - *Kocuria salsicia***

- *Pseudomonas fluorescens* inhibe, tout comme *Bacillus thuringiensis*, la croissance de *Kocuria salsicia* ce qui supporte l'idée d'une cause générique telle que l'appauvrissement de l'environnement en O<sub>2</sub>.

- La relation de *Pseudomonas fluorescens* avec *Kocuria salsicia* s'apparente à de l'amensalisme car la population de *Pseudomonas fluorescens* ne semble pas altérée par la présence de *Kocuria salsicia*.



Ces interactions sont résumées Fig. III.3.11. Elles résultent de processus physiques — soit interaction physique directe entre bactéries (*Bacillus thuringiensis* - *Kocuria salsicia*), soit fragilisation physique par création d'un milieu moins résistant à l'hydrodynamique (*Pseudomonas fluorescens* - *Bacillus thuringiensis*) — et de processus chimiques (consommation d'un bien commun l'oxygène). Elles permettent la formation d'un biofilm 4S stable. Nous n'avons pas observé d'interactions autres que celles ternaires susmentionnées, et *Rhodocyclus sp.* semble prospérer de façon neutre dans la communauté.



**Fig. III.3.11** : Schéma récapitulatif des interactions ayant lieu dans la communauté entre *Kocuria salsicia* (Ks), *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus thuringiensis* (Bt) et *Rhodocyclus sp.* (R).



## **IV. Conclusions et perspectives**





# IV.1. Conclusions

Durant ce travail de thèse, nous avons étudié et caractérisé la formation d'un biofilm multi-espèces à 4 espèces vivant en canal milli-fluidique sous flux constant de milieux nutritif. A l'aide d'un montage expérimental précédemment mis au point, nous avons pu suivre en temps réel la formation et le développement de tels biofilms en vidéo-microscopie.

Tout d'abord, dans un premier temps, en utilisant un biofilm mono-espèce formé par la bactérie *Escherichia coli*, nous avons démontré les limitations des protéines fluorescentes de la famille GFP quant à l'étude quantitative de systèmes comme le nôtre. Nous avons ainsi mis en évidence la sensibilité de ces protéines à la concentration locale en  $O_2$ , fortement consommé par les bactéries pour se développer, et déterminé un niveau seuil, rapidement atteint en condition de croissance de biofilm, en dessous duquel ces protéines ne sont plus correctement maturées en protéines fluorescentes. Cela mène à une distribution spatiale de l'intensité de fluorescence qui dépend de plusieurs facteurs : le nombre de cellules, la concentration locale d' $O_2$  et l'historique des cellules, tel que le nombre de divisions cellulaires engagées depuis le franchissement du seuil minimum d' $O_2$ . Pour pallier à la non-linéarité de ces rapporteurs fluorescents de la famille GFP, nous avons adopté une solution alternative impliquant un nouveau type de marqueurs représenté par la protéine FAST, une protéine à la fluorescence inductible chimiquement par complexation avec une petite molécule fluorogène exogène, et cela de manière réversible. Ce mécanisme de fluorescence ne dépend pas de l' $O_2$ , ce qui le rend très attrayant pour le marquage cellulaire en milieu faible en  $O_2$ . Nous avons démontré que ce système est efficace en condition de biofilm et reste quantitatif au cours du temps. De plus, la possibilité de changer de fluorogène pour générer des caractéristiques de fluorescence distinctes ouvre une voie très intéressante pour un marquage multi-espèces et la possibilité de combiner ces marqueurs avec des protéines classiques pour, par exemple détecter indirectement la déplétion en  $O_2$ .

Dans un deuxième temps, nous avons étudié un biofilm composé de 4 espèces de bactéries, provenant d'un milieu naturel et adapté au laboratoire. Nous avons caractérisé la formation et le développement de cette communauté multi-espèces adhérente en mesurant les cinétiques de développement de la biomasse globale du biofilm 4S puis de celles des espèces marquées — *Bacillus thuringiensis* et *Pseudomonas fluorescens* — au sein de la communauté. Pour ce faire, nous avons marqué génétiquement 2 des 4 souches de cette communauté pour pouvoir suivre leur cinétique propre dans les biofilms (*Bacillus thuringiensis* avec le système FAST, et *Pseudomonas fluorescens* avec la mCherry).

Nous avons pu proposer un scénario où toutes les bactéries de cette communauté se maintiennent au cours du temps, bien qu'en suivant des développements différents. Nous avons mis en évidence l'installation d'un état stationnaire vers 30h à l'échelle globale ainsi que la succession de deux phases de croissance séparées par une phase de régression pour *Bacillus thuringiensis* et *Pseudomonas fluorescens*, ce avec des temps caractéristiques partiellement synchrones pour ces 2 bactéries.

Un événement remarquable de la formation de cette communauté est le détachement bien réglé de *Pseudomonas fluorescens* quittant le biofilm initial en formation à la lamelle pour se développer dans une niche alternative en haut du canal.

L'observation de *Kocuria salsicia*, en vidéo-microscopie de lumière transmise, nous a montré une expansion limitée à 3 ou 4 divisions apparentes. Cette souche a cependant démontré un rôle fondateur d'ancrage physique de *Bacillus thuringiensis* dans le biofilm.

La quatrième bactérie de la communauté, *Rhodocyclus sp.*, s'est montrée de par ses propriétés intrinsèques de taille et de motilité dans les canaux difficile à traquer mais nous avons la certitude de sa présence dans le biofilm tout le long de l'expérience grâce à des mesures de cytométrie en flux effectuées sur les biofilms à différents temps de maturité (entre 40h et 65h).

Des mesures de dénombrement, réalisées en cytométrie en flux et comptage sur boîte réalisées sur des extractions de biofilm, menées après 40h de formation ont confirmé la stabilité après 40h du biofilm formé par les quatre espèces. Cette méthode de mesure nous a aussi permis de déterminer les ratios entre nos espèces dans cette phase d'équilibre stationnaire. Nous savons ainsi que *Pseudomonas fluorescens* domine en nombre de cellules la communauté avec 5 fois plus de cellules que de *Bacillus thuringiensis* ou de *Rhodocyclus sp.*, eux-mêmes 4 fois plus nombreux que les *Kocuria salsicia*.

L'ensemble des résultats nous a amenés à postuler un mécanisme de formation gouverné par la modulation du taux d'O<sub>2</sub> consommé par les bactéries au cours de la croissance. Ainsi, la baisse du taux d'O<sub>2</sub> induirait une diminution de la croissance de *Bacillus thuringiensis* et le détachement de *Pseudomonas fluorescens* en réponse à ce stress environnemental. C'est aussi ce qui potentiellement favoriserait l'accumulation des espèces dans les zones latérales du canal au voisinage de la fourniture d'O<sub>2</sub> permise par les parois en PDMS.

Dans un troisième temps, nous avons étudié les biofilms résultant des différentes combinaisons des 4 espèces et déterminé plusieurs interactions inter-espèces au sein de cette communauté. Nous avons détecté des interactions de compétition entre *Bacillus thuringiensis* et *Pseudomonas fluorescens* liées à l'O<sub>2</sub> en faveur de *Pseudomonas fluorescens* aux temps précoces (5h-8h), et en faveur de *Bacillus thuringiensis* aux temps tardifs (après 30h). Nous avons aussi mis en évidence une relation de parasitisme entre *Kocuria salsicia* et *Bacillus thuringiensis* en faveur de ce dernier. D'autre part, nous avons établi l'existence d'une relation d'amensalisme entre

*Pseudomonas fluorescens* et *Kocuria salsicia* en faveur de ce premier. Enfin, *Rhodocyclus sp.* semble se développer de façon neutre vis-à-vis des autres membres de la communauté.

## IV.2. Perspectives

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes régissant cette communauté, valider nos hypothèses et généraliser plus avant nos conclusions, il faudrait maintenant explorer plusieurs autres axes dont certains sont déjà à l'étude dans le groupe.

- Valider le rôle supposé de l'O<sub>2</sub> en cartographiant le taux d'O<sub>2</sub> dans le canal — aussi bien dans le biofilm que dans le fluide — et suivre le développement de ces biofilms en O<sub>2</sub> contrôlé. Ces expériences nous permettraient également d'explorer l'hypothèse d'une transition anaérobie.

- Réaliser des mesures de la composition de l'effluent du biofilm dans le temps, mesures que nous avons initiées dans la thèse mais qui n'ont pu aboutir complètement pour des raisons de retard technique. Nous pourrions ainsi préciser les épisodes de détachement et les phases de divergence de niche telle que la migration de *Pseudomonas fluorescens* vers des environnements plus riches en O<sub>2</sub>.

- Développer l'analyse de la dynamique interne du biofilm de façon à confirmer et approfondir la compréhension des effets physiques ainsi que décrire mieux le développement de la matrice extracellulaire dans les biofilms multi-espèces.

- Un progrès méthodologique très souhaitable est celui de la poursuite du développement de marqueurs performants pour l'étude des biofilms — pour *Pseudomonas fluorescens* afin de pallier aux défauts de la mCherry — pour *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.* afin d'avoir un marqueur fluorescent qui leur soit propre. Pour cela, de nouvelles constructions de biologie moléculaire doivent être réalisées.

- L'analyse transcriptomique des différents biofilms que peut former le consortium de 4 espèces, déjà entamée par les chercheurs de l'Institut Micalis avec qui nous travaillons en collaboration sur le biofilm 4S est de nature à faire progresser notre compréhension de ce système. En effet, l'étude des transcriptomes pourrait permettre de confirmer et préciser nos hypothèses quant aux interactions inter-espèces dans la communauté, et potentiellement en découvrir de nouvelles.

A plus longue échéance, l'étude des réponses du biofilm à diverses perturbations : chimiques, en ajoutant un produit biocide à diverses concentrations, ou des changements de pH du milieu, de manière ponctuelle ou continue. Elles pourraient aussi être physiques, en changeant

la température ambiante, ou en jouant sur l'hydrodynamique. Le dernier type de perturbation pourrait être biologique, en ajoutant une cinquième espèce.





# Bibliographie :

- Absalon, C., Ymele-Leki, P., & Watnick, P. I. (2012). The bacterial biofilm matrix as a platform for protein delivery. *MBio*, 3(4), e00127-12. <https://doi.org/mBio.00127-12> [pii]10.1128/mBio.00127-12
- Alhede, M., Qvortrup, K., Liebrechts, R., Hoiby, N., Givskov, M., & Bjarnsholt, T. (2012). Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 65(2), 335–342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00956.x>
- Almblad, H., Harrison, J. J., Rybtke, M., Groizeleau, J., Givskov, M., Parsek, M. R., & Tolker-Nielsen, T. (2015a). Erratum for Almblad et al., The Cyclic AMP-Vfr Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Is Inhibited by Cyclic Di-GMP. *Journal of Bacteriology*, 197(13), 2190–2200. <https://doi.org/10.1128/JB.00193-15>
- Almblad, H., Harrison, J. J., Rybtke, M., Groizeleau, J., Givskov, M., Parsek, M. R., & Tolker-Nielsen, T. (2015b). The Cyclic AMP-Vfr Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Is Inhibited by Cyclic Di-GMP. *Journal of Bacteriology*, 197(13), 2190–2200. <https://doi.org/10.1128/JB.00193-15>
- Amarasinghe, J. J., Scannapieco, F. A., & Haase, E. M. (2009). Transcriptional and translational analysis of biofilm determinants of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in response to environmental perturbation. *Infection and Immunity*, 77(7), 2896–2907. <https://doi.org/10.1128/IAI.00126-09>
- Amato, P., Joly, M., Schaupp, C., Attard, E., Möhler, O., Morris, C. E., ... Delort, A. M. (2015). Survival and ice nucleation activity of bacteria as aerosols in a cloud simulation chamber. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 15(11), 6455–6465. <https://doi.org/10.5194/acp-15-6455-2015>
- Amine Ben Mlouka, M., Cousseau, T., & Di Martino, P. (2016). Application of fluorescently labelled lectins for the study of polysaccharides in biofilms with a focus on biofouling of nanofiltration membranes. *AIMS Molecular Science*, 3(3), 338–356. <https://doi.org/10.3934/molsci.2016.3.338>
- An, D., & Parsek, M. R. (2007). The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Current Opinion in Microbiology*, 10(3), 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.05.011>
- Anderson, G. G., & O'Toole, G. A. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*, 322, 85–105. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18453273](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18453273)
- Antoun, H. (2013). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 353–355. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01169-4>



- Araujo, P. A., Malheiro, J., Machado, I., Mergulhao, F., Melo, L., & Simoes, M. (2016). Influence of Flow Velocity on the Characteristics of *Pseudomonas fluorescens* Biofilms. *Journal of Environmental Engineering*, 139(September), 1152–1161. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870)
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., ... Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Azevedo, N. F., Lopes, S. P., Keevil, C. W., Pereira, M. O., & Vieira, M. J. (2009). Time to “go large” on biofilm research: Advantages of an omics approach. *Biotechnology Letters*, 31(4), 477–485. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9901-4>
- Bakker, D. P., Postmus, B. R., Busscher, H. J., & Van Der Mei, H. C. (2004). Bacterial strains isolated from different niches can exhibit different patterns of adhesion to substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3758–3760. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3758-3760.2004>
- Baliarda, A., Winkler, M., Tournier, L., Aymerich, S., & Tinsley, C. R. (n.d.). Dynamic interspecies interactions and robustness in a 4-species biofilm community. *The British Journal of Psychiatry*, 112(483), 211–212. <https://doi.org/10.1192/bjp.112.483.211-a>
- Bauer, H., Giebl, H., Hitzemberger, R., Kasper-Giebl, A., Reischl, G., Zibuschka, F., & Puxbaum, H. (2003). Airborne bacteria as cloud condensation nuclei. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres*, 108(D21), 1–5. <https://doi.org/10.1029/2003jd003545>
- Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends in Microbiology*, 22(9), 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.002>
- Berne, C., Ellison, C. K., Ducret, A., & Brun, Y. V. (2018). Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nature Reviews Microbiology*, 16(10), 616–627. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0057-5>
- Besemer, K., Singer, G., Hödl, I., & Battin, T. J. (2009). Bacterial community composition of stream biofilms in spatially variable-flow environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7189–7195. <https://doi.org/10.1128/AEM.01284-09>
- Bleck, C. K. E., Merz, A., Gutierrez, M. G., Walther, P., Dubochet, J., Zuber, B., & Griffiths, G. (2010). Comparison of different methods for thin section em analysis of *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Microscopy*, 237(1), 23–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03299.x>
- Bosak, T., Greene, S. E., & Newman, D. K. (2007). A likely role for anoxygenic photosynthetic microbes in the formation of ancient stromatolites. *Geobiology*, 5(2), 119–126. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2007.00104.x>
- Buckley, A. M., Petersen, J., Roe, A. J., Douce, G. R., & Christie, J. M. (2015). LOV-based reporters for fluorescence imaging. *Current Opinion in Chemical Biology*, 27, 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.011>

- Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T., & Sørensen, S. J. (2014). Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? *Trends in Microbiology*, 22(2), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.004>
- Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 493–520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>
- Carter, K. C. (1985). *Koch 's Postulates in Relation To the work of Jacob Henle and Edwin Klebs.* 353–374.
- Cerca, F., Trigo, G., Correia, A., Cerca, N., Azeredo, J., & Vilanova, M. (2011). SYBR green as a fluorescent probe to evaluate the biofilm physiological state of staphylococcus epidermidis, using flow cytometry. *Canadian Journal of Microbiology*, 57(10), 850–856. <https://doi.org/10.1139/w11-078>
- Characklis, W. G., & James D. Bryers, I. by. (1981). Bioengineering report: Fouling biofilm development: A process analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2), 309–347. <https://doi.org/10.1002/bit.22227>
- Chatterjee, S., Biswas, N., Datta, A., Dey, R., & Maiti, P. (2014). Atomic force microscopy in biofilm study. *Microscopy*, 63(4), 269–278. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfu013>
- Ciofu, O., Tolker-Nielsen, T., Jensen, P. Ø., Wang, H., & Høiby, N. (2015). Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 85, 7–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.11.017>
- Conrad, J. C., Gibiansky, M. L., Jin, F., Gordon, V. D., Motto, D. A., Mathewson, M. A., ... Wong, G. C. L. (2011). Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa*. *Biophysical Journal*, 100(7), 1608–1616. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.020>
- Costa, O. Y. A., Raaijmakers, J. M., & Kuramae, E. E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: Ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01636>
- Costerston. (1990). Biofouling and biocorrosion in industrial water systems : proceedings of the . *International Workshop on Industrial Biofouling and Biocorrosion*, (1984).
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Crapart, S., Fardeau, M. L., Cayol, J. L., Thomas, P., Sery, C., Ollivier, B., & Combet-Blanc, Y. (2007). *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(2), 287–292. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64639-0>
- De Angelis, M., Siragusa, S., Campanella, D., Di Cagno, R., & Gobbetti, M. (2015). Comparative

- proteomic analysis of biofilm and planktonic cells of *Lactobacillus plantarum* DB200. *Proteomics*, 15(13), 2244–2257. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400363>
- De La Fuente, L., Montanes, E., Meng, Y., Li, Y., Burr, T. J., Hoch, H. C., & Wu, M. (2007). Assessing adhesion forces of type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* bacteria by use of a microfluidic flow chamber. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2690–2696. <https://doi.org/10.1128/AEM.02649-06>
- Decho, A. W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments : their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev*, 28(January), 73–153.
- Decho, A. W., & Gutierrez, T. (2017). Microbial extracellular polymeric substances (EPSs) in ocean systems. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00922>
- Decho, A. W., Visscher, P. T., & Reid, R. P. (2005). Production and cycling of natural microbial exopolymers (EPS) within a marine stromatolite. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 219(1–2), 71–86. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2004.10.015>
- Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., van Hoef, V., De Keersmaecker, B., & Ollevier, F. (2009). Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiological Research*, 164(6), 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.06.001>
- DeLeon-Rodriguez, N., Lathem, T. L., Rodriguez-R, L. M., Barazesh, J. M., Anderson, B. E., Beyersdorf, A. J., ... Konstantinidis, K. T. (2013). Microbiome of the upper troposphere: Species composition and prevalence, effects of tropical storms, and atmospheric implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(7), 2575–2580. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212089110>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Ehlers, L. J., & Bouwer, E. J. (1999). RP4 plasmid transfer among species of *Pseudomonas* in a biofilm reactor. *Water Science and Technology*, 39(7), 163–171. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00164-X](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00164-X)
- EHRENBERG, C. G. (1838). *Die Infusionsthierchen als vollkommene Organismen*.
- Elzer, P. H., Roop, R. M., Kovach, M. E., Robertson, G. T., Peterson, K. M., Steven Hill, D., & Farris, M. A. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166(1), 175–176. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00584-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00584-1)
- Faust, K., & Raes, J. (2012). Microbial interactions: from networks to models. *Nat Rev Microbiol*, 10(8), 538–550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2832>
- Flemming, H C, & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Flemming, H C, Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016).

- Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 14(9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Flemming, Hans Curt, Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: The “House of Biofilm Cells.” *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945–7947. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Flemming, Hans Curt, & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247–260. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9>
- Franklin, R. E., & Gosling, R. G. (1953a). Evidence for 2-chain Helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature*, Vol. 172, pp. 156–157. <https://doi.org/10.1038/172156a0>
- Franklin, R. E., & Gosling, R. G. (1953b). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, pp. 740–741. <https://doi.org/10.1038/nature01396>
- Friedman, J., Higgins, L. M., & Gore, J. (2017). Community structure follows simple assembly rules in microbial microcosms. *Nat Ecol Evol*, 1(5), 109. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0109>
- Frolund, B., Palmgren, R., Keiding, K., & Nielsen, P. H. (1996). *Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin*. 5.
- Ge, Y., Zhao, N., Hu, X., Shi, T., Cai, Q., & Yuan, Z. (2014). A novel transcriptional activator, tubX, is required for the stability of *Bacillus sphaericus* mosquitocidal plasmid pBsph. *Journal of Bacteriology*, 196(24), 4304–4314. <https://doi.org/10.1128/JB.01855-14>
- Ghigo, J. (2001). *Natural conjugative plasmids induce bacterial bio<sup>®</sup>lm development*. 412(July), 24–27.
- Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412(6845), 442–445. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11473319](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11473319)
- Gibiansky, M. L., Conrad, J. C., Jin, F., Gordon, V. D., Motto, D. A., Mathewson, M. A., ... Wong, G. C. L. (2010). Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces. *Science*, 330(6001), 3–5. <https://doi.org/10.1126/science.1194238>
- Goffredi, S. K., Warén, A., Orphan, V. J., Van Dover, C. L., & Vrijenhoek, R. C. (2004). Hydrothermal Vent Gastropod from the Indian Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 3082–3090. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.3082>
- Gonze, D., Coyte, K. Z., Lahti, L., & Faust, K. (2018). Microbial communities as dynamical systems. *Current Opinion in Microbiology*, 44, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.07.004>
- Guillonau, R., Baraquet, C., Bazire, A., & Molmeret, M. (2018). Multispecies biofilm development of marine bacteria implies complex relationships through competition and synergy and modification of matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01960>

- Haagensen, J. A. J., Klausen, M., Ernst, R. K., Miller, S. I., Folkesson, A., Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2007). Differentiation and distribution of colistin- and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology*, *189*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1128/JB.00720-06>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*, *2*(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hall-Stoodley, Luanne. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews ...*, *2*(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hannig, C., Follo, M., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2010). Visualization of adherent microorganisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology*, *59*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.015420-0>
- Heim, R., Prasher, D. C., & Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(26), 12501–12504. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7809066>
- Howard, G. (2005). The Remarkable Vision of Robert Hooke (1635-1703): First Observer of the Microbial World. *Perspectives in Biology and Medicine*, *48*(2), 266–272. <https://doi.org/doi:10.1353/pbm.2005.0053>.
- Hügler, M., Wirsen, C. O., Fuchs, G., Taylor, C. D., & Sievert, S. M. (2005). Evidence for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the  $\epsilon$  subdivision of proteobacteria. *Journal of Bacteriology*, *187*(9), 3020–3027. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3020-3027.2005>
- Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev*, *73*(2), 310–347. <https://doi.org/73/2/310> [pii]10.1128/MMBR.00041-08 [doi]
- Kim, J., Park, H. D., & Chung, S. (2012). Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*, *17*(8), 9818–9834. <https://doi.org/molecules17089818> [pii]10.3390/molecules17089818
- Kim, Junghyun, Kim, H. S., Han, S., Lee, J. Y., Oh, J. E., Chung, S., & Park, H. D. (2013). Hydrodynamic effects on bacterial biofilm development in a microfluidic environment. *Lab on a Chip*, *13*(10), 1846–1849. <https://doi.org/10.1039/c3lc40802g>
- Kirisits, M. J., Margolis, J. J., Purevdorj-gage, B. L., Vaughan, B., Chopp, D. L., Stoodley, P., & Parsek, M. R. (2007). *Influence of the Hydrodynamic Environment on Quorum Sensing in*. *189*(22), 8357–8360. <https://doi.org/10.1128/JB.01040-07>
- Kolter, R., & Greenberg, E. P. (2006). *The superficial life of microbes*. *441*(May).
- Kuchma, S. L., Ballok, A. E., Merritt, J. H., Hammond, J. H., Lu, W., Rabinowitz, J. D., & O’Toole, G. A. (2010). Cyclic-di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas*

- aeruginosa: The pilY1 gene and its impact on surface-associated behaviors. *Journal of Bacteriology*, 192(12), 2950–2964. <https://doi.org/10.1128/JB.01642-09>
- Kumagai, A., Ando, R., Miyatake, H., Greimel, P., Kobayashi, T., Hirabayashi, Y., ... Miyawaki, A. (2013). A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. *Cell*, 153(7), 1602–1611. [https://doi.org/S0092-8674\(13\)00644-2](https://doi.org/S0092-8674(13)00644-2) [pii]10.1016/j.cell.2013.05.038
- Kumar Singha, T. (2013). Microbial Extracellular Polymeric Substances: Production, Isolation and Applications. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 2(2), 276–281. <https://doi.org/10.9790/3013-0220276281>
- Legendijk, E. L., Validov, S., Lamers, G. E. M., De Weert, S., & Bloemberg, G. V. (2010). Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiology Letters*, 305(1), 81–90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01916.x>
- Lee, K. W. K., Periasamy, S., Mukherjee, M., Xie, C., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2014). Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *The ISME Journal*, 8(4), 894–907. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.194>
- Lenahan, M., Sheridan, Á., Morris, D., Duffy, G., Fanning, S., & Burgess, C. M. (2014). Transcriptomic analysis of triclosan-susceptible and-tolerant escherichia coli O157:H19 in response to triclosan exposure. *Microbial Drug Resistance*, 20(2), 91–103. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0063>
- Li, C., Plamont, M. A., Aujard, I., Le Saux, T., Jullien, L., & Gautier, A. (2016). Design and characterization of red fluorogenic push-pull chromophores holding great potential for bioimaging and biosensing. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 14(39), 9253–9261. <https://doi.org/10.1039/c6ob01612j>
- Li, C., Plamont, M. A., Sladitschek, H. L., Rodrigues, V., Aujard, I., Neveu, P., ... Gautier, A. (2017). Dynamic multicolor protein labeling in living cells. *Chemical Science*, 8(8), 5598–5605. <https://doi.org/10.1039/c7sc01364g>
- Little, A. E., Robinson, C. J., Peterson, S. B., Raffa, K. F., & Handelsman, J. (2008). Rules of Engagement: Interspecies Interactions that Regulate Microbial Communities. *Annu Rev Microbiol*, 62, 375–401. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.030608.101423>
- Liu, W., Roder, H. L., Madsen, J. S., Bjarnsholt, T., Sorensen, S. J., & Burmolle, M. (2016). Interspecific Bacterial Interactions are Reflected in Multispecies Biofilm Spatial Organization. *Front Microbiol*, 7, 1366. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01366>
- Lu, X., Liu, J., Zhang, N., Fu, Y., Zhang, Z., Li, Y., ... Cao, Y. (2019). Ripened Pu-erh tea extract protects mice from obesity by modulating gut microbiota composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, acs.jafc.8b04909. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04909>
- Lustig, A., & Levine, A. J. (1992). One hundred years of virology. *Journal of Virology*, 66(8), 4629–4631.

- Madden, P., Chinalia, F. A., Enright, A. M., Collins, G., & O'Flaherty, V. (2010). Perturbation-independent community development in low-temperature anaerobic biological wastewater treatment bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, *105*(1), 79–87. <https://doi.org/10.1002/bit.22507>
- Maier, B., & Wong, G. C. L. (2015). How Bacteria Use Type IV Pili Machinery on Surfaces. *Trends in Microbiology*, *23*(12), 775–788. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.09.002>
- Martin, W. F., Bryant, D. A., & Beatty, J. T. (2018). A physiological perspective on the origin and evolution of photosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, *42*(2), 205–231. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX056>
- Mašić, A., Bengtsson, J., & Christensson, M. (2010). Measuring and modeling the oxygen profile in a nitrifying Moving Bed Biofilm Reactor. *Mathematical Biosciences*, *227*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2010.05.004>
- Meng, Y., Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J., & Hoch, H. C. (2011). Upstream Migration of *Xylella fastidiosa* via Pilus-Driven Twitching Motility. *Plant Physiology*, *108*(3), 1748–1759. <https://doi.org/10.1128/JB.187.16.5560>
- Merritt, P. M., Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. *J Bacteriol*, *189*(22), 8005–8014. <https://doi.org/10.1128/JB.00566-07> [pii]10.1128/JB.00566-07
- Mettler, E., & Carpentier, B. (1997). Localisation, dénombrement et identification de la contamination microbienne après nettoyage de joints en EPDM d'un circuit de pasteurisation de l'industrie laitière. *Lait*, *77*(4), 489–503. <https://doi.org/10.1051/lait:1997435>
- Meunier, B., Bréchnignac, C., Cossart, P., Fischer, A., Changeux, J.-P., Le Maho, Y., ... Villani, C. (2016). La lettre de l'académie des sciences. *Consommation*, *12*, 34.
- Mohit, V., Culley, A., Lovejoy, C., Bouchard, F., & Vincent, W. F. (2017). Hidden biofilms in a far northern lake and implications for the changing Arctic. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *3*(1), 1–3. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0024-3>
- Monmeyran, A., Thomen, P., Jonquière, H., Sureau, F., Li, C., Plamont, M. A., ... Henry, N. (2018). The inducible chemical-genetic fluorescent marker FAST outperforms classical fluorescent proteins in the quantitative reporting of bacterial biofilm dynamics. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28643-z>
- Muller, S., & Nebe-von-Caron, G. (2010). Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiol Rev*, *34*(4), 554–587. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00214.x>
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., & Foster, K. R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, *33*(1), 206–224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00150.x>
- Neu, T R, & Lawrence, J. R. (2015). Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol*, *23*(4), 233–242.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.010>

- Neu, T R, Manz, B., Volke, F., Dynes, J. J., Hitchcock, A. P., & Lawrence, J. R. (2010). Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol Ecol*, 72(1), 1–21. <https://doi.org/FEM837> [pii]10.1111/j.1574-6941.2010.00837.x [doi]
- Neu, Thomas R., Manz, B., Volke, F., Dynes, J. J., Hitchcock, A. P., & Lawrence, J. R. (2010). Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00837.x>
- Niu, B., Paulson, J. N., Zheng, X., & Kolter, R. (2017). Simplified and representative bacterial community of maize roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(12), E2450–E2459. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616148114>
- O. Möhler, P. J. DeMott, G. Vali, and Z. L. (2007). Microbiology and atmospheric processes : the role of biological particles in cloud physics To cite this version : Biogeosciences Microbiology and atmospheric processes : the role of biological particles in cloud physics. *Biogeosciences*, 4(6), 1059–1071. Retrieved from citeulike-article-id:11675043%0Ahttp://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-36749068452&#38%0ApartnerID=40&%2338%0Amd5=8dbebd672064def2e58197421aff1b02
- O’Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). *Flagellar and twitching motility are necessary for.pdf*. 30, 295–304.
- O’Toole, G. A., & Wong, G. C. (2016). *Sensational biofilms: surface sensing in bacteria*. (1994), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.02.004>. Sensational
- Oliveira, F., Lima, C. A., Brás, S., França, Â., & Cerca, N. (2015). Evidence for inter- and intraspecies biofilm formation variability among a small group of coagulase-negative staphylococci. *FEMS Microbiology Letters*, 362(20), 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv175>
- Orcutt, B. N., Sylvan, J. B., Knab, N. J., & Edwards, K. J. (2011). Microbial Ecology of the Dark Ocean above, at, and below the Seafloor. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(2), 361–422. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00039-10>
- Parshukov, A. N., Kashinskaya, E. N., Simonov, E. P., Hlunov, O. V., Izvekova, G. I., Andree, K. B., & Solovyev, M. M. (2019). Variations of the intestinal gut microbiota of farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), depending on the infection status of the fish. *Journal of Applied Microbiology*, jam.14302. <https://doi.org/10.1111/jam.14302>
- Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A., & Dewhirst, F. E. (2006). The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, 42(1), 80–87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00174.x>
- Patterson, E., Cryan, J. F., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Dinan, T. G., & Stanton, C. (2014). Gut microbiota, the pharmabiotics they produce and host health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 760(September 2014), 477–489. <https://doi.org/10.1017/S0029665114001426>



- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R. A., Del Cerro, P., Espuny, M. R., Jiménez-Guerrero, I., ... Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*, *169*(5–6), 325–336. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
- Persat, A, Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A., & Gitai, Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(24), 7563–7568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502025112>
- Persat, Alexandre, Nadell, C. D., Kim, M. K., Ingremeau, F., Siryaporn, A., Drescher, K., ... Stone, H. A. (2015). The Mechanical World of Bacteria. *Cell*, *161*(5), 988–997. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.005>
- Peyyala, R., Kirakodu, S. S., Ebersole, J. L., & Novak, K. F. (2011). Novel model for multispecies biofilms that uses rigid gas-permeable lenses. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(10), 3413–3421. <https://doi.org/10.1128/AEM.00039-11>
- Plamont, M.-A., Billon-Denis, E., Maurin, S., Gauron, C., Pimenta, F. M., Specht, C. G., ... Gautier, A. (2015). Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(3), 497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
- Plamont, M. A., Billon-Denis, E., Maurin, S., Gauron, C., Pimenta, F. M., Specht, C. G., ... Gautier, A. (2016). Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(3), 497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113> [pii]
- Planchon, S., Desvaux, M., Chafsey, I., Chambon, C., Leroy, S., Hébraud, M., & Talon, R. (2009). Comparative subproteome analyses of planktonic and sessile staphylococcus xylosus C2a: New insight in cell physiology of a coagulase-negative staphylococcus in biofilm. *Journal of Proteome Research*, *8*(4), 1797–1809. <https://doi.org/10.1021/pr8004056>
- Poirier, S., Madigou, C., Bouchez, T., & Chapleur, O. (2017). Improving anaerobic digestion with support media: Mitigation of ammonia inhibition and effect on microbial communities. *Bioresource Technology*, *235*, 229–239. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.099>
- Poncet, S., Bernard, C., Dervyn, E., Cayley, J., Klier, A., & Rapoport, G. (1997). Improvement of *Bacillus sphaericus* toxicity against dipteran larvae by integration, via homologous recombination, of the Cry11A toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(11), 4413–4420.
- Raghupathi, P. K., Liu, W., Sabbe, K., Houf, K., Burmølle, M., & Sørensen, S. J. (2018). Synergistic interactions within a multispecies biofilm enhance individual species protection against grazing by a pelagic protozoan. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02649>
- Ren, D., Madsen, J. S., Sorensen, S. J., & Burmolle, M. (2015). High prevalence of biofilm synergy among bacterial soil isolates in cocultures indicates bacterial interspecific cooperation. *ISME*

*J*, 9(1), 81–89. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.96>

- Reynolds, O. (1894). On the Dynamical Theory of Incompressible Viscous Fluids and the Determination of the Criterion. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 186(0), 40–45. <https://doi.org/10.1098/rsta.1895.0004>
- Rickard, A H, Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., & Handley, P. S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol*, 11(2), 94–100. <https://doi.org/S0966842X02000343> [pii]
- Rickard, Alexander H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., & Handley, P. S. (2003). Bacterial coaggregation: An integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 11(2), 94–100. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)00034-3)
- Rinaudi, L. V., & Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiology Letters*, 304(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01840.x>
- Robert E. Blankenship and Martin F. Hohmann-Marriott. (2011). Evolution of photosynthesis. *New Comprehensive Biochemistry*, 15(C), 343–350. [https://doi.org/10.1016/S0167-7306\(08\)60146-5](https://doi.org/10.1016/S0167-7306(08)60146-5)
- Rochex, A., Godon, J. J., Bernet, N., & Escudie, R. (2008). Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. *Water Res*, 42(20), 4915–4922. [https://doi.org/S0043-1354\(08\)00412-0](https://doi.org/S0043-1354(08)00412-0) [pii]10.1016/j.watres.2008.09.015
- Rupp, C. J., Fux, C. A., & Stoodley, P. (2005). Viscoelasticity of *Staphylococcus aureus* biofilms in response to fluid shear allows resistance to detachment and facilitates rolling migration. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2175–2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2175-2178.2005>
- Sanchez-Vizueté, P., Le Coq, D., Bridier, A., Herry, J. M., Aymerich, S., & Briandet, R. (2015). Identification of ypqP as a New *Bacillus subtilis* biofilm determinant that mediates the protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial agents in mixed-species communities. *Appl Environ Microbiol*, 81(1), 109–118. <https://doi.org/10.1128/AEM.02473-14>
- Sanchez-Vizueté, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., & Briandet, R. (2015). Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front Microbiol*, 6, 705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00705>
- Sansonetti, P. (n.d.). *L' Union Fait La Force : Les Biofilms*. (2).
- Sarmiento, M. R. A., Paula, T. O. de, Borges, F. M., Ferreira-Machado, A. B., Resende, J. A., Moreira, A. P. B., ... Diniz, C. G. (2019). *Obesity, Xenobiotic Intake and Antimicrobial-Resistance Genes in the Human Gastrointestinal Tract: A Comparative Study of Eutrophic, Overweight and Obese Individuals*.
- Segev, E., Wyche, T. P., Kim, K. H., Petersen, J., Ellebrandt, C., Vlamakis, H., ... Kolter, R. (2016).

- Dynamic metabolic exchange governs a marine algal-bacterial interaction. *ELife*, 5, 1–28. <https://doi.org/10.7554/elife.17473>
- Shen, Y., Siryaporn, A., Lecuyer, S., Gitai, Z., & Stone, H. (2012). Flow Directs Surface-Attached Bacteria to Twitch Upstream. *Biophys J*, 103(1), 146–151. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2012.05.045>
- Sheppard, A. E., Poehlein, A., Rosenstiel, P., Liesegang, H., & Schulenburg, H. (2013). Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 Cry-. *Genome Announcements*, 1(1), 5–6. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00158-12>
- Sheridan, Á., Lenahan, M., Condell, O., Bonilla-Santiago, R., Sergeant, K., Renaut, J., ... Burgess, C. M. (2013). Proteomic and phenotypic analysis of triclosan tolerant verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157: H19. *Journal of Proteomics*, 80, 78–90. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.025>
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2009). Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water Research*, 43(1), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.10.010>
- Soifer, I., Robert, L., & Amir, A. (2016). Single-cell analysis of growth in budding yeast and bacteria reveals a common size regulation strategy. *Current Biology*, 26(3), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.067>
- Soren Moller, Anne R. Pedersen, Lars K. Poulsen, Erik Arvin, and S. M. (1996). *Activity and Three-Dimensional Distribution of Toluene-Degrading*. 62(12), 4632–4640.
- Stewart, P. S. (2012). Mini-review: Convection around biofilms. *Biofouling*, 28(2), 187–198. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.662641>
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276), 135–138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol*, 9(5), 222–227. [https://doi.org/S0966-842X\(01\)02012-1](https://doi.org/S0966-842X(01)02012-1) [pii]
- Syverud, K., Chinga, G., Johnsen, P. O., Leirset, I., & Wiik, K. (2007). Analysis of lint particles from full-scale printing trials. *Appita Journal*, 60(4), 286–290.
- Takai, K., Campbell, B. J., Cary, S. C., Suzuki, M., Oida, H., Nunoura, T., ... Horikoshi, K. (2005). Enzymatic and genetic characterization of carbon and energy metabolisms by deep-sea hydrothermal chemolithoautotrophic isolates of Epsilonproteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7310–7320. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7310-7320.2005>
- Tan, C. H., Lee, K. W. K., Burmølle, M., Kjelleberg, S., & Rice, S. A. (2017). All together now: experimental multispecies biofilm model systems. *Environmental Microbiology*, 19(1), 42–53. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13594>
- Thomas, W. E., Nilsson, L. M., Forero, M., Sokurenko, E. V., & Vogel, V. (2004). Shear-dependent

- “stick-and-roll” adhesion of type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 53(5), 1545–1557. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04226.x> [pii]
- Thomas, W. E., Vogel, V., & Sokurenko, E. (2008). Biophysics of catch bonds. *Annu Rev Biophys*, 37, 399–416. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.37.032807.125804>
- Thomen, P., Robert, J., Monmeyran, A., Bitbol, A. F., Douarche, C., & Henry, N. (2017). Bacterial biofilm under flow: First a physical struggle to stay, then a matter of breathing. *PLoS ONE*, 12(4), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175197>
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
- Utada, A. S., Bennett, R. R., Fong, J. C. N., Gibiansky, M. L., Yildiz, F. H., Golestanian, R., & Wong, G. C. L. (2014). *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nature Communications*, 5, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms5913>
- Valm, A. M., Welch, J. L. M., Rieken, C. W., Hasegawa, Y., Sogin, M. L., Oldenbourg, R., ... Borisy, G. G. (2011). Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(10), 4152–4157. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101134108>
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2013). Insights into regulation of protein abundance from proteomics and transcriptomics analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/nrg3185>
- Walker, J. J., Spear, J. R., & Pace, N. R. (2005). Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment. *Nature*, 434(7036), 1011–1014. <https://doi.org/10.1038/nature03447>
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, Vol. 171, pp. 964–967. <https://doi.org/10.1038/171964b0>
- Whitfield, M. J., Luo, J. P., & Thomas, W. E. (2014). Yielding Elastic Tethers Stabilize Robust Cell Adhesion. *PLoS Computational Biology*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003971>
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: the unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6578–6583. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9618454> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC33863>
- Wingender, J., & Jaeger, K.-E. (2003). Extracellular Enzymes in Biofilms. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/0471263397.env261>
- Woese, C. R. (2005). Q & A. Carl R. Woese. [interview]. *Current Biology: CB*, 15(4), R111-2. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.003>

- Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain The primary kingdoms*. 74(11), 5088–5090.
- Woodward W. Fischer, James Hemp, and J. E. J. (2016). Evolution of Oxygenic Photosynthesis. *Annual Review Of Earth and Planetary Sciences*, 26–40. <https://doi.org/10.1515/9781400849888-005>
- Xavier, J. B., & Foster, K. R. (2007). Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), 876–881. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17210916](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17210916)
- Xiong, J., & Bauer, C. E. (2002). Complex Evolution of Photosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1), 503–521. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135212>
- Yun, J. H., Roh, S. W., Jung, M. J., Kim, M. S., Park, E. J., Shin, K. S., ... Bae, J. W. (2011). *Kocuria salsicia* sp. nov., isolated from salt-fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 286–289. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.021469-0>
- Zhao, K., Tseng, B. S., Beckerman, B., Jin, F., Gibiansky, M. L., Harrison, J. J., ... Wong, G. C. L. (2013). Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 497(7449), 388–391. <https://doi.org/10.1038/nature12155>



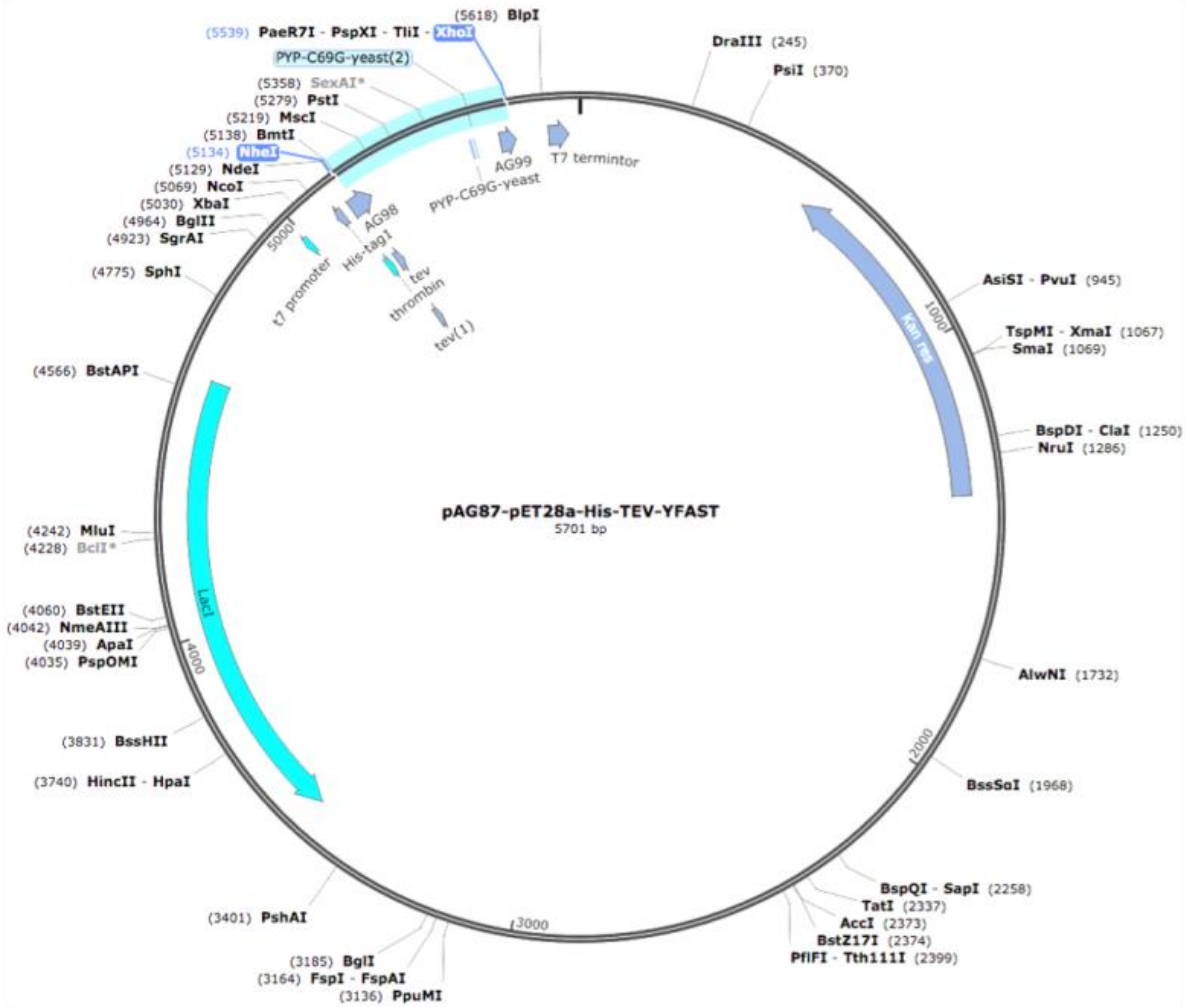


# **ANNEXES**

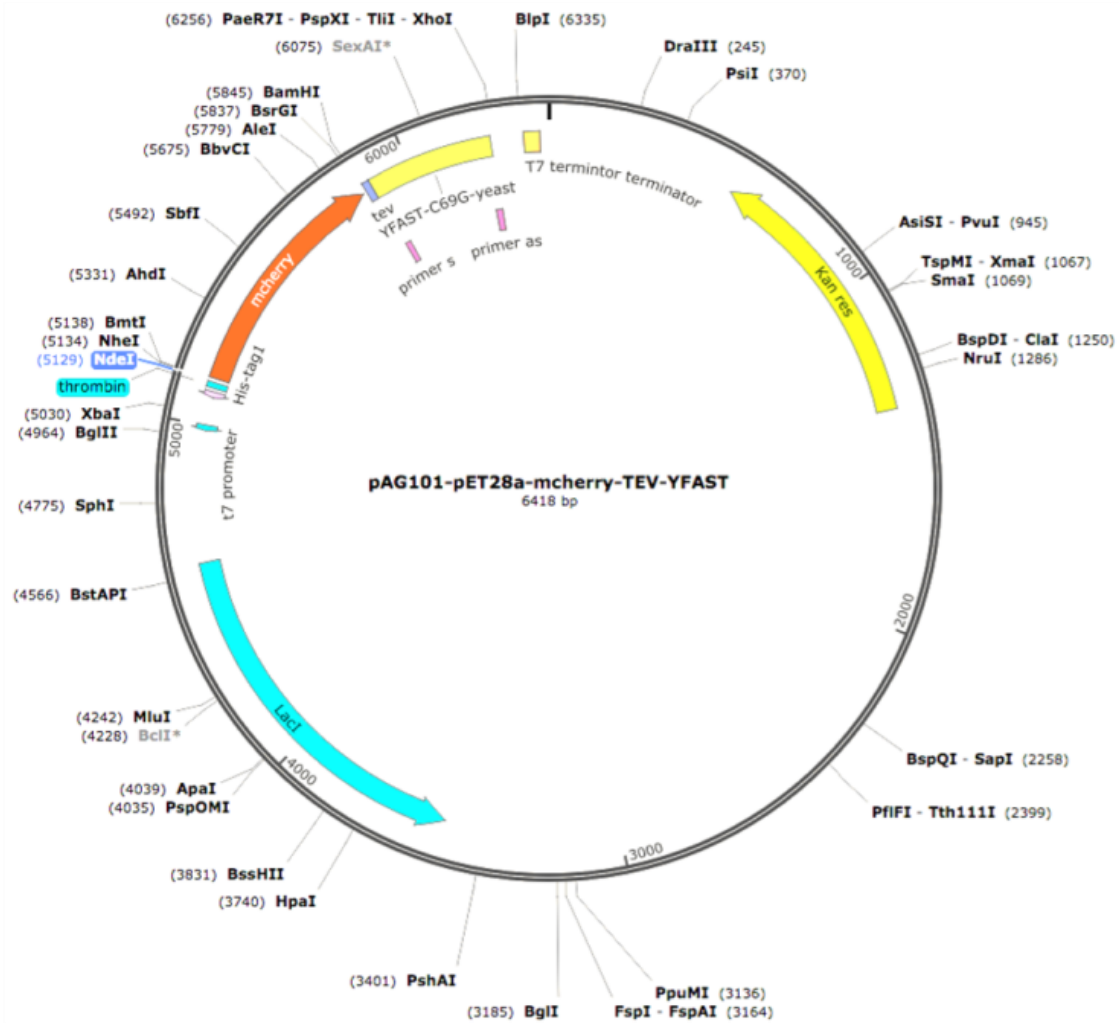


# Annexe A : Plasmides

Plasmide pAG87 – FAST pour *E. coli*



## Plasmide pAG101 – mCherry fusion FAST pour *E.coli*



# Annexe B : Composition des milieux de culture

- ***Escherichia coli***

Les expériences effectuées avec *E.coli* ont été réalisées avec deux milieux. Le premier est le milieu LB (Luria Bertani broth, Sigma), et le second est le milieu minimum M63B1 avec du glucose (Tab. B.1).

	Concentration pour le milieu M63B1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.6 g/L
KOH	4.2 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g/L
FeSO <sub>7</sub> + 7H <sub>2</sub> O	1.08 mg/L
Thiamine	1 mg/L
MgSO <sub>4</sub> + 7H <sub>2</sub> O	246 mg/L
Glucose	0.4 g/L

**Tab. B.1 :** Tableau récapitulatif des composants du milieu M63B1 et leur concentration. Le pH de la solution final est de 7.

- **Communauté 4S**

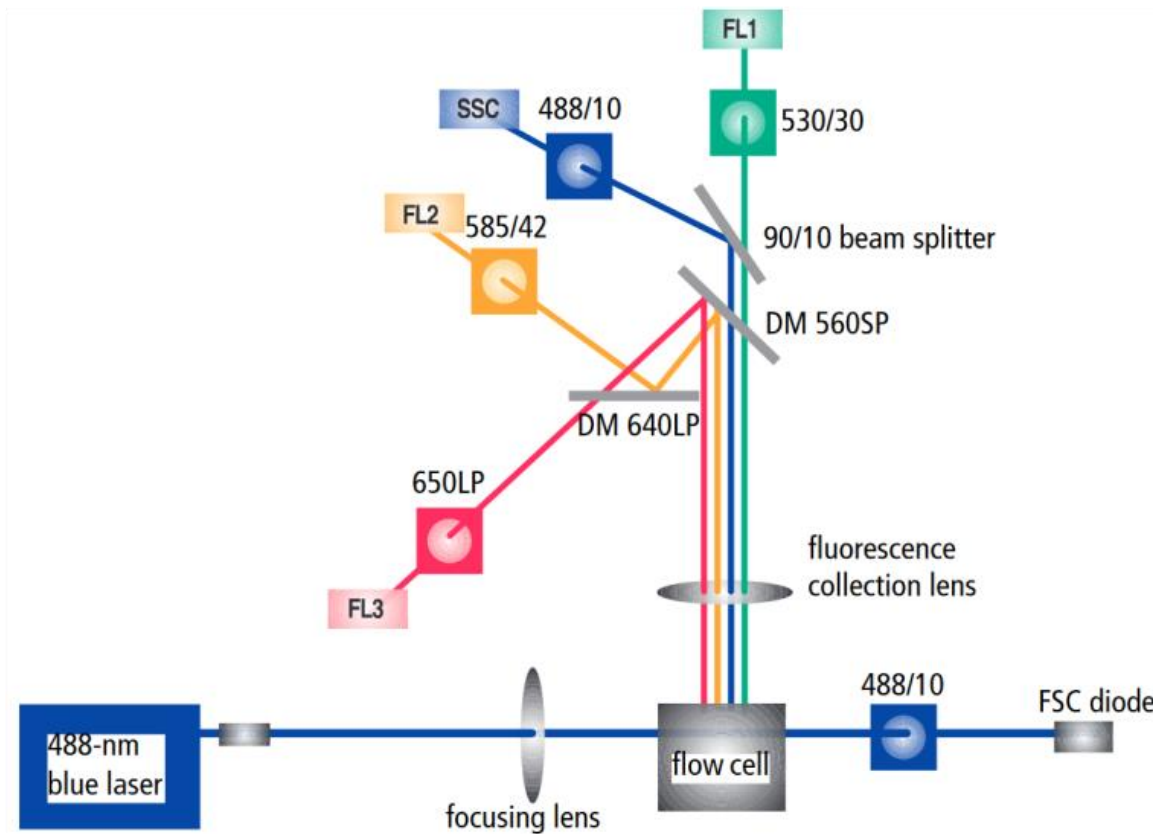
Les milieux M1 et Mb ont été utilisés pour les expériences concernant la communauté 4S, que ce soit pour les cultures planctoniques ou les cultures de biofilm. Les éléments composant ces milieux (Tab. B.2) ont été dilués dans de l'eau milliQ.

	M1	Mb
YNB N5000 without aa	1.7 g/L	1.7 g/L
Ammonium sulfate	5 g/L	5 g/L
Casamino acides	5 g/L	1 g/L
Glucose	10 g/L	0.4 g/L

**Tab. B.2 :** Tableau récapitulatif des composants des milieux M1 et Mb et leur concentration pour chaque milieu.

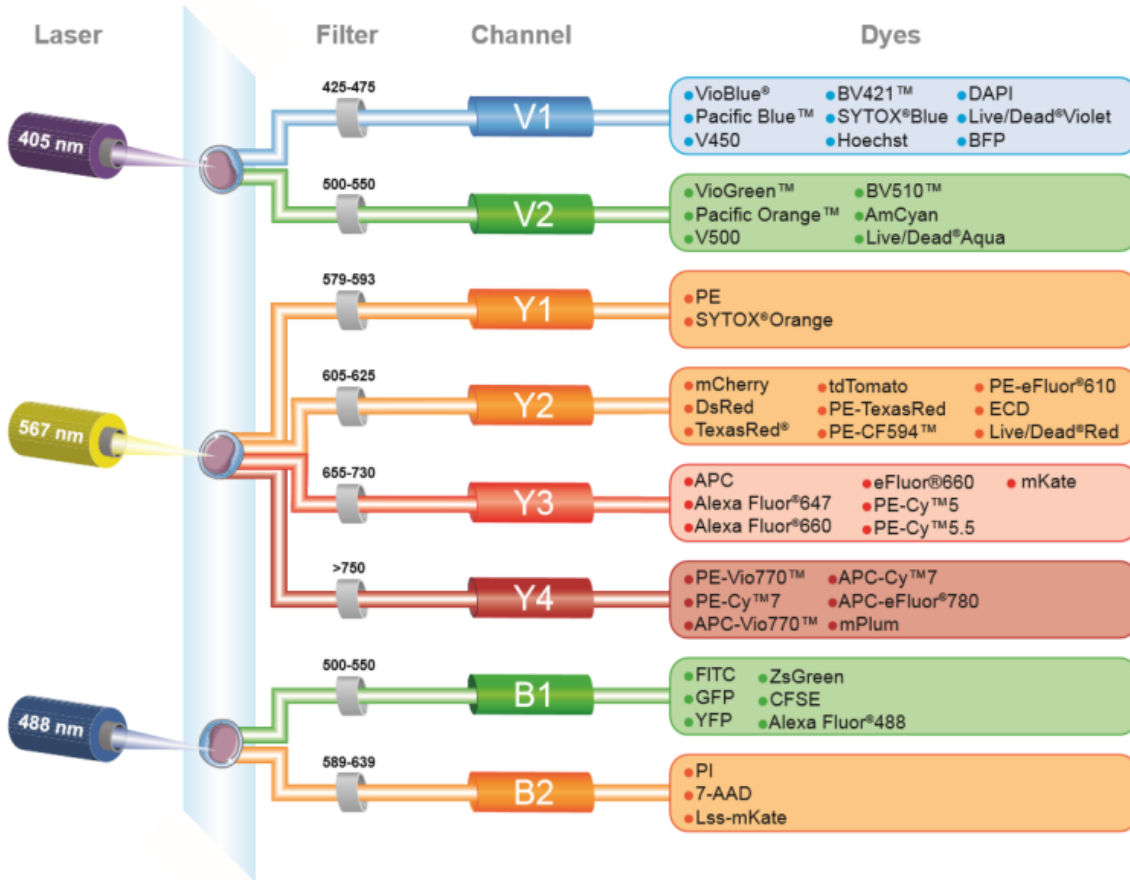
# Annexe C : Configuration des cytomètres

- FACS Calibur



**Fig. C.1 :** Schéma de la configuration de laser et de filtres du FACS Calibur de BDscientifics, fournit par le constructeur.

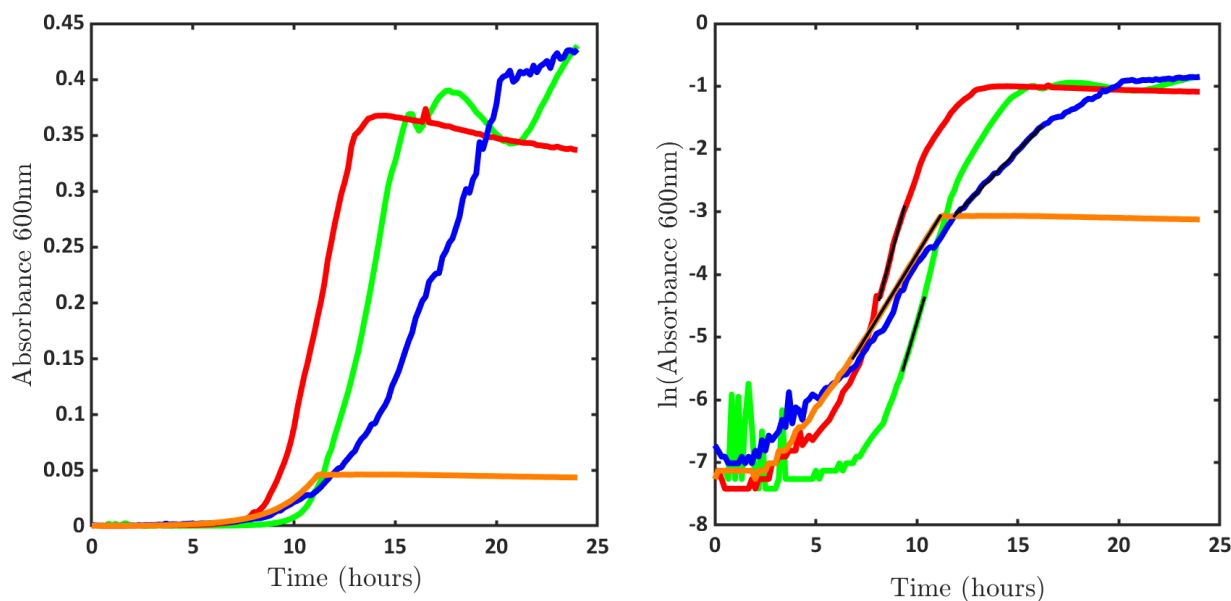
• MACSQuant VYB



**Fig. C.2** : Schéma de la configuration de lasers et de filtres du MACSQuant VYB de Miltenyi Biotech, fournit par le constructeur.

# Annexe D : Temps de doublement des populations en condition de cultures planctoniques en Mb à 30°C

Pour obtenir les temps de doublement de nos espèces de la communauté 4S, nous avons fait des cultures planctoniques de 1mL de Mb à 30°C dans des plaques de 48 puits (48 Well plate transparent flat bottom Greiner). Nous avons mesuré l'absorbance à 600nm de ces puits toutes les 10 minutes durant 24h suivant le protocole présenté dans la partie II.4.A. Nous avons tracé les données ainsi obtenues en fonction du temps en soustrayant la contribution du milieu (fig. D.1-1). Nous avons ensuite tracé les logarithmes népériens de ces mêmes données (fig. D.1-2) afin de déterminer les zones de croissance linéaire et ainsi obtenir le temps de doublement de chaque espèce. Ces résultats sont résumés Tab. D.1.

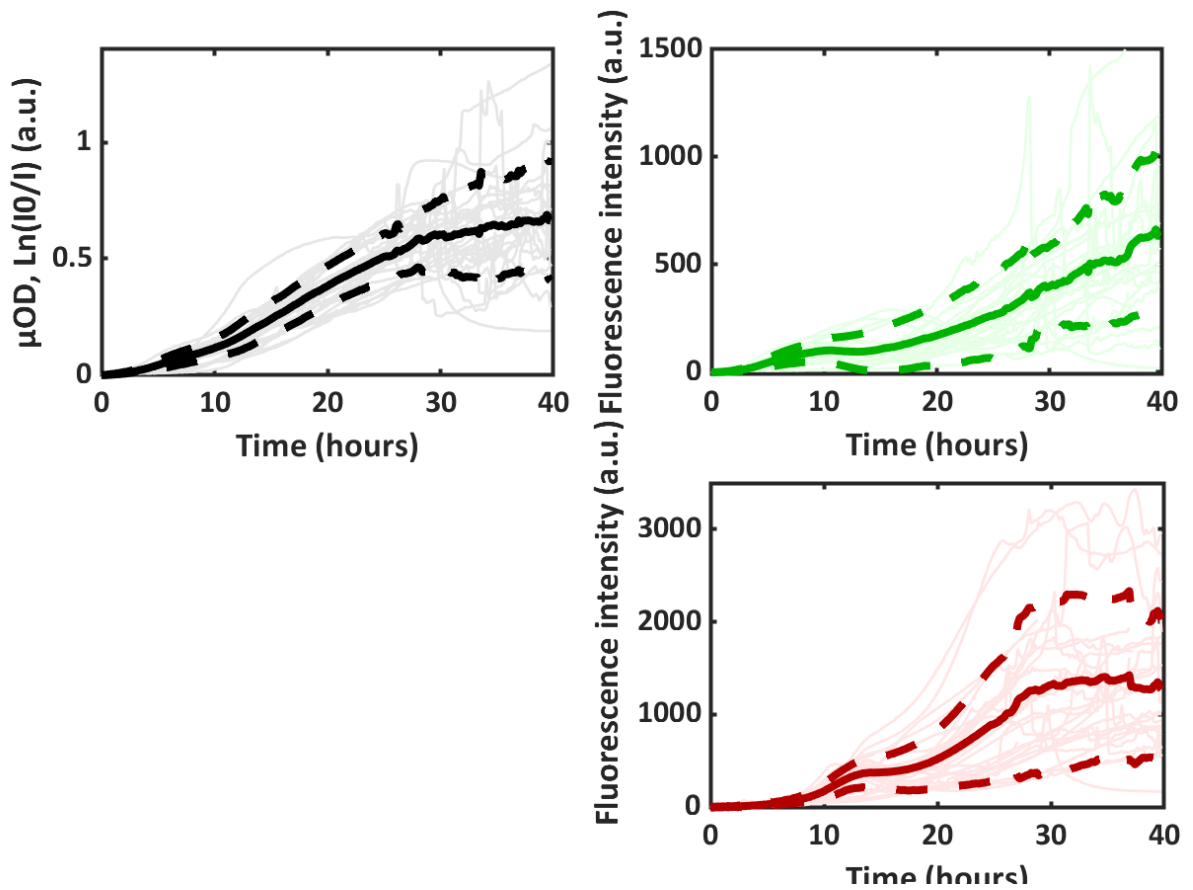


**Fig. D.1 :** 1) Courbes de cinétique type de l'absorbance à 600nm en fonction du temps de bactéries de la communauté 4S en cultures planctoniques en Mb à 30°C. En vert, *Bacillus thuringiensis* ; en bleu, *Kocuria salsicia* ; en rouge, *Pseudomonas fluorescens* ; en orange, *Rhodocyclus sp.* 2) Courbes des logarithmes népériens de ces mêmes courbes de cinétique type, en fonction du temps, de bactéries de la communauté 4S en cultures planctoniques en Mb à 30°C. La code couleur est le même. Les barres noires représentent les zones de croissance linéaire.

	Moyenne (minutes)	Ecart-type (minutes)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	38.22	7.76
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	47.46	6
<i>Kocuria salsicia</i>	141.5	28.93
<i>Rhodocyclus sp.</i>	101.39	14.97

**Tab. D.1 :** Tableau récapitulatif des temps de doublement moyen (20 expériences) pour chaque espèce de la communauté 4S, et leur écart-type.

# Annexe E : Data biofilms 4S complètes



**Fig. E.1 :** Courbes de cinétique de toutes les expériences de biofilms 4S de la  $\mu\text{OD}$  (1), de l'intensité de fluorescence du complexe FAST : HBR (2) et de l'intensité de fluorescence de la mCherry (3). Les courbes pleines en gras représentant la moyenne de ces expériences, et les courbes pointillées en gras les bornes des écart-types de ces moyennes.