



**HAL**  
open science

# Distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> en biofilm bactérien multiespèces

Wafa Ben Youssef

► **To cite this version:**

Wafa Ben Youssef. Distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> en biofilm bactérien multiespèces. Biophysique. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS082 . tel-03871026

**HAL Id: tel-03871026**

**<https://theses.hal.science/tel-03871026v1>**

Submitted on 25 Nov 2022

**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.

# Sorbonne Université

**Thèse de doctorat**

École doctorale de Chimie physique et Chimie Analytique de Paris-Centre

*Laboratoire Jean Perrin*

## **Distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> en biofilm bactérien multi-espèces**

*Présentée par*

**Wafa Ben Youssef**

Dirigée par Nelly Henry

Codirigée par Arnaud Gautier

*Présentée et soutenue publiquement le 24 Mai 2022*

**Devant un jury composé de :**

M. BRIANDET Romain : Rapporteur

M. BOUCHEZ Théodore : Examineur

Mme DOUARCHE Carine : Examinatrice

M. ESPELI Olivier : Rapporteur

M. GAUTIER Arnaud : Co-directeur de thèse

Mme HENRY Nelly : Directrice de thèse

M. LAMI Raphael : Examineur



*Dédicace*

À moi, à la petite Wafa qui a tant grandi pendant les 5 dernières années

À ma maman, sans toi je ne serais pas là où je suis

À la meilleure directrice de thèse, merci pour tout

À tout tous ceux qui tiennent toujours à moi

Au LJP, merci

# Remerciements

Après plus de trois années passées au laboratoire Jean Perrin, avec une pandémie au milieu, le temps est maintenant venu de clôturer ce beau chapitre pour en ouvrir d'autres avec beaucoup d'ambition et d'enthousiasme. Mais avant cela je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont aidée et soutenue.

Tout d'abord, je commence par remercier Théodore Bouchez, Carine Douarche, et Raphaël Lami, membres de mon jury, d'avoir accepté d'examiner mon travail et l'ont enrichi par leurs remarques. Merci en particulier à Romain Briandet et Olivier Espeli qui ont pris le temps de relire et rapporter ma thèse dans le détail.

Ensuite, je tiens à remercier ma directrice de thèse Nelly Henry, qui m'a tant appris scientifiquement et humainement. Merci pour sa disponibilité et la qualité de nos discussions scientifiques. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé ce degré de liberté dans l'organisation et le développement des projets tout en me guidant pendant ces presque 4 années de thèse sans stress ni pression. Merci pour sa gentillesse, son soutien et sa bienveillance. Je remercie ensuite Franck Sureau pour toutes les connaissances en temps de vie de fluorescence, toute l'aide à la mise en place et le développement du dispositif expérimental. Un grand merci à Maxime Deforet pour ses efforts afin de réussir la partie interfaçage, ainsi que le développement mathématique et la modélisation. Merci pour ses conseils et son encouragement. Merci à Thomas Panier pour ses compétences en optique et son temps précieux. Je remercie Arnaud Gautier, mon co-directeur, en premier lieu pour sa collaboration, son soutien et pour toutes les discussions autour de son système de protéines fluorescentes inductibles FAST. Merci également à nos collaborateurs de l'INRA Stéphane Aymerich, Aurélie Baliarda, Mathieu Jules, pour les échanges surtout au début du projet. Merci aussi à toute l'équipe de Vincent Sauveplane pour son accueil et son aide lors de nos expériences de biologie moléculaire effectuées à l'INRA.

Je voudrais aussi remercier tous les collaborateurs du laboratoire Jean Perrin. Merci aux anciens du LJP Lydia Robert et Marina Elez pour leurs conseils en microbiologie. Merci à Nicolas Biais, Nicolas Fix-Boulier, pour m'avoir aidée à améliorer ma soutenance de thèse. Merci à Clément Nizak, pour sa gentillesse et les conversations que nous avons eues même après la soutenance. Merci à Sergei Kruglik pour son éclairage portant sur l'optique et

l'électronique. Merci à Raphael Voituriez pour sa collaboration sur la partie théorique. Merci aussi à Malika Pierrat et Anissa Zerouklane pour le support administratif, leur disponibilité pendant les urgences et tous leurs efforts pour faciliter la vie des étudiants du laboratoire. Merci aussi pour toutes les longues discussions de vie. Merci à Marie-Nicole Colonnelle, maintenant à la retraite. J'adresse aussi un grand merci à Didier Chatenay, créateur du laboratoire et premier directeur, qui a su créer une ambiance de bonne humeur et de cohésion, non hiérarchique permettant un échange scientifique efficace et enrichissant. Merci pour tous les encouragements et l'attention accordés aux étudiants. Je remercie également Georges Debrégeas, l'actuel directeur du laboratoire, pour avoir maintenu parfaitement cet environnement de travail épanouissant.

Un grand merci à tous les thésards et post-doctorants, qui ont contribué à l'installation d'une atmosphère coopérative et joyeuse au laboratoire Jean Perrin. Je remercie particulièrement Nidia Maldonado-Carmona et Vui Yin Seow pour leur soutien et aide à l'amélioration de ma soutenance. Un grand merci à Amaury Monmeyran avec qui ce projet a commencé pour l'encadrement et l'aide. Je remercie tous les anciens doctorants et post-doctorants du LJP, pour tous les moments d'échange partagés.

Je souhaiterais aussi remercier ma famille. Tout d'abord merci à mes parents, qui m'ont appris à tout donner et aimer ce que je fais. Merci pour la confiance, l'éducation et l'amour qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Merci pour tous les sacrifices et les leçons de vie. Merci à ma sœur Safa, toujours présente pour moi et pour qui je serai toujours là aussi. Merci à mon petit frère qui a réussi toujours à apporter du sourire. Je remercie ma sœur de destin, ma chère amie Marwa, merci pour tout, tu as été une famille pour moi pendant ces années.

Je voudrais remercier une belle personne qui se reconnaîtra en lisant ces mots. Merci d'être entré dans ma vie pendant une période critique, merci de m'accepter comme je suis. Merci pour l'amour et le soutien inconditionnel malgré toutes les complications de la vie. Tous les mots ne décriront pas ma reconnaissance envers tes efforts pour me rendre heureuse.

Pour conclure cette partie, Merci à toute personne ayant planté une fleur dans le jardin de ma vie. A l'avenir, je suis prête !

# Sommaire

<b>Introduction .....</b>	<b>7</b>
<b>Chap. 1. Etat de l'Art, Système d'étude &amp; Objectifs .....</b>	<b>11</b>
I. Étude bibliographique .....	11
1. Histoire des communautés adhérentes .....	11
2. Biofilms dans la nature .....	15
3. Mécanismes de formation .....	21
4. Propriétés spécifiques du biofilm.....	24
5. L'oxygène dans le biofilm .....	31
6. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy: FLIM.....	35
II. Modèle d'étude .....	38
1. Présentation du modèle .....	38
2. Mécanismes de formation .....	39
III. Objectifs et Stratégies .....	40
<b>Chap. 2. Matériels, méthodes et développements instrumentaux.....</b>	<b>43</b>
I. Souches, milieux et cultures.....	43
1. Souches .....	43
2. Fluorescence dans les biofilms et construction de souches 'FAST' .....	46
3. Milieux & cultures .....	46
II. Cytométrie en flux .....	47
III. Croissance bactérienne en multi-plaques (Tecan) .....	48
IV. Dispositif millifluidique : Formation du biofilm .....	48
V. FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy .....	51
1. Principe de la mesure fréquentielle.....	51
2. Mesure dans le biofilm : Détails techniques .....	53
VI. Dispositif expérimental.....	54
1. Contrôle de température et de l'O <sub>2</sub> .....	55
2. Microscope.....	55
3. Montage électronique.....	55
4. Montage optique – Nappe Laser .....	57
VII. Mesure de la concentration en O <sub>2</sub> .....	61
1. Principe de l'utilisation des micelles de ruthénium (MiRu) .....	61
2. Préparation des micelles de ruthénium .....	61
3. Calibration de la sonde.....	62
VIII. Microscopie épifluorescence .....	64
IX. Automatisation des acquisitions des données de temps de vie de fluorescence.....	64
<b>Chap. 3. Transferts de l'oxygène dans un canal millifluidique sous flux....</b>	<b>67</b>
I. Caractérisation des dynamiques d'échange d'oxygène en régime stationnaire .....	67
1. Variation de l'oxygène environnemental en cuve ouverte .....	67
2. Variation de l'O <sub>2</sub> environnemental en canal de PDMS en absence de flux.....	74
II. Apport du flux en Oxygène .....	77
<b>Chap. 4. Suivi de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> d'un biofilm bactérien multi-espèces en cours de développement.....</b>	<b>81</b>
I. Mise en place de la mesure .....	81
II. Distribution spatio-temporelle 3D de l'O <sub>2</sub> d'un biofilm bactérien.....	83
1. Gradients d'O <sub>2</sub> au cours du temps .....	84

2.	Distributions spatio-temporelles comparées du biofilm 4S et de l'oxygène dans le canal.....	87
III.	Profils spatio-temporels individuels .....	95
1.	Biofilm de <i>Bt</i> mono-espèce.....	96
2.	Biofilm de <i>Pf</i> mono-espèce.....	97
IV.	Conclusion : .....	98
	<b>Chap. 5. Colonisation de la communauté adhérente bactérienne 4 espèces par un cinquième élément, <i>E. coli</i>.....</b>	<b>101</b>
	<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>138</b>
	<b>Bibliographie.....</b>	<b>140</b>
	<b>Annexes 147</b>	
	Annexe A : Fluorescence dans les biofilms et construction de souches 'FAST' .....	147
1.	Le problème de la fluorescence dans les biofilms .....	147
2.	Transformations chez <i>E. coli</i> .....	148
3.	Fluorescence chez <i>P. fluorescens</i> .....	153
	Annexe B : composition des milieux M1, MB, et M1 Agar .....	160
	Annexe C : Configuration du laser et des filtres du FACS Calibur .....	161
	<b>Table des illustrations .....</b>	<b>165</b>
	<b>Table des tableaux.....</b>	<b>171</b>





# Introduction

La vie sur terre date d'au moins 3,5 milliards d'années<sup>1</sup> et les fossiles montrent que les micro-organismes étaient déjà là depuis au moins 2,8 milliards d'années<sup>2</sup>. Du désert au pôle nord, des sommets des montagnes aux profondeurs des océans les micro-organismes sont partout<sup>3</sup> et présentent une diversité colossale en forme, taille (quelques micromètres à quelques dizaines de micromètres) et propriétés métaboliques. Cette existence massive fut ignorée par l'humanité pendant des siècles. Invisible à l'œil nu, cependant leur effet est visible sur l'écosystème, la santé humaine et l'industrie. Ces micro-organismes sont pour la plupart organisés en communautés multi-espèces complexes hautement interdépendantes. Derrière cette complexité d'origine, de structure et de comportement, ces communautés partagent un certain nombre de mécanismes communs, notamment les mécanismes qui les façonnent.

Quand Edgar Morin décrit la notion de la complexité, il dit : « Quand je parle de complexité, je me réfère au sens latin élémentaire du mot "complexus", "ce qui est tissé ensemble". Les constituants sont différents, mais il faut voir comme dans une tapisserie la figure d'ensemble. » 'La stratégie de reliance pour l'intelligence de la complexité, Revue internationale de systémique, vol. 9, n°2, 1995'

L'objectif global dans notre groupe est d'étudier, sur la base d'un modèle expérimental pertinent, le processus de formation de ces communautés composites dites « biofilms » et les mécanismes qui gouvernent les interactions inter-espèces. La stratégie générale cherche à dégager des lois générales et à comprendre les principes de base du fonctionnement de ces systèmes complexes, en particulier à établir les relations causales qui lient les propriétés physico-chimiques et les fonctions biologiques. Un modèle de biofilm multi-espèces simplifié a été mis au point suite à son extraction d'un milieu naturel (industrie laitière) par nos collaborateurs à l'institut MICALIS INRAE<sup>4 5</sup>. Une communauté adhérente à 4 espèces a été installée dans un canal millifluidique en PDMS sous flux continu de nutriments. Le flux contrôlé et la géométrie bien déterminée permettent de suivre son développement en temps réel.

La caractérisation de ce consortium a mis en évidence des interactions inter-espèces qui influencent et façonnent cette communauté<sup>6 7</sup>. Les cinétiques de développement des différentes espèces ont révélé des temps caractéristiques et des phases de changement de niche ainsi que de transition spatiale. Parmi ces évènements, plusieurs indices nous ont orientés vers la question

de la dynamique de l'O<sub>2</sub> dans ce système. Dans le but d'étudier le rôle de l'O<sub>2</sub> dans les lois générales qui régissent la formation des biofilms multi-espèces, j'ai entrepris dans ce présent travail de thèse d'établir la cartographie spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> au sein de ce biofilm multi-espèces modèle en développement ainsi que de son environnement. Sur la base des éclaircissements apportés à une meilleure compréhension du modèle, j'ai également initié l'analyse d'une perturbation de ce biofilm en étudiant son invasion par une cinquième espèce.

Mes conclusions m'amènent à souligner le rôle majeur de la dynamique spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> dans le développement de ces communautés.

Ce manuscrit de thèse s'organise comme suit :

Dans le chapitre 1, nous présentons un état de la connaissance de ces communautés attachées et de leurs propriétés intrinsèques. Nous y décrivons également plus précisément le modèle biofilm que nous utilisons.

Puis au chapitre 2, nous donnons le détail de nos méthodes en particulier celle de cartographie de l'O<sub>2</sub>. Brièvement elle consiste à utiliser une sonde fluorescente dont le rendement quantique dépend du taux d'O<sub>2</sub>, encapsulée dans des micelles. Une mesure *in situ* non destructive a été installée impliquant une nappe laser permettant d'élaborer une cartographie tridimensionnelle de l'O<sub>2</sub> sur l'ensemble du canal, aussi bien dans les zones occupées par le biofilm que sur les zones libres parcourues par le flux de milieu.

Le chapitre 3 présente une série d'expériences de caractérisation de la dynamique du flux et des temps de réponse caractéristiques visant à mieux comprendre les étapes clés de la circulation de l'O<sub>2</sub> dans les canaux millifluidiques sous flux en absence du biofilm. L'objectif est d'établir la compatibilité des temps caractéristiques avec les temps biologiques du biofilm dans les conditions de l'expérience.

Le chapitre 4 est entièrement consacré à la cartographie spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> lors du développement du biofilm depuis son initiation à partir de l'injection de quelques cellules jusqu'à son équilibre dynamique atteint après environ 40h. La détection de l'émergence des gradients d'O<sub>2</sub> et leur mise en relation avec les événements clés du développement phénotypique du biofilm nous amèneront à conclure le rôle crucial de l'O<sub>2</sub> dans le développement de ce modèle.

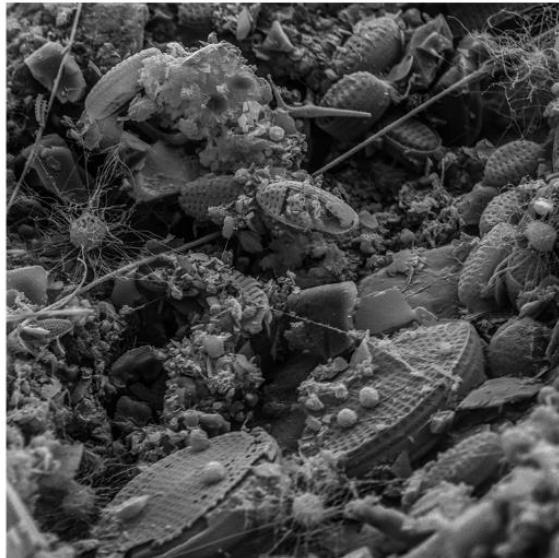
Dans le chapitre 5, nous étudions la capacité d'une cinquième espèce à coloniser le biofilm 4-espèces à différents stades de son développement. Nous discuterons les résultats à la lumière de la cartographie d'O<sub>2</sub> établie au chapitre 4. Ce chapitre 5 consistera en une introduction aux principaux résultats rapportés dans le manuscrit associé à cette partie du travail et ajouté lui-même à ce chapitre.

Enfin, je résumerai mes conclusions et donnerai les perspectives que ce travail m'ait inspiré.



## Chap. 1. Etat de l'Art, Système d'étude & Objectifs

La transition du mode de vie planctonique, vers un mode de vie « attaché » dit biofilm, procure aux membres de la population adhérente, une résistance et une protection contre de nombreux facteurs environnementaux. Le biofilm est une structure tridimensionnelle que les bactéries forment lorsqu'elles adhèrent à une surface. Elles s'y entourent d'une matrice extracellulaire polymère où elles se divisent et perdurent dans un état de densité élevée<sup>8 9</sup>. Ce mode de vie favorable domine le mode de vie planctonique dans la nature, où les biofilms peuvent être formés par des bactéries, des protozoaires et des champignons ainsi que des algues (Fig.1).



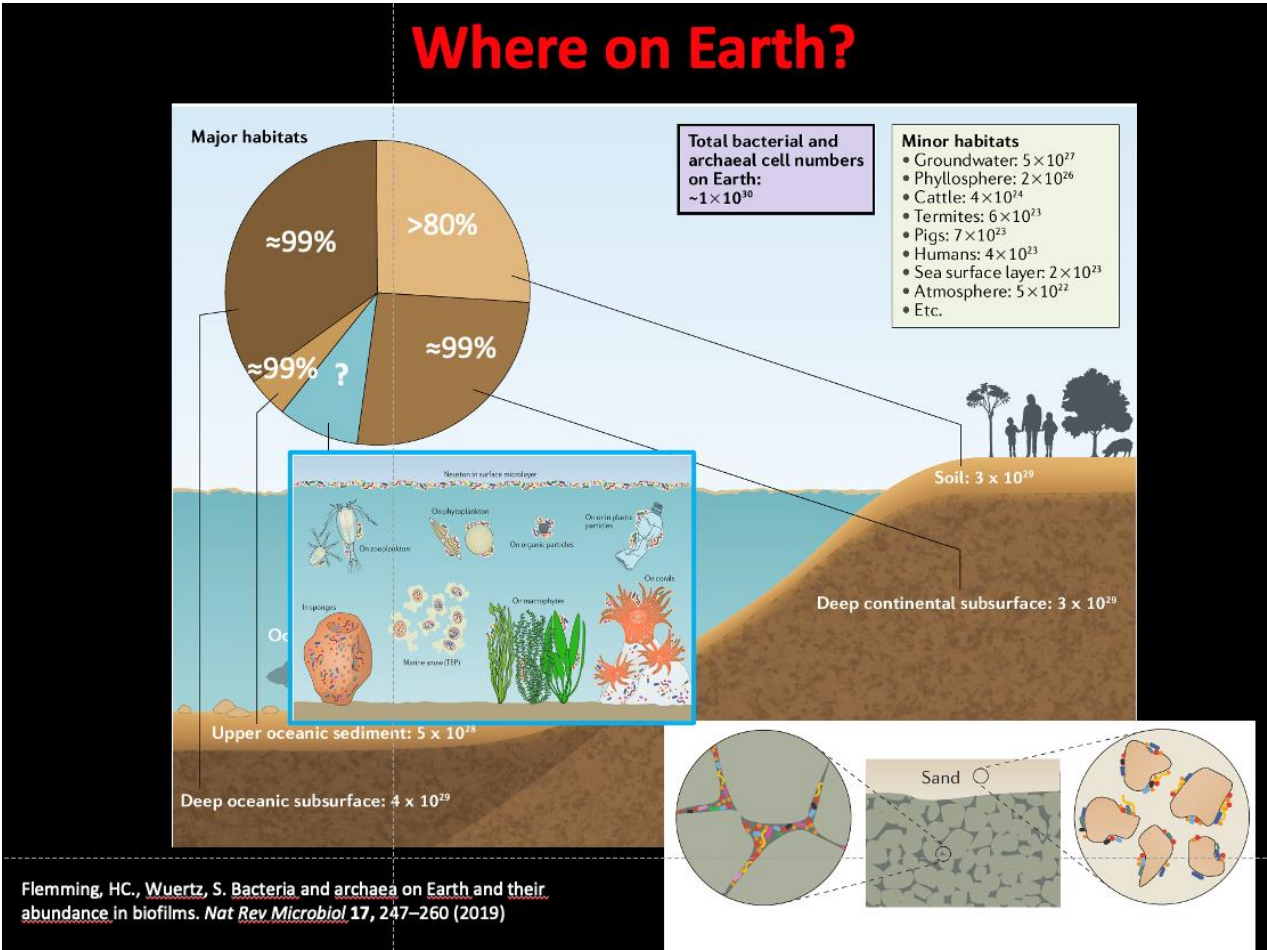
**Figure 1 : Image de microscopie électronique à balayage d'un biofilm marin. D'après S. Chimileski & R. Kolter**

### I. Étude bibliographique

#### 1. Histoire des communautés adhérentes

Les archées et les bactéries sont estimées à  $1.2 \times 10^{30}$  cellules dont les principaux habitats sont le sous-sol océanique profond ( $4 \times 10^{29}$ ), les sédiments océaniques supérieurs ( $5 \times 10^{28}$ ), le sous-sol continental profond ( $3 \times 10^{29}$ ), le sol ( $3 \times 10^{29}$ ) et les océans ( $1 \times 10^{29}$ ) (Fig.2)<sup>3</sup>. Malgré ces estimations récentes qui évaluent cette présence bactérienne à 95% de la biomasse totale de la biosphère terrestre<sup>3 10 11</sup>, le monde bactérien n'est pas facilement visible par l'Homme. 40 à

80% des micro-organismes se trouvent dans la nature sous forme de communautés bactériennes adhérentes dites « biofilms bactériens »<sup>3</sup>.



**Figure 2: Distribution et habitats des micro-organismes sur Terre. D’après Flemming HC et al.<sup>3</sup>**

C’est le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature. Parmi ces biofilms, certains sont parfois si développés qu’il est possible de les voir à l’œil nu sans avoir besoin de matériels scientifiques sophistiqués. Les plus fameux sont les biofilms extrêmophiles, du parc national de Yellowstone aux USA (Fig.3).

Pendant des décennies, l’existence des micro-organismes était ignorée. Au XVI siècle, les premières hypothèses de leur existence sont apportées par l’italien Girolamo Fracastoro (1483-1553), mais sans preuves concrètes. C’est au XVII siècle (1632-1723) qu’Anthony van Leeuwenhoek, un scientifique pionnier danois né à Delft, aux Pays-Bas, a pu observer des micro-organismes grâce à son microscope primitif. Plus précisément il a réussi à observer des biofilms. C’est à partir d’un échantillon de sa salive et plaques dentaires qu’il a décrit des

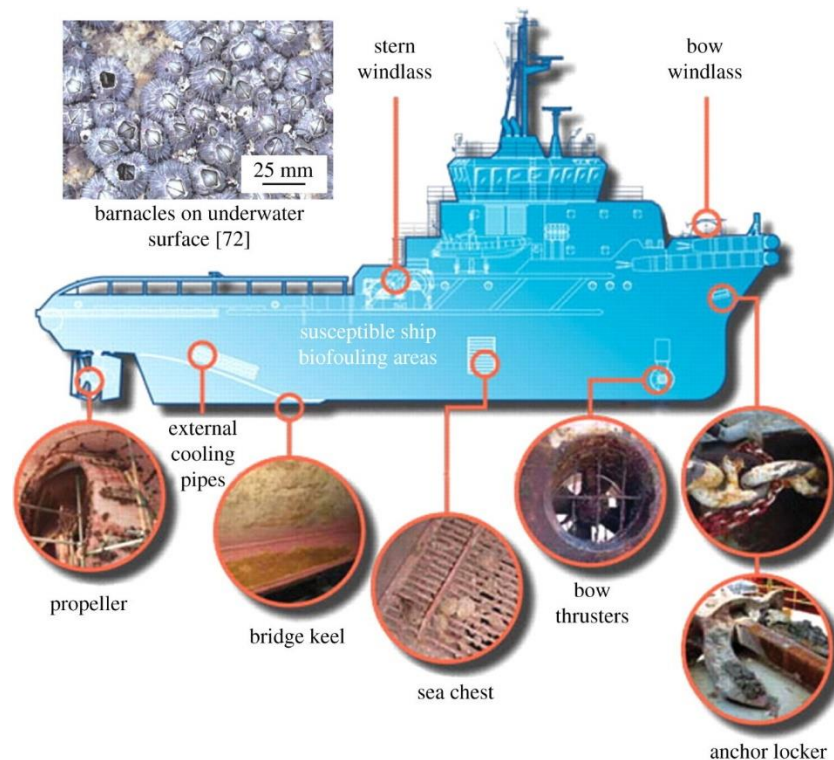
« animalcules ». Ensuite Robert Hooke (1635-1703) a confirmé cette découverte ce qui a anéanti les théories admises à cette époque sur la génération spontanée des organismes.



**Figure 3: Site de source chaude ‘grand prismatic spring’, au parc National de Yellowstone (USA). Biofilm *extrêmophile*.**

Au XIX siècle (1822-1895), en observant que des agrégats de bactéries étaient la cause de la transformation du vin en acide acétique<sup>12</sup>, Louis Pasteur démontra l’existence des micro-organismes dans son mémoire sur la fermentation acétique. C’est là où la microbiologie débutera, entraînant le développement exponentiel des connaissances et des applications. Dans un premier temps, les microbiologistes se sont focalisés sur les micro-organismes en suspension planctonique. À ce stade les communautés adhérentes de micro-organismes dites ensuite « biofilm » n’ont pas suscité de grand intérêt de l’époque. Seule la filière de « biofouling » marine s’intéressait à ce mode de vie bactérien. La fixation et la croissance subséquente d’un assemblage très varié de micro-organismes à l’interface solide-eau telles que les coques des navires et d’autres structures marines immergées causent des dégâts économiques très importants (Fig.4). Ce phénomène est connu sous le nom d’encrassement ou fouling<sup>13</sup>.





**Figure 4: Exemples de bio-encrassement marin<sup>14</sup>.** Zones typiquement sensibles à l'encrassement biologique sur un navire.

La terminologie « film » dans le terme « biofilm » — désigne l'adhérence et l'agrégation sur les surfaces ; il a d'abord été utilisé en microbiologie marine pour distinguer les bactéries attachées des planctoniques (1933-1935)<sup>15</sup>. En effet c'est en 1923 que le département de la marine des États-Unis, prend conscience que la boue sur la coque des navires est constituée principalement de bactéries adhérentes <sup>16</sup> <sup>13</sup>. Ce processus est alors étudié dans l'eau douce par Henrici, à l'aide d'un microscope. Il met en évidence l'attachement bactérien aux surfaces: *“it is quite evident that for the most part water bacteria are not free floating organisms, but grow attached upon submerged surfaces”* <sup>15</sup>. Ses observations sont soutenues par de ZoBell & Allen<sup>13</sup> quand ils démontrent que l'encrassement biologique est initié par des bactéries se développant en biofilm et que ces films favorisent la fixation ultérieure d'autres micro-organismes, voire d'organismes macroscopiques.

Les biofilms sont alors aussi mal connus par la sphère médicale. L'évènement déclenchant l'intérêt du monde médical pour ce sujet se produit quand l'étiologie découvre un lien entre des infections chroniques et des agrégats de bactéries. Entre 1970-1972, des examens microscopiques répétés ont été effectués sur des échantillons de crachat de patients atteints de mucoviscidose (CF) et présentant aussi une infection pulmonaire chronique à *Pseudomonas aeruginosa*. Entre 1974-1978, les échantillons ont été prélevés à partir des poumons dans le

cadre des autopsies de patients atteints de mucoviscidose (CF) et dont la cause de décès était l'infection pulmonaire chronique à *Pseudomonas aeruginosa*<sup>16 17</sup>. Par ailleurs, à la même période, Costerton commence à mettre en évidence au laboratoire l'importance de l'organisation en biofilm. Quelques années plus tard, avec son groupe, il publie des observations par microscopie électronique de microcolonies de *Pseudomonas aeruginosa* dans les poumons d'un patient atteint de mucoviscidose (1980)<sup>18</sup>. Costerton accomplit un pas déterminant pour le concept de « biofilm » dans le domaine de la microbiologie médicale en 1978<sup>19</sup>, en démontrant la résistance collective accrue de ces consortia aux antibiotiques comparée à celle des bactéries à l'état planctonique. Cette découverte a déclenché et catalysé l'intérêt de la communauté scientifique pour ces objets. Progressivement le mot 'biofilm' a été accepté comme la désignation la plus adéquate pour ces communautés. Le nombre de publications sur les biofilms a progressivement augmenté entre 1981 et 1996 quand Costerton a organisé la première conférence biofilm ASM à Snowbird, Utah, USA<sup>16</sup>. À l'époque Costerton a donné des conférences et des cours dans tout le monde entier sur les biofilms et les infections causées, il a également initié des collaborations avec des scientifiques de différentes spécialités ainsi qu'avec des industriels<sup>16</sup>. Il a ainsi ouvert la voie à la compréhension générale, en médecine, du concept d'infection par biofilm, notamment en ce qui concerne les infections chroniques et les infections par corps étranger, par exemple sur les dispositifs médicaux.

En conclusion l'existence des agrégats de bactéries enrobés dans une matrice et adhérents aux surfaces ou localisés dans des tissus est historique. En revanche, le concept des infections par les biofilms et son importance dans la médecine et l'étude des maladies chroniques date d'environ un demi-siècle. Depuis il a été confirmé que les maladies causées par des biofilms sont très fréquentes et qu'il est crucial de mieux les comprendre pour à la fois les prévenir et guérir.

## **2. Biofilms dans la nature**

### **2.1. Biofilm et écologie**

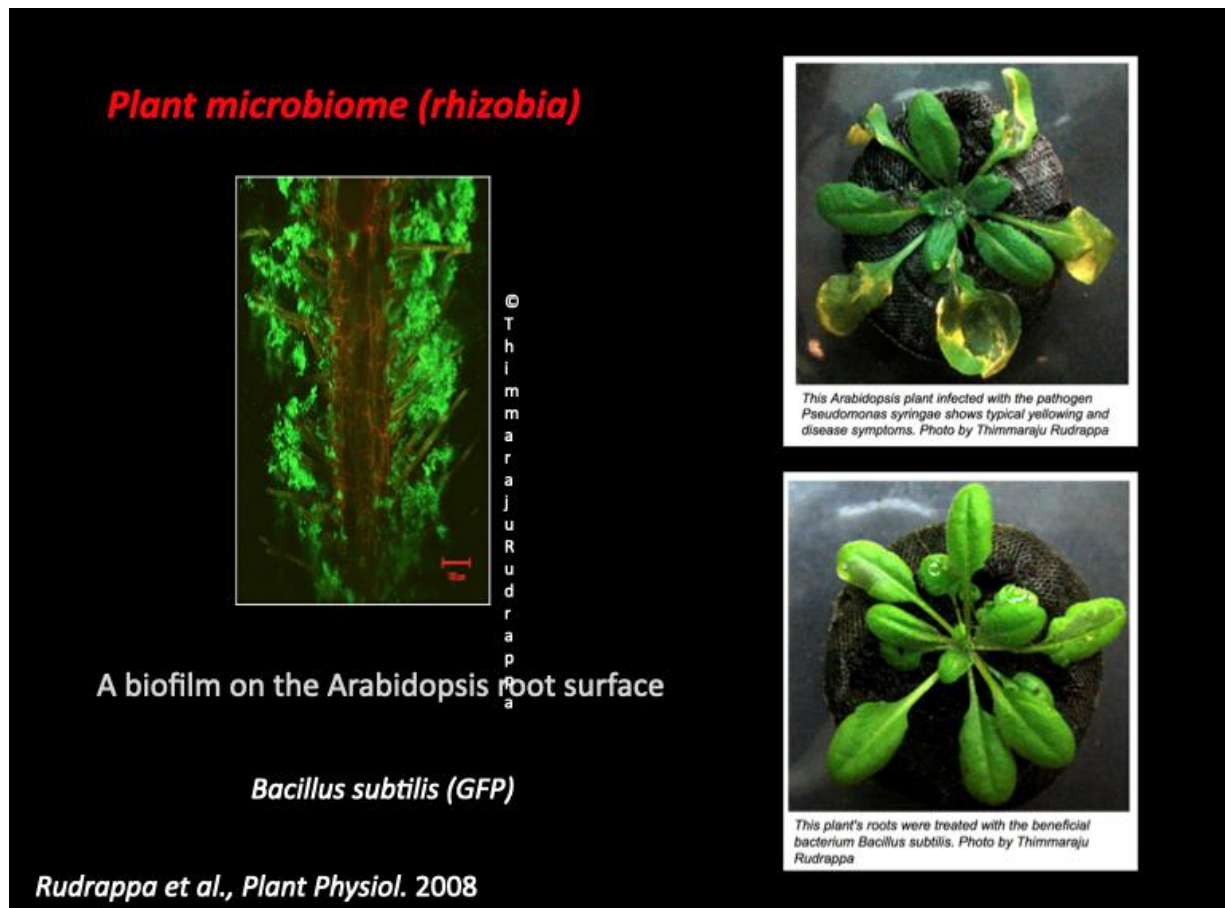
Présents dans tous les environnements, les biofilms colonisent toutes les niches de la biosphère. Le plus souvent inoffensifs, ils jouent un rôle écologique capital et contribuent très largement au bon fonctionnement de la plupart des écosystèmes<sup>3</sup>. Ces communautés adhérentes sont impliquées dans tous les cycles biogéochimiques<sup>3</sup>. Elles jouent un rôle primordial dans le cycle de carbone<sup>20 21 22</sup> et font partie des cycles du soufre et de l'azote aux fonds de l'océan.

Les biofilms participent activement à la fixation du carbone et l'oxydation anaérobie du méthane dans les sédiments anoxiques comme le montrent Boetius et al<sup>23</sup>.

Ces communautés microbiennes jouent aussi un rôle important dans l'oxygénation des océans et de l'atmosphère. Les bactéries ont été les premiers organismes à produire de l'oxygène (cyanobactéries) sur la surface terrestre en utilisant l'énergie solaire pour la photosynthèse<sup>3 24</sup>. On cite l'exemple de la source géothermique de Yellowstone, avec ses nuances arc-en-ciel provenant du biofilm de cyanobactéries de plusieurs centimètres d'épaisseur (Fig.3). Ces communautés adhérentes sont donc d'une grande importance pour la vie sur la surface de la Terre. Les processus microbiens assurés par les biofilms sont aussi à la base de la dégradation et de l'élimination des contaminants souterrains contribuant ainsi à la purification et la bioremédiation naturelles de l'eau. Ils préservent les réserves d'eau souterraine non seulement en dégradant la matière organique, mais aussi en retenant les métaux<sup>3</sup>. Par exemple, la méthylation du mercure est très majoritairement due à l'activité de micro-organismes anaérobies présents dans les zones anoxiques de la colonne d'eau d'environnements marins ou de sédiments.

Dans les sédiments océaniques supérieurs, les bactéries adhérentes peuvent agir comme colle pour les microparticules, ce qui augmente la taille moyenne des particules sédimentaires et altère leur transport et leur localisation. Les biofilms influencent donc fortement la texture et la stabilité des sédiments<sup>3</sup>. Les biofilms sont aussi impliqués dans les processus climatiques planétaires et participent au cycle de l'eau. Un nombre important de micro-organismes est présent dans l'atmosphère avec une répartition qui varie considérablement en fonction de l'altitude, de l'emplacement (zones agricoles, en haute mer ou côtières) et la force du vent. Cette présence peut affecter la formation des nuages et les précipitations<sup>3 25</sup>.

Ces communautés attachées colonisatrices, peuvent se développer associées à des surfaces minérales, végétales ou animales (muqueuses, surfaces dentaires ...) impactant ainsi la faune et la flore. Les plantes hébergent un large éventail de bactéries sur ou dans leurs racines (rhizosphère), leurs vaisseaux de transport, leurs tiges et leurs feuilles (phyllosphère) majoritairement sous forme de biofilms.



**Figure 5: Biofilm de *Bacillus subtilis* à la surface des racines d'*Arabidopsis thaliana*<sup>26</sup>.** En haut à droite une plante malade infectée par un pathogène (feuilles jaunissent) dont les racines ne présentent aucun biofilm. En bas à droite une plante traitée par *Bacillus subtilis* installée à la surface des racines.

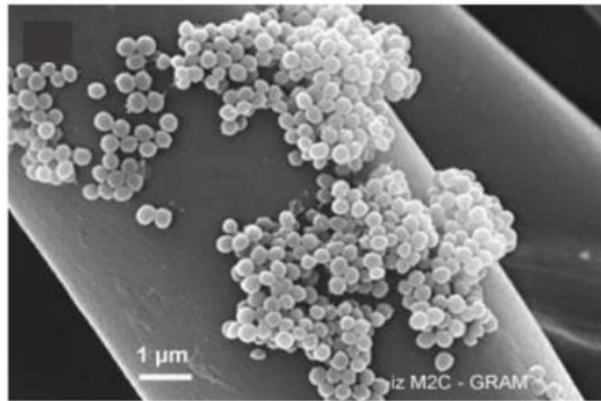
Le développement de ces biofilms sur les plantes est associé à des interactions symbiotiques, tel est le cas du biofilm de *Bacillus subtilis* se développant sur les racines de *Arabidopsis* (Fig.5), et parfois pathogènes. Ces communautés microbiennes diverses peuvent donc avoir des effets importants sur « la santé » et la productivité des plantes ainsi que ses fonctions écosystémiques<sup>27</sup>. Certains biofilms induisent la croissance des plantes et les protègent contre les phytopathogènes (un processus appelé biocontrôle) et les divers polluants toxiques du sol<sup>28</sup>. Ce mode de vie est souvent essentiel aussi à la survie de certaines bactéries. La formation de biofilms dans la rhizosphère permet aux bactéries du sol de coloniser leur habitat environnant et de survivre à des stress environnementaux communs tels que la dessiccation et la limitation des nutriments.

L'animal aussi est un hôte favorable des biofilms, avec des centaines ou des milliers de différents symbiotes microbiens. Entre symbiose et pathogénicité, plusieurs espèces bactériennes sont à l'origine des infections chez l'animal. On mentionne souvent à titre

d'exemple *Staphylococcus aureus* impliqué dans les cas de mammite chez la vache laitière, une maladie économiquement très importante, où la formation d'un biofilm diminue l'efficacité des traitements aux antibiotiques d'usages<sup>29</sup>.

## 2.2. Biofilm et santé

Selon les dernières estimations, pas moins de  $4 \times 10^{23}$  micro-organismes colonisent le tube digestif humain, c'est le même nombre de cellules constituant le corps humain. La majorité de ces organismes forme des biofilms. Bien que ce microbiote puisse être bénéfique dans certains cas, les biofilms bactériens capables de se développer sur des implants ou lors d'infections chroniques constituent des réservoirs de pathogènes à l'origine de nombreuses infections nosocomiales.



**Figure 6: Image en microscopie électronique d'une contamination sur une surface d'implant médical par un biofilm.** Ici, une prothèse cardiaque. D'après Dr L. Bénard, Laboratoire GRAM EA 2656.

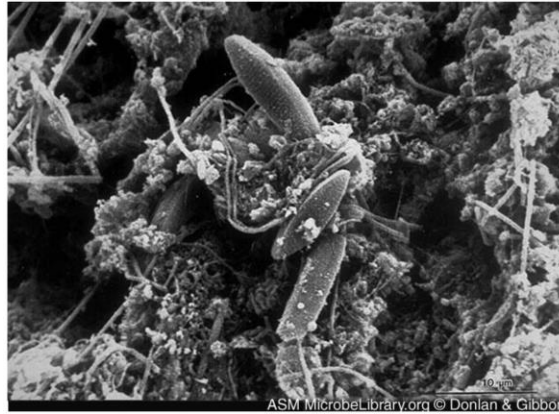
Les premières découvertes de la relation entre les implants médicaux et les contaminations par biofilms (exemple Fig.6) remontent au 1982, où un article rapportait le cas d'un patient porteur d'un stimulateur cardiaque et ayant présenté des épisodes de bactériémie à *S. aureus*<sup>30</sup>. L'analyse microscopique de l'implant a mis en évidence pour la première fois l'implication d'un biofilm dans la contamination du dispositif médical et les complications subies par le patient<sup>31</sup>. Les infections par des biofilms peuvent toucher les cathéters vasculaires et urinaires, les sondes orotrachéales, les stimulateurs cardiaques, les valves cardiaques prothétiques ainsi que les implants orthopédiques. Sur les 2,6 millions d'implants orthopédiques posés annuellement aux États-Unis, environ 112 000 (4,3 %) sont contaminés<sup>9</sup>.

Ces infections sont parfois chroniques et difficiles à combattre telle est l'infection chronique des poumons causée par *Pseudomonas aeruginosa*. Même chez les patients les plus sains, les infections causées par des biofilms sont rarement guéries par les mécanismes de défense de l'hôte<sup>32</sup>. Les bactéries sécrètent des antigènes et stimulent la production d'anticorps, cependant ces anticorps ne sont pas efficaces contre les bactéries quand elles sont en biofilm<sup>32</sup><sup>31</sup>. De plus, les traitements par des antibiotiques sont beaucoup moins efficaces sur les biofilms et les bactéries détachés du biofilm que sur les bactéries planctoniques. En relâchant des bactéries, le biofilm se comporte comme un nid de pathogénicité propageant l'infection à des sites multiples. Par conséquent, le mode biofilm peut être classé comme un facteur de virulence favorisant les maladies infectieuses.

Malgré la mise en œuvre de mesures préventives, les biofilms sont difficiles à éradiquer en raison des propriétés spécifiques<sup>33</sup> que nous détaillerons dans les sections suivantes. Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans leur formation est nécessaire pour pouvoir mieux les contrôler.

### **2.3. Biofilm et industrie**

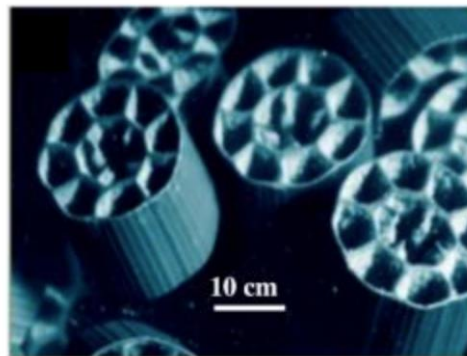
Parfois bénéfiques permettant dans la nature le bon fonctionnement des cycles biogéochimiques, d'autres fois néfastes causant des maladies chroniques dans les milieux hospitaliers, c'est aussi le paradoxe des biofilms que l'on retrouve dans l'industrie. Ces communautés adhérentes dont on parlera tout le long de ce travail de thèse peuvent être bénéfiques assurant des bioprocédés efficaces comme par exemple le traitement des eaux usées (Fig.8), mais elles peuvent aussi causer des dégâts économiques importants comme c'est le cas des biofilms sur les coques des grands navires (Fig.4), et ceux des contaminants des industries alimentaires<sup>34</sup> (Fig.7). Particulièrement tolérants à toutes sortes de stress (dessiccation, carence en nutriments, exposition aux acides, agents antibactériens, désinfectants, etc.), les biofilms dans l'industrie sont très difficiles à éliminer<sup>35</sup><sup>31</sup><sup>36</sup>. Les *Campylobacter thermophiles* sont responsables d'un grand nombre d'infections gastro-intestinales. Ces bactéries peuvent former des biofilms et survivre sur les surfaces d'équipement des usines de transformation<sup>29</sup>, ou dans les systèmes d'approvisionnement en eau dans les fermes. Elles peuvent également s'incorporer à des biofilms existants.



**Figure 7: Image en microscopie électronique à balayage d'une contamination d'un circuit agroalimentaire par un biofilm.** Un système d'eau industriel contaminé par un biofilm qui s'est développé sur une surface en acier sur une période de 8 semaines.<sup>37</sup>

Quelques applications des biofilms :

- 1) La bioremédiation et traitement des eaux usées : AquaCELL (Fig.8)



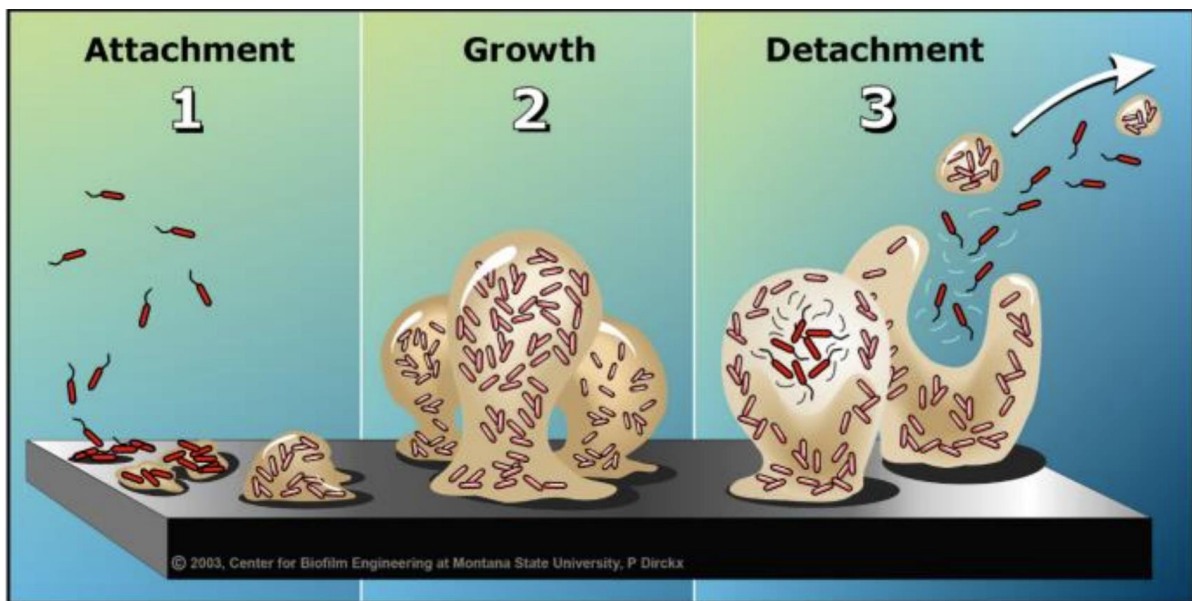
**Figure 8: Système de traitement d'eaux usées.** Biofilm Carrier Lotus TM AquaCELL TM, un réacteur à biofilms lit mobile (MBBR).

- 2) La catalyse : Les biofilms peuvent être utilisés en tant que catalyseurs<sup>38</sup> dans des systèmes de production biotechnologiques. La robustesse d'un biofilm, ainsi que son concept de cellules attachées à une surface, facilitent une séparation simple du produit extracellulaire. De plus sa densité élevée permet la concentration des composés cibles intracellulaires au contraire des cultures planctoniques.
- 3) Énergie : L'utilisation des biofilms électro-actifs (EA)<sup>39</sup>. Ce sont des consortiums bactériens mono ou multi-espèces, qui ont la faculté d'échanger des électrons provenant de leur métabolisme avec les surfaces solides conductrices des électrodes. Cette découverte est à l'origine d'un nouveau dispositif énergétique : la pile à combustible microbienne (PACM).

- 4) Contrôle qualité des eaux de distribution : L'utilisation des biofilms de *Pseudomonas fluorescens* en tant que biofilm référence pour le contrôle de la qualité microbiologique des eaux de distribution<sup>40</sup> est possible grâce à la sensibilité de ce biofilm à la variation de Carbone organique dissous COD. Cette sensibilité est rapportée par les changements dans le profil spectral du biofilm naissant.

### 3. Mécanismes de formation

Les biofilms représentent une population bactérienne attachée à une surface confinée et enrobée d'une matrice extracellulaire auto-produite<sup>8 9</sup>. Il est admis que cette transition de l'état planctonique vers la vie en communauté attachée est une stratégie de survie et d'adaptation dans les milieux les plus hostiles<sup>32 41</sup>. Durant ces dernières 40 années, les scientifiques ont été surpris de la capacité organisationnelle particulière de ces communautés. Trois étapes clés du cycle de vie du biofilm, adhésion initiale, développement et maturation et finalement dispersion (Fig.9).



**Figure 9: Cycle de vie des biofilms.** 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 flocs de cellules ou par un type de dispersion dit « essaimage » qui libère des cellules individuelles. ([Http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what\\_are\\_biofilms.html](http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html))



### 3.1. Adhésion initiale

La première condition pour le déclenchement des étapes de formation du biofilm est la disponibilité d'une surface et d'au moins une bactérie. En plus des propriétés physico-chimiques de cette surface (hydrophobie et charge électrostatique)<sup>9</sup>, l'initiation du biofilm peut dépendre des propriétés des cellules et des détails de l'environnement (géométrie, hydrodynamique et propriétés physico-chimiques).

L'étape d'attachement à la surface est une étape critique impliquant plusieurs facteurs, ce qui engendre une grande diversité de mécanismes selon les conditions étudiées. O'Toole et Kolter ont démontré l'importance des appendices de surface<sup>42 43</sup> tels que les flagelles et les pili dans cette première étape d'adhésion, mais la question du rôle de la motilité reste très débattu<sup>44 45</sup>. La notion que les bactéries ont un sens de touché qui leur permet de détecter les surfaces et d'induire l'expression et/ou la répression des gènes spécifiques (exemple chez *Caulobacter crescentus*) est une hypothèse soutenue par plusieurs groupes<sup>46 47</sup>.

La fonction mécanosensorielle des flagelles comme outil de détection de surface a été proposée pour gouverner la transition planctonique-sessile à l'origine de la formation du biofilm<sup>48 49</sup>. Cependant, dans ce cas, la détection de la surface par les flagelles se termine par une régulation de la motilité. Chez *E. coli*, l'activité flagellaire a été proposée pour faciliter le contact initial de la cellule avec la surface, aidant potentiellement à surmonter les forces répulsives à une surface<sup>50</sup>. Par ailleurs, d'autres appendices de surface tels que les fimbriae, les curli ou les pili conjugatifs sont importants pour la formation de biofilm<sup>41</sup>, lorsqu'elles sont exprimées de manière constitutive, les flagelles sont dispensés de l'adhésion initiale et du développement du biofilm<sup>51</sup>.

Récemment, des petites molécules diffusibles telles que l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique AMPc, et le di-guanosine monophosphate cyclique (di-cGMP), dont la concentration intracellulaire est influencée par de nombreux stimuli environnementaux, ont été identifiés comme des messagers centraux régulant l'expression de gènes impliqués dans la transition entre la vie planctonique et l'établissement d'un biofilm<sup>41 32 43</sup>. En effet ces molécules jouent un rôle dans l'activation de la transcription des gènes spécifiques et promeuvent la production des composés de la matrice extracellulaires<sup>32</sup>. L'adhésion devient alors irréversible lorsque des interactions covalentes sont établies entre les bactéries et la surface, grâce aux macromolécules de surfaces bactériennes telles que les polysaccharides, les protéines ou les lipopolysaccharides.

Ces molécules ne sont pas les seules impliquées, les premières étapes de formation de biofilm font intervenir aussi des macromolécules de l'enveloppe bactérienne - souvent appelées adhésines<sup>9 52</sup> - qui interagissent de manière spécifique ou non avec les surfaces.

La formation du biofilm engage une cascade de régulations interactives rendant très complexe, la compréhension des mécanismes dans leur ensemble.

### **3.2.Maturation et dispersion**

Suite à leur adhésion irréversible, les bactéries commencent à se multiplier, tout en synthétisant et développant la structure de leur matrice extracellulaire recouvrant tout ou partie de la surface. Si les conditions du milieu le permettent, des espèces différentes ou d'autres micro-organismes s'intègrent et mènent à la formation de biofilms multi-espèces ou mixtes<sup>41 53 54 55</sup>. Cette étape dépend de plusieurs facteurs tels que les propriétés intrinsèques des micro-organismes présents, leur capacité à communiquer entre eux, des conditions environnementales (température, durée, substrats...) et des propriétés de la surface<sup>56</sup>.

Au fil des années les recherches<sup>56</sup> se sont intéressées aux biofilms avec une question sur quel est le programme génétique menant au développement des biofilms. Et existe-t-il un signal qui induit la différenciation ?

Les études par Davies et al.<sup>57</sup> ont mis en évidence le rôle crucial joué par le « Quorum sensing » QS dans la différenciation en une structure biofilm. Ils ont observé que la structure d'un biofilm, formé par une souche déficiente dans la production d'HSL (lasI), est plate et non différenciée en raison de l'absence de formation de microcolonies. En effet, Le QS est un mode de régulation et de communication bactérien. L'étude de ce système chez les bactéries à Gram négatif, a montré que des signaux des acyl-homosérine lactones (acyl-HSL) produits par des cellules bactériennes donnent des indications sur la densité cellulaire dans un environnement colonisé. À partir d'une densité cellulaire critique, ces signaux peuvent s'accumuler et déclencher l'expression d'un ensemble spécifique de gènes<sup>32</sup>. Trois systèmes de détection du quorum chez *Pseudomonas aeruginosa* ont été caractérisés lasR/lasI, rhlR/rhlI et qscR.<sup>32 41</sup>

Le cycle de vie biofilm est caractérisé par une étape de détachement. Le biofilm mature peut connaître une phase de dispersion connue dans les processus d'infection où des bactéries isolées ou des flocons sont libérés du biofilm<sup>32 9</sup>. Les mécanismes de dispersion<sup>58</sup> du biofilm

peuvent être divisés en deux grandes catégories: (i) la dispersion active basée sur des mécanismes initiés par les bactéries elles-mêmes ; (ii) la dispersion passive médiée par des forces extérieures comme les forces de cisaillement dues aux conditions hydrodynamiques<sup>58</sup>. Plusieurs facteurs sont impliqués dans le processus complexe de dispersion du biofilm tels que les signaux environnementaux (diminution de nutriments et de l'oxygène...), la signalisation de quorum sensing et la production d'enzymes extracellulaires. Les enzymes extracellulaires permettent de dégrader les composants de la matrice du biofilm facilitant ainsi la libération et le détachement des bactéries. On cite l'exemple, de la libération de *Pseudomonas aeruginosa* de la matrice du biofilm par l'action d'une enzyme dégradant l'alginate<sup>32</sup>.

## 4. Propriétés spécifiques du biofilm

### 4.1. Matrice extracellulaire : composition et propriétés physiques

Ce qui fait d'un biofilm une structure tridimensionnelle, ce sont les biopolymères autoproduits dits substances polymériques extracellulaires (EPS) dans lesquels sont intégrés et se divisent les micro-organismes. Si les biofilms sont considérés comme une communauté, les EPS peuvent métaphoriquement être considérées comme « la maison des cellules du biofilm »<sup>59</sup>. Elle détermine les conditions de vie des cellules vivant dans ce microenvironnement.

La matrice extracellulaire est bien plus qu'une simple « colle » pour les biofilms. Il s'agit d'un réseau assurant la stabilité mécanique<sup>8</sup> du biofilm par le maintien des cellules, en leur offrant un arrangement spatial sur une période prolongée. C'est un système hautement sophistiqué, qui confère des caractéristiques particulières. La matrice extracellulaire forme une barrière protectrice, qui protège les cellules en biofilm contre plusieurs menaces (par exemple les bactériophages, les amibes et certains bactéricides conventionnels comme les antibiotiques ainsi que les rayonnements ultraviolets)<sup>43</sup>. Elle facilite l'accès aux nutriments en interagissant avec l'environnement grâce à ses propriétés de sorption qui permettent de séquestrer les substances dissoutes dans le micro-environnement. Elle contrôle la teneur en eau, la charge, la porosité, et la densité. La structure biofilm est par conséquent largement déterminée par ce matériau.

Les EPS peuvent varier considérablement entre les biofilms, en fonction des micro-organismes qui les composent et de l'environnement (flux, température et disponibilité des nutriments, etc..). Les EPS comprennent, en plus des polysaccharides, une grande variété de

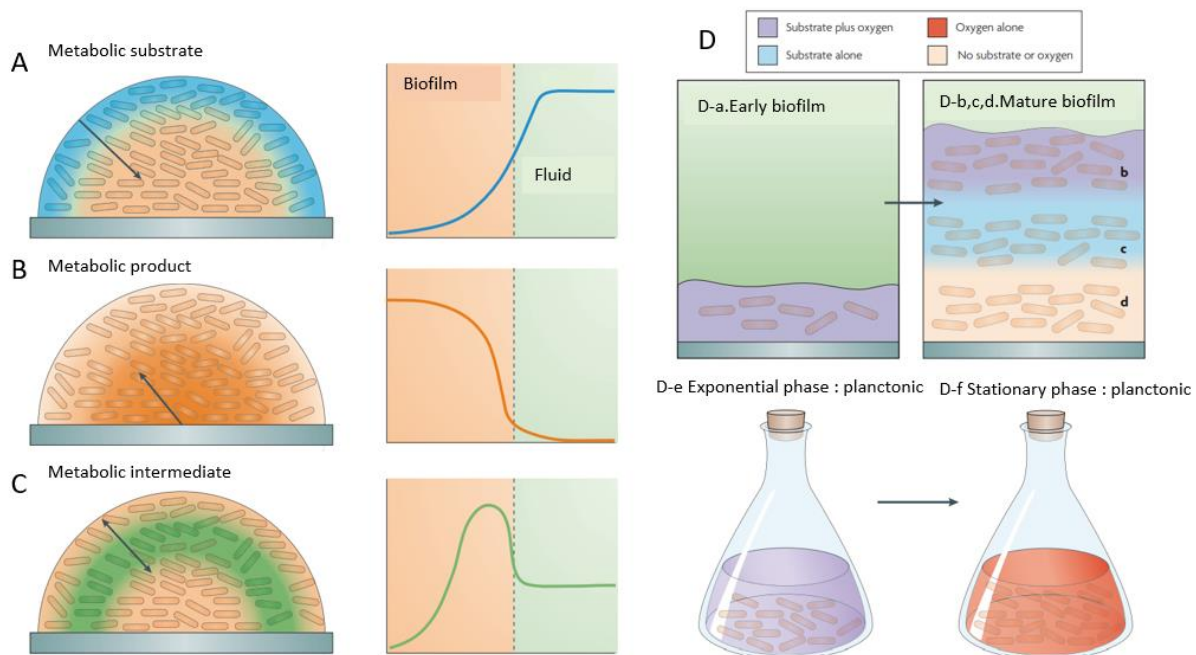
protéines, de glycoprotéines et de glycolipides et, dans la plupart des cas, des quantités surprenantes d'ADN extracellulaire, qui contribuent aussi aux propriétés mécaniques. Les polysaccharides sont de longues molécules, linéaires ou ramifiées, qui s'attachent à la surface des cellules. L'alginate par exemple est le composé le mieux étudié dans les biofilms *Pseudomonas aeruginosa*. Il est capable de retenir des protéines extracellulaires telles que les enzymes, ce qui permet maintenir leur activité dans le biofilm et d'assurer une dégradation efficace de différentes matières. La cellulose fait partie des polysaccharides très répandus dans les biofilms. Elle influence la structure des biofilms, et est également importante dans les processus infectieux dans *E.coli*<sup>59</sup>.

Malgré les avancées scientifiques récentes, l'établissement d'un profil complet de la composition de la matrice extracellulaire reste un défi et c'est ce qui a donné à la matrice la dénomination de « dark matter of biofilms »<sup>60</sup>.

#### **4.2. Les micro-environnements du biofilm : Hétérogénéité chimique et physiologique**

Les biofilms sont généralement caractérisés par des amas denses et confinés de cellules bactériennes. Ce changement de mode de vie des bactéries libres en attachées est lié à l'émergence d'hétérogénéité à plusieurs niveaux (structurale, chimique et biologique) (Fig.10)<sup>61</sup>. Les cellules au sein du biofilm peuvent présenter un niveau d'hétérogénéité physiologique et génétique entre elles et par rapport aux cellules planctoniques.

On suppose généralement que les activités physiologiques des cellules bactériennes dans une culture planctonique bien mélangée sont uniformes (Fig.10 D-e et D-f). En revanche dans un biofilm, l'hétérogénéité peut être observée à différentes échelles, à travers les gradients chimiques locaux (Fig.10 A, B & C). La concentration de tout nutriment consommé dans le biofilm diminue avec la profondeur dans le biofilm en s'éloignant de la source de nutriments (Fig.10 A). À l'inverse, les gradients de produits métaboliques sont caractérisés par une concentration plus élevée à l'intérieur du biofilm et une concentration plus faible à l'extérieur du biofilm<sup>61</sup> (Fig.10 B). D'autres solutés sont à la fois produits et consommés par le biofilm. Cette situation se produit dans le cas d'un intermédiaire métabolique ou lorsque le métabolite d'une espèce sert de substrat à une autre espèce (Fig.10 C). La distribution de tout soluté dans le biofilm est régie par sa production, sa consommation et sa diffusion simultanées<sup>61</sup>, donc par l'organisation spatiale des micro-organismes qui métabolisent ce soluté.



**Figure 10: Hétérogénéité chimique dans le biofilm.** A, B, C : Trois modèles qualitativement distincts d'hétérogénéité chimique apparaissent dans les biofilms. (A) : Profil de la concentration d'un substrat consommé dans le biofilm et qui diminue avec la profondeur. (B) : Profil de la concentration d'un produit métabolique qui est plus concentré à l'intérieur du biofilm. (C) : Profil de la concentration d'un intermédiaire métabolique qui est à la fois consommé et produit dans le biofilm. D : différence entre le mode biofilm et le mode planctonique. D-a : Biofilm précoce mince (disponibilité de substrat et d'O<sub>2</sub>) et D-b,c,d : Biofilm mature (b : disponibilité de substrat et de l'O<sub>2</sub>. c : disponibilité du substrat, mais pas d'O<sub>2</sub>. d : ni substrat ni O<sub>2</sub>). D-e : Culture en phase exponentielle (disponibilité du substrat et d'O<sub>2</sub>). D-f : Culture en phase stationnaire (le substrat peut être épuisé, mais l'O<sub>2</sub> présent).<sup>61</sup>

Le résultat de cette hétérogénéité chimique est une hétérogénéité physiologique<sup>61</sup>. En effet, la croissance et l'activité bactériennes peuvent être ralenties ou arrêtées en raison de la limitation des substrats. En outre, l'accumulation de déchets acides à l'intérieur du biofilm peut abaisser le pH local et affecter l'état physiologique des bactéries<sup>9</sup>. De même la distribution de l'oxygène obéit aux lois des équilibres de consommation, diffusion et l'O<sub>2</sub> représente une ressource importante et activement consommée par les bactéries. Nous allons y revenir.

Les bactéries sont extrêmement adaptables aux conditions de leur environnement. Chez certaines espèces bactériennes, une partie d'environ 10 % du génome est composée de gènes régulateurs. Des circuits génétiques permettant de répondre à des changements environnementaux tels que l'anaérobiose, la carence en nutriments, le stress oxydatif, le stress osmotique, l'arrivée de biocides ou l'acidification ont été décrits<sup>61</sup>. Par conséquent, lorsque les cellules au sein des biofilms répondent à des gradients chimiques (Fig.10 A, B & C),

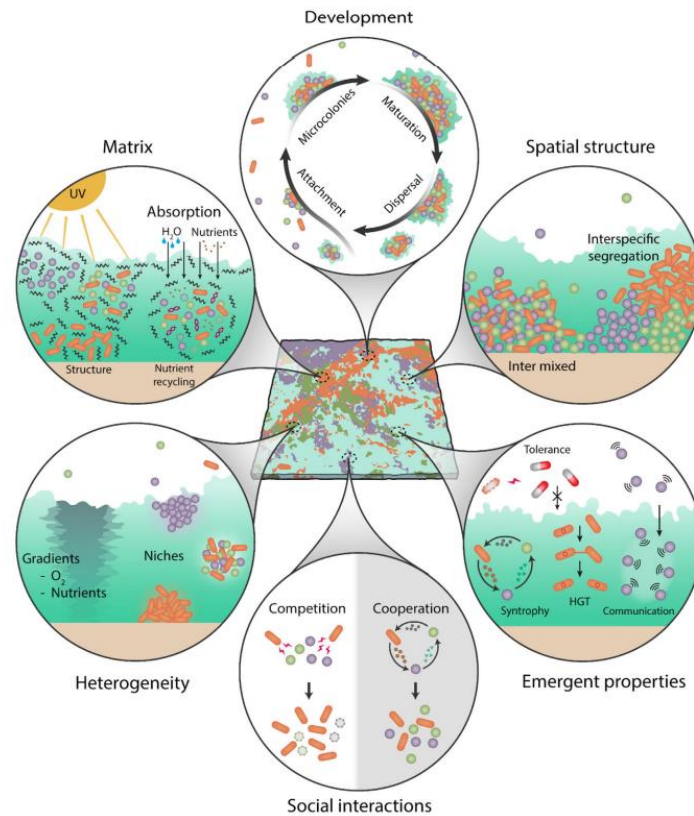
l'expression génétique des bactéries varie et engendre une hétérogénéité physiologique et génétique importante.

Des études récentes ont également démontré que des variants génétiques apparaissent dans les biofilms<sup>61 62</sup> par mutation ou recombinaison, indépendamment des conditions environnementales. Ces variants ont d'abord été détectés par des changements dans la morphologie des colonies de sous-populations de cellules après la croissance du biofilm. Ce phénomène a été observé chez un large éventail d'espèces bactériennes y compris les bactéries Gram-négatives et Gram-positives. Les mutations et les réarrangements génétiques sont ensuite enrichis par sélection naturelle dans l'environnement local du biofilm. En outre, l'expression stochastique des gènes pourrait également entraîner une hétérogénéité. Une sous-population peut potentiellement exprimer des gènes différemment de la population plus large, de manière stochastique et indépendante des conditions environnementales dominantes.

#### **4.3. Biofilm multi-espèces : Propriétés émergentes et interactions**

Dans la nature les biofilms sont dans la plupart des cas des multi-espèces. La présence fréquente de micro-organismes d'espèces différentes au sein d'un même biofilm constitue un niveau supplémentaire d'hétérogénéité biologique, mais aussi d'interactions inter-espèces<sup>9 33 63</sup> (Fig.11).

Les propriétés émergentes spécifiques dans ces systèmes multi-espèces<sup>64 33</sup> sont en relation étroite avec les interactions inter-espèces. Les études ont démontré qu'une résistance renforcée peut être liée à des interactions synergiques en multi-espèces en comparaison avec les mono-espèces<sup>64 65</sup>. D'ailleurs, récemment, Lee et al.<sup>65</sup> ont mis en évidence une résistance collective renforcée à la tobramycine et au dodécylsulfate de sodium (SDS) dans une communauté multi-espèces de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas protegens* et *Klebsiella pneumonia*. Suite à son exposition aux biocides, et malgré les différences de niveaux de tolérance des espèces présentes, la composition du biofilm est restée stable ainsi que les proportions en nombre de cellules de chaque espèce. De même, les infections chroniques multi-espèces, présente une résistance accrue, la gravité de l'infection peut également être accrue<sup>66 64 67</sup>. Une étude récente a démontré in vivo que la cicatrisation d'une plaie était retardée lorsqu'elle était infectée par un biofilm multi-espèces de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*<sup>64 67</sup>.



**Figure 11: Résumé graphique des propriétés liées au mode de vie biofilm<sup>63</sup>.** Elles façonnent les hétérogénéités dans les biofilms multi-espèces. L'écologie des communautés de biofilms composées de quelques à de nombreuses espèces est complexe et les diverses activités et processus sont souvent liés, s'affectant mutuellement à travers l'espace et les générations. Des hétérogénéités sont créées et influencées par le développement de la communauté. Des niches et des distributions spatiales distinctes de cellules se développent et sont soutenues par des gradients et la formation de matrice. La façon dont les membres de la communauté interagissent dépend donc largement de la localisation spatiale dans la structure du biofilm. La figure met en évidence l'hétérogénéité des biofilms multi-espèces et une sélection des multiples facteurs qui peuvent compliquer l'analyse des communautés de biofilms.

Les interactions inter-espèces peuvent par ailleurs, imposées une distribution spatiale non aléatoire d'un biofilm<sup>64 68</sup>. Un exemple d'organisation spatiale au sein d'une co-infection a été fourni par Fazli et al<sup>69</sup>, où il a été constaté que les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et de *Staphylococcus aureus* présentes dans la même plaie chronique forment des clusters disjoints. D'ailleurs, les biofilms présentent un environnement particulièrement adapté à des phénomènes d'interactions spécifiques tels que le transfert horizontal des gènes THG » et le « quorum sensing QS », grâce à la forte densité bactérienne offrant un contact cellule-cellule. Le transfert horizontal des gènes peut dans certains cas favoriser la formation de biofilm<sup>70</sup>, dans d'autres non<sup>71</sup>. Quant au QS, il a été démontré dans plusieurs cas qu'il joue un rôle important dans le développement de la structure et la maturation des biofilms multi-espèces<sup>72 73</sup>.

Les interactions inter-espèces sont dans la plupart des cas bénéfiques aux biofilms, et pouvant être classées en plusieurs catégories<sup>74 70</sup> (Fig.12).

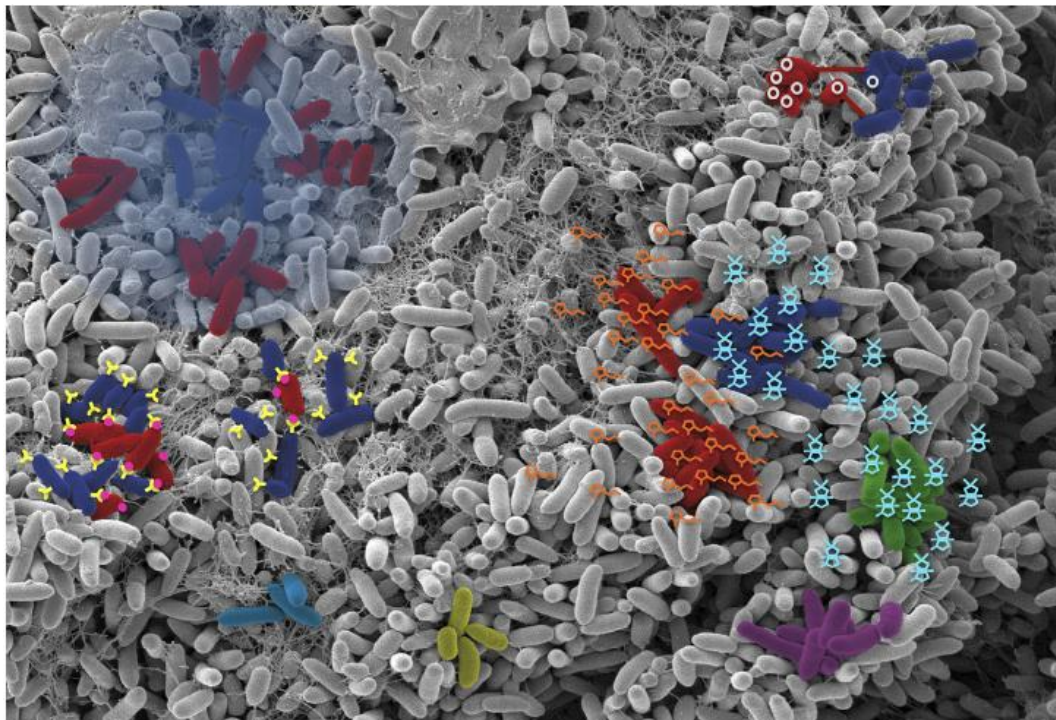
- Le parasitisme, quand une ou plusieurs espèces profitent de l'ensemble des avantages fournis par le reste de la communauté, sans y participer

- La coopération, quand le bénéfice est partagé mutuellement. Dans certains cas ça implique toute la population dans d'autres cas c'est entre seulement quelques espèces.

- Et la compétition, quand c'est particulièrement néfaste pour certaines espèces et profitable à d'autres, comme les phénomènes de répression et d'élimination de certaines espèces pour l'occupation de plus d'espace par d'autres. Ces phénomènes peuvent être observés entre deux ou plusieurs espèces<sup>75 73</sup>.

La figure 12 rassemble quelques exemples d'interactions spécifiques. Les interactions des bactéries des biofilms multi-espèces peuvent aussi être soit directes et spécifiques (interactions physiques cellule-cellule), également appelées co-agrégations, sont bien décrites pour les bactéries formant des biofilms dans la cavité buccale<sup>64 76</sup>. Dans ce cas, la succession des biofilms bactériens est étroitement contrôlée par des interactions récepteurs-ligands associées à la surface cellulaire. La co-agrégation entraîne souvent des niveaux accrus de formation de biofilms multi-espèces. Comme elles peuvent être indirectes en favorisant la croissance ou la présence de certaines espèces par d'autres (coopération et/ou parasitisme) telles que le co-métabolisme ou la syntrophie, où une espèce se nourrit du sous-produit de l'autre. Hansen et al.<sup>77</sup> ont montré que dans un biofilm multi-espèces composé de *Pseudomonas putida* et d'*Acinetobacter sp.* cultivés sur de l'alcool benzylique *Acinetobacter* transforme l'alcool benzylique en benzoate, qui est métabolisé par *Pseudomonas putida*. Suite à cette coexistence, la biomasse totale du biofilm augmentait.





TRENDS in Microbiology

**Figure 12: Illustration des interactions interspécifiques dans les biofilms multi-espèces<sup>64</sup>.**

En haut à gauche : co-métabolisme ou génération de niche où une espèce bactérienne (cellules bleues) produit ou élimine des substrats (zone bleue) permettant la croissance d'une autre espèce (cellules rouges). En bas à gauche : co-agrégation où une fixation spécifique entre cellules d'espèces différentes (cellules bleues et rouges) se produit par le biais de composants spécifiques associés à la surface (jaunes et roses). En haut à droite : transfert horizontal de gènes (HGT ; conjugaison) où l'ADN plasmidique (cercles blancs) est transféré d'une espèce (cellules rouges) à une autre (cellules bleues) via les pili conjugatifs (lignes rouges reliant les cellules bleues et rouges). En bas à droite : détection de molécules du quorum sensing par communication intraspécifique [cellules rouges, composés oranges de N-acyl homosérine lactone (AHL)] et interspécifique (cellules bleues et vertes, composés cyanosyl borate diester) via des composés diffusibles. Les signaux de communication intraspécifiques (cellules rouges, composés orange) peuvent également atteindre et affecter les cellules d'autres espèces (bleues). Les cellules jaunes, cyan et violettes ne sont pas affectées par les interactions.

Les mécanismes gouvernant les interactions au sein des biofilms multi-espèces peuvent être parfois complexes et difficiles à déchiffrer. Roder et al. ont montré que la présence d'une espèce de *Microbacterium oxydans* favorise une localisation stratégique à *Xanthomonas retroflexus* au sein du biofilm multi-espèces constitué de *Stenotrophomonas rhizophila*, *Xanthomonas retroflexus*, *Microbacterium oxydans* et *Paenibacillus amylolyticus*. Ce qui lui permet un meilleur accès à l'oxygène et aux nutriments.

## 5. L'oxygène dans le biofilm

### 5.1.L'oxygène source de la vie

La question de l'oxygène est intimement liée à celle de la vie sur terre. Les recherches sur l'origine de la vie ont cependant permis de découvrir qu'initialement, la vie sur Terre se déroulait sans oxygène. La présence d'O<sub>2</sub> libre à la surface de la Terre remonte au début du Précambrien. La première preuve directe est la présence de cyanobactéries sous forme de fossiles chimiques date de 2,8 milliards d'années. L'oxygène apparaît comme un sous-produit du métabolisme des cyanobactéries<sup>2</sup>. Historiquement c'est donc la vie qui a créé l'oxygène.

Aujourd'hui les environnements oxiques prédominent et le niveau d'O<sub>2</sub> de l'air ambiant est stabilisé à 21%. Cependant des conditions anaérobies strictes existent toujours dans certains habitats où ils abritent un microbiote d'organismes anaérobies qui ont évolué pour utiliser d'autres accepteurs d'électrons finaux tels que sulfate, nitrate ou sulfure. Entre ces deux extrêmes, il existe localement des environnements à faible niveau d'oxygène et les micro-organismes ont développé des capacités d'adaptation à l'hypoxie. Ainsi de nombreuses bactéries qui se développent de manière optimale à des concentrations saturantes d'O<sub>2</sub> ont également le potentiel de respirer en aérobie dans des conditions micro-oxiques<sup>78</sup>. Par exemple, *Escherichia coli* peut respirer de manière aérobie à des concentrations nanomolaires d'O<sub>2</sub><sup>79</sup>.

L'O<sub>2</sub> est l'accepteur terminal d'électrons de la respiration aérobie. C'est le moteur le plus efficace du métabolisme énergétique, la raison de son succès évolutif. Néanmoins, la réduction de l'O<sub>2</sub> moléculaire crée des espèces réactives telles que l'anion superoxyde, le peroxyde et le radical hydroxyle et des mécanismes de détoxification de ces radicaux ont été développés pour s'en protéger. Cette protection contre la toxicité de ces espèces réactives a un coût énergétique qui augmente avec la tension ambiante en O<sub>2</sub>. Ainsi Fenchel et Finlay<sup>80</sup> proposent que ce « trade off » soit à la fois une force évolutive et un facteur dominant des interactions fonctionnelles et de la structure spatiale des communautés microbiennes. Des expériences anciennes menées par Engelman<sup>81</sup> le conduisent, entre autres, à observer l'accumulation de bactéries en anneau à distance de bulles d'air, suggérant une localisation à une tension d'O<sub>2</sub> préférée inférieure à la saturation. Il observe aussi très précocement que la motilité des spirilles pourrait dépendre de la tension en O<sub>2</sub>. Ceci sera démontré beaucoup plus tard sur *E. coli* (Wild type bacteria (RP437)) dans le groupe de A. Libchaber par Carine Douarche, Hanah Salman et Axel Buguin<sup>82</sup>.

Par ailleurs, la relation entre la concentration en  $O_2$  et la croissance des bactéries est difficile à faire<sup>83</sup>. De même, depuis le constat fait par Greig et Hoogerheide en 1940 : “Although the oxygen consumption of growing cultures of bacteria has been suggested as a possible criterion of growth by a number of investigators, few have found any correlation except for a limited incubation *time*”, la situation n’a pas beaucoup évolué et cette relation doit être comprise pour chaque système.

## 5.2.L’oxygène dans les biofilms

Dans un biofilm où la distribution des bactéries est fondamentalement hétérogène et a fortiori dans un biofilm multi-espèces, la question du niveau de l’oxygène et son rôle dans la structuration de la communauté apparaît donc critique à plusieurs titres.

Du fait de la forte densité bactérienne associée à ce mode de vie, la consommation de l’oxygène est élevée et on s’attend à trouver des zones d’oxygénation variable dépendant du bilan de la diffusion et de la consommation de l’ $O_2$  par les micro-organismes. Dans une communauté multi-espèces les besoins et la consommation en  $O_2$  sont potentiellement très variables d’une espèce à l’autre — on sait par exemple que la consommation d’ $O_2$  est assez bien corrélée à la taille de la bactérie<sup>80</sup>. La capacité des différentes bactéries à s’adapter à des zones micro-oxiques, voire leur tension d’ $O_2$  préférée sont susceptibles de différer.

La question de la réponse aux gradients d’ $O_2$  en biofilm reste entière. Elle pose deux problèmes, celui de la perception des gradients d’ $O_2$  et celui de la réponse apportée à cette perception. Pour les bactéries en nage libre, le mécanisme de perception des gradients n’est déjà pas complètement élucidé<sup>80 84</sup>. Néanmoins, quel que soit le mécanisme de mesure impliqué, l’orientation de la bactérie dans le gradient engage une altération de la nage en réponse à des variations de concentration en  $O_2$  ce qui peut sembler paradoxal en biofilm. Nous discuterons plus avant au chapitre 4 d’un scénario possible.

Il a été démontré que ces gradients en  $O_2$  au sein des biofilms affectent leur biologie<sup>85</sup><sup>86</sup>. Les recherches sur l’état et le rôle de l’oxygène dans les biofilms a été étudié d’un point de vue pratique en liant avec des applications de bio-ingénierie— la question étant souvent de déterminer quel environnement est le plus favorable pour l’activité de biofilms utiles — mais aussi au plan médical dans la mesure où le corps humain abrite des environnements très divers du point de vue de la tension en oxygène. Ainsi, une étude a été menée pour évaluer l’effet et

le rôle de l'O<sub>2</sub>, a permis de mettre en évidence le fait que de nombreux micro-organismes sont équipés de systèmes de mesure de l'oxygène local tel que le système FNR\* du pathogène entérique *Escherichia coli* (ETEC). Ce système relie l'expression de plusieurs facteurs de virulence au niveau d'oxygène local détecté et régule aussi la production de biofilm<sup>87</sup>. Des recherches en système modèle ont aussi permis d'établir que les biofilms comportent, de façon hétérogène, des zones à tension réduite d'O<sub>2</sub> et que la déplétion en O<sub>2</sub> contribue à la résistance des biofilms aux antibiotiques<sup>85</sup>. Certains auteurs ont même proposé des traitements hyperbares en O<sub>2</sub> pour lutter contre ce problème<sup>88 89</sup> Phil Stewart et ses collaborateurs ont proposé très tôt que l'hétérogénéité consubstantielle des biofilms résulte finalement du bilan de la consommation versus la diffusion de l'O<sub>2</sub><sup>90</sup>.

Ces résultats ont incité à examiner les niveaux d'O<sub>2</sub> à l'intérieur et autour des biofilms. En particulier, les biofilms stagnants qui épuisent rapidement l'O<sub>2</sub> et où l'accumulation de déchets résulte de la limitation du transport de masse à la surface<sup>91</sup>. Bien qu'il soit clair que les niveaux d'O<sub>2</sub> diminuent à l'intérieur du biofilm, les niveaux immédiatement adjacents à la surface du biofilm n'ont pas été étudiés de manière approfondie dans les biofilms statiques, en partie à cause des difficultés à mesurer de manière robuste l'O<sub>2</sub> avec une grande précision spatiale<sup>85 92 93</sup>.

À ce jour, le rôle de l'oxygène et de ses variations dans la structuration des biofilms multi-espèces n'est pas décrit. Notre ambition dans ce travail est d'apporter de premiers éléments pour amorcer cette recherche.

### **5.3.Sondes et mesures de l'oxygène en biofilm**

La difficulté d'étudier l'oxygène dans les biofilms est d'abord technique, celle de pouvoir mesurer sa concentration *in situ* sur une base spatio-temporelle sans perturber le biofilm. En effet, les mécanismes émergent la plupart du temps de la mise en évidence des comportements cinétiques. Jusqu'à présent, les deux principales familles de mesures de l'O<sub>2</sub> dans les biofilms sont d'une part les mesures impliquant l'utilisation de microélectrodes et d'autres par les mesures optiques faisant intervenir des sondes fluorescentes bloquées dans des couches minces sur lesquelles on fait croître le biofilm.

---

\* oxygen-sensitive transcriptional regulator fumarate and nitrate reduction

Microélectrodes : Cette technique est intéressante, mais peu flexible et invasive. Cette technique repose sur des mesures ponctuelles ce qui rend sa résolution spatiale limitée et l'acquisition des profils d'oxygène dissous à l'intérieur des biofilms extrêmement fastidieuse et imprécise<sup>94</sup>. Récemment, le groupe de Marvin Whiteley<sup>95</sup> a proposé une mesure spatiale des niveaux d'O<sub>2</sub> au-dessus d'un biofilm en temps réel à l'échelle du micron. Ils ont développé une version dite 'ultramicro-électrode', pour quantifier les gradients d'O<sub>2</sub> adjacents à la surface d'un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*, un pathogène opportuniste dont la physiologie et son comportement sont fortement influencés par la disponibilité de l'O<sub>2</sub>. Leurs résultats révèlent la production d'une zone hypoxique qui s'étend sur des centaines de microns à partir de la surface du biofilm en quelques minutes<sup>95</sup>. Cette ultra-microélectrode (UME) est en platine ayant un diamètre de 10µm.

Méthodes optiques : Le principe de mesure repose sur l'extinction de fluorescence d'un indicateur luminescent par O<sub>2</sub>. Les indicateurs d'O<sub>2</sub> les plus fréquemment utilisés sont soit des complexes à base de ruthénium, soit des complexes de métalloporphyrine. L'intensité de la luminescence et la durée de vie de la luminescence sont dynamiquement éteintes par l'oxygène. Le processus est entièrement réversible et ne consomme pas d'O<sub>2</sub><sup>96</sup>. La détection optique de l'O<sub>2</sub> a été introduite en microbiologie aquatique, lorsque des microcapteurs à fibre optique ont été développés<sup>97</sup>. Les indicateurs sensibles à l'oxygène peuvent être soit immobilisés dans une matrice polymère qui est fixée à l'extrémité d'une fibre optique (micro-optodes) ou étalée sur une feuille de support transparente (optodes planaires).

Les optodes O<sub>2</sub> planaires ont principalement été fabriquées sous forme de couches de 10 à 50 µm d'épaisseur sur une feuille de polyester transparent<sup>98 99 96</sup>. Cependant, cela limite la résolution spatiale, car le matériau du capteur lui-même peut agir comme un tampon d'oxygène<sup>96</sup>. Ultérieurement, des capteurs transparents d'O<sub>2</sub> planaires « ultrafins » ont été développés par une équipe à l'université de Copenhague<sup>93</sup>. Leur méthode consiste à appliquer un revêtement par centrifugation (<1 à 2 µm) de couches ultrafines d'indicateurs optiques immobilisées (d'un complexe cyclométallique d'iridium (III) coumarine hautement luminescente dans du polystyrène) sur des lamelles de verre, pour des études dans un système de « biofilm flow chamber ». Dans certains cas cette technique peut être efficace, mais elle est peu flexible et ne permet d'étudier qu'un plan. De plus, l'immobilisation peut affecter le comportement de l'indicateur luminescent (Extinction de luminescence non idéale).

Au sein de l'équipe de A. Libchaber, Carine Douarche a développé une méthode en utilisant un indicateur fluorescent (dichlorure de Ruthénium-tris(4,7-diphényl-1,10-phénanthroline) (Ru(dpp))) dont la mesure de l'intensité permet la quantification de la  $pO_2$ <sup>82</sup>. L'indicateur en question est une molécule organométallique (maximum d'émission  $\sim 615$  nm) éteinte par l'oxygène, permettant une mesure directe de la concentration d' $O_2$  dans l'échantillon. Cependant cette molécule est hautement toxique pour les bactéries. La stratégie était d'encapsuler la molécule dans des micelles de phospholipides, rendant le colorant biologiquement inerte et non invasif, tout en conservant sa sensibilité à l'oxygène<sup>82</sup>. Dans le présent travail, nous combinons l'utilisation de cet indicateur fluorescent avec l'excitation par une nappe laser pour atteindre une description spatiale 3D de la distribution de l' $O_2$ . Une technique flexible, non invasive, et efficace pour des mesures en biofilm.

## 6. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy: FLIM

### 6.1. Temps de vie de fluorescence

La durée de vie de la fluorescence et le rendement quantique sont étroitement liés. Le rendement quantique est le rapport du nombre de photons émis au nombre de photons absorbés. La signification du rendement quantique est bien représentée par un diagramme de Jablonski simplifié. Dans ce diagramme, nous n'illustrons pas explicitement les processus de relaxation individuels menant à l'état  $S_1$  relaxé. Nous nous concentrons plutôt sur les processus responsables du retour à l'état fondamental. En particulier, nous nous intéressons au taux d'émission du fluorophore ( $\Gamma$ ) et à son taux de décroissance non radiative vers  $S_0$  ( $k_{nr}$ ).

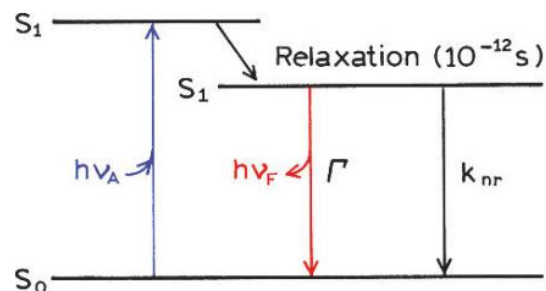


Figure 13: Diagramme de Jablonski simplifié

Les constantes de vitesse  $\Gamma$  et  $k_{nr}$  dépeuplent toutes deux l'état excité. La fraction de fluorophores qui se désintègrent par émission et donc le rendement quantique sont donnés par :

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}$$

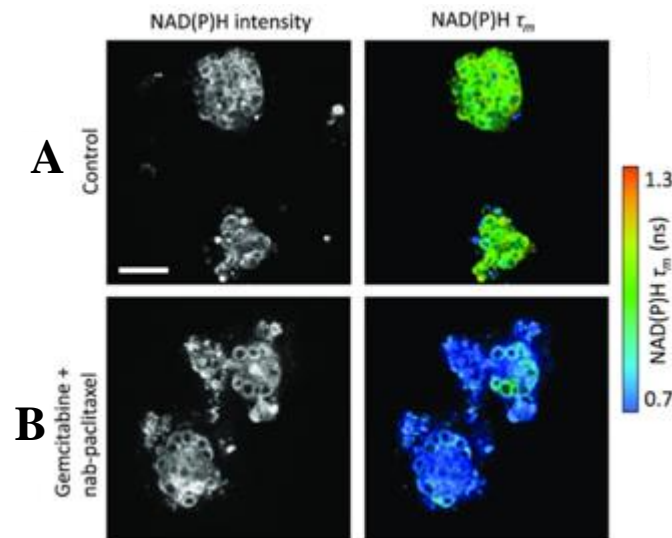
Nous notons que le rendement quantique de fluorescence est toujours inférieur à 1 en raison des pertes de Stokes. Tous les processus de désintégration non radiative possibles ont été regroupés dans la constante de taux unique  $k_{nr}$ .

La durée de vie de l'état excité est définie par le temps moyen que la molécule passe dans l'état excité avant de retourner à l'état fondamental. Les durées de vie de la fluorescence sont sur une échelle de temps de quelques nanosecondes à l'exception de quelques molécules. La durée de vie de fluorescence observée ne reflète pas seulement les propriétés radiatives du système moléculaire excité, mais elle reflète aussi tous les processus de désactivation non radiatifs. Elle est donnée par :

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}}$$

## 6.2. FLIM: Technique & Applications

Le temps de vie dépend du fluorophore considéré et de son environnement. Il permet de sonder l'environnement moléculaire et d'étudier des comportements du fluorophore sans en connaître la concentration<sup>100</sup>. Récemment, une technique microscopique a permis l'enregistrement d'images de temps de vie, c'est le FLIM : Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. FLIM a été appliqué au transfert d'Énergie entre molécules fluorescentes ou transfert d'Énergie par résonance de type Forster dit FRET, ce qui permet de visualiser et de suivre les interactions entre protéines<sup>101</sup>. L'un des objectifs de cette nouvelle approche est de capturer les évènements cellulaires décrits comme rapides, et détecter rapidement des interactions biologiques.<sup>100</sup> C'est donc une technique puissante très utilisée en imagerie biomédicale permettant grâce à des fluorophores endogènes et exogènes de suivre plusieurs processus dans les cellules et tissus, y compris la progression d'une maladie et l'efficacité d'un traitement.



**Figure 14: Présentation FLIM des organoïdes tumoraux en 3D<sup>100</sup>.** A : Un contrôle présentant des cellules tumorales non traitées par chimiothérapie (à gauche) ainsi que le temps de vie de fluorescence du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate NAD(P)H (à droite). B : cellules tumorales traitées par chimiothérapie (à gauche). Le temps de vie ( $\tau$ ) (à droite) du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate NAD(P)H endogène est sensible à la réponse métabolique à la chimiothérapie dans les organoïdes de cancer du pancréas.  $\tau$  est calculé à partir de deux déclin exponentiels des durées de vie des protéines de NAD(P)H. Barre d'échelle =  $50\mu\text{m}$ <sup>102</sup>.  $\tau$  est présenté avec un code couleur allant du bleu (0,7ns) au rouge(1,3ns).

Cette technique est très attractive pour les études « *in vivo* ». Voici quelques applications en biologie et médecine. Koenig et al ont montré la capacité du FLIM à détecter des cellules infectées par le mélanome ou des infections fongiques grâce au changements de durée de vie de l'autofluorescence des cellules de la peau à travers les différentes couches du derme<sup>103</sup>. Ultérieurement, le FLIM a été utilisé pour prédire la réponse au traitement dans des modèles de tumeurs de souris (Fig.14). Szulczewski et al. ont démontré que les macrophages ont une durée de vie différente des cellules tumorales mammaires ce qui permet de les identifier et suivre *in vivo* sans marquage<sup>100</sup>. Avec le développement de la méthode instrumentale du FLIM, les biophysiciens commencent à relier le temps de vie de fluorescence des NAD(P)H et FAD au métabolisme cellulaire. Ce qui a permis à Walsh et al. de détecter des changements métaboliques dus au cancer du sein.

#### Détermination de la distribution spatio-temporelle de l'oxygène dans le « biofilm » : Pourquoi FLIM ?

Dans ce travail, nous utiliserons la technique de FLIM pour établir la cartographie de l'O<sub>2</sub>. En effet, nous travaillons dans l'environnement complexe du biofilm où la concentration du fluorophore imagé n'est pas homogène. En chaque point de l'image, la concentration va

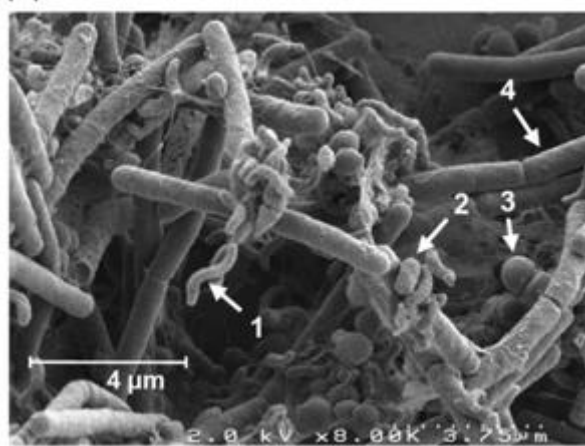


dépendre de la fraction volumique en cellule qu'il s'agisse d'une sonde extracellulaire comme c'est le cas pour notre étude ou d'une sonde intracellulaire. Contrairement à l'intensité détectée, les valeurs de temps de vie sont indépendantes de la concentration du fluorophore. La durée de vie de l'état excité est une quantité cinétique et, en tant que telle, elle est indépendante de facteurs tels que la concentration. Lorsque la durée de vie est résolue spatialement et présentée sous forme d'image, on parle d'image de durée de vie de fluorescence. La technologie utilisée pour recueillir et interpréter une image de durée de vie de fluorescence est appelée microscopie à imagerie de durée de vie de fluorescence (FLIM).

## II. Modèle d'étude

### 1. Présentation du modèle

Le biofilm multi-espèces que nous étudions dans ce travail de thèse a été établi récemment dans notre équipe au LJP dans une stratégie visant à développer un modèle de laboratoire permettant l'étude des biofilms multi-espèces. Ces travaux ont convergé vers un biofilm modèle à 4 espèces de bactéries d'origine naturelle implanté en canaux millifluidiques sous flux continu de nutriments <sup>6 7</sup>.



**Figure 15: Image de microscopie électronique à balayage du biofilm à quatre espèces à t égale 72 h <sup>5</sup>.** Les quatre espèces sont indiquées par des flèches dans la figure. (1) *Rhodocyclus sp.*, (2) *Pseudomonas fluorescens*, (3) *Kocuria varians*, (4) *Bacillus Cereus*. L'échelle est indiquée en bas.

Le biofilm fut initialement isolé dans une usine de l'industrie laitière au niveau d'un joint à l'extérieur d'une cuve de pasteurisation du lait <sup>4</sup>. Initialement, on a trouvé 13 souches de 7 espèces réparties dans 5 phyla. Grâce à nos collaborateurs de l'INRAE à l'Institut MICALIS ce biofilm a été réduit à 4 souches qui ont pu être cultivées (Fig.15) en milieu liquide et

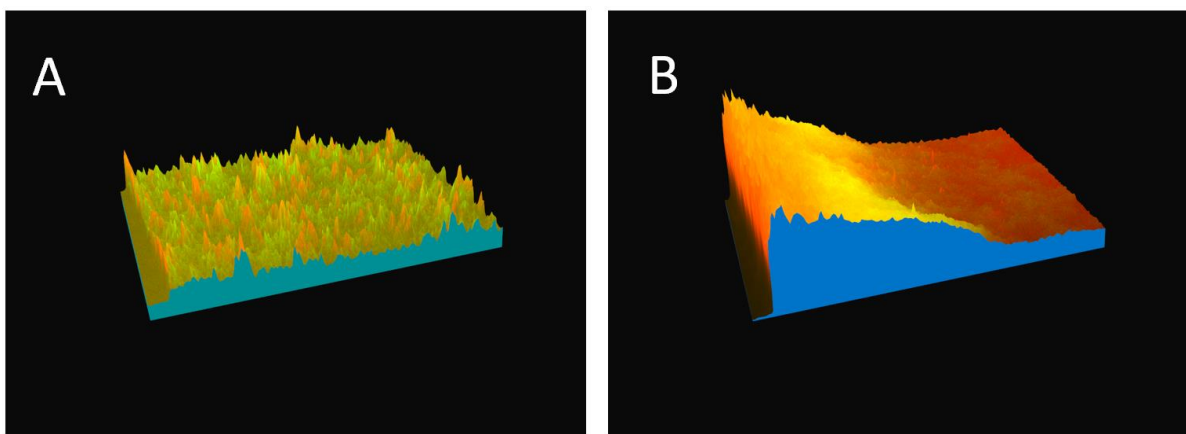
assemblées en biofilm au laboratoire en mode statique présentant ainsi des interactions physiques<sup>5</sup>.

4 des 5 phyla constituant le biofilm initial sont représentés, en effet le 5e phylum *Staphylococcus* s'est trouvé systématiquement exclu des assemblages. Sur cette base, une communauté légèrement différente\* a été implantée en canal millifluidique afin d'étudier le mécanisme de sa formation en conditions contrôlées.

## 2. Mécanismes de formation

Les 4 espèces forment une communauté adhérente suivant un mécanisme déterministe et qui atteint un équilibre dynamique après environ 48h de croissance en flux. L'analyse cinétique de ce processus a permis de mettre en évidence des phases spatio-temporelles caractéristiques<sup>6 7</sup> :

- Une phase de transition spatiale de couche uniforme (Fig.16 A) à vallée en auge (Fig.16 B) qui élabore la forme et la composition du biofilm à l'équilibre.



**Figure 16: Transition spatiale dans le biofilm.** A et B : Figures de demi-canaux dans le sens de la largeur après une croissance de 4h (A) et 37h (B).

- Une phase de détachement liée à des temps caractéristiques du développement du biofilm chez *Pseudomonas fluorescens*, qui est numériquement l'espèce dominante de cette communauté. Après quelques heures, elle change de niche

---

\* Deux espèces furent échangées pour des souches très similaires, afin d'avoir des marqueurs quantitatifs de leur développement. La souche de *Bacillus cereus* échangée par soit *Bacillus thuringiensis* 407 Cry- exprimant la GFP, soit *Bacillus thuringiensis* 407 Cry- exprimant la protéine FAST, et la souche de *Pseudomonas fluorescens* par une souche de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 exprimant la mCherry (Lagendijk et al., 2010).

vers des zones potentiellement plus aérées, ce qui lui donne probablement un avantage important.

De plus l'introduction de la protéine FAST (grâce à notre collaboration avec A. Gautier) à fluorescence inductible, indépendante de l'O<sub>2</sub> a montré les limites des rapporteurs classiques de type GFP dans un environnement anoxique. Ces limites ont été mises en évidence dans le système 4S par l'évolution comparée des cinétiques de la fluorescence de *Bacillus thuringiensis* marquée par la protéine FAST et *Bacillus thuringiensis* marquée par la protéine GFP<sup>104</sup>.

A la recherche d'interactions existantes entre les bactéries, différentes combinaisons ont pu être formées (15 combinaisons possibles) par les membres de la communauté. Ce qui a permis de démontrer 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.

### III. Objectifs et Stratégies

Les résultats suggèrent qu'une réponse à la variation d'O<sub>2</sub> environnemental pourrait orchestrer l'ensemble du développement de la communauté adhérente. Afin d'étudier cette hypothèse et de comprendre comment l'altération des niveaux d'oxygène ambiant détermine potentiellement la constitution de cette communauté et des biofilms multi-espèces, nous avons entrepris d'établir la distribution spatio-temporelle de l'oxygène de ce microcosme modèle.

Notre stratégie est de cartographier la distribution spatio-temporelle de l'oxygène dans le biofilm 4S et dans son environnement en utilisant une sonde fluorescente dont le rendement quantique dépend de la concentration en O<sub>2</sub>. Nous confrontant ensuite les différentes phases de développement du biofilm aux cartographies d'O<sub>2</sub> dans le but de déterminer les relations causales.

Finalement et sur la base de nos observations, nous considérons de tester d'éventuelles perturbations sur le biofilm. Notre idée est d'effectuer des tests d'invasions à différents stades de croissance du biofilm et d'étudier la possibilité d'installation d'une 5<sup>ème</sup> espèce colonisatrice

dans le biofilm à quatre espèces. Les résultats nous permettront de comprendre ces mécanismes ainsi que l'éventuel rôle de l'O<sub>2</sub>.



## Chap. 2. Matériels, méthodes et développements instrumentaux

### I. Souches, milieux et cultures

#### 1. Souches

Nous présentons dans le tableau 1 les informations de classification des souches composant le biofilm 4S ainsi que les souches d'*Escherichia coli* utilisées pour les expériences d'invasion (Chap.5).

**Tableau 1: Tableau récapitulatif de la taxonomie et caractéristiques des espèces utilisées dans ce travail.** (*Escherichia coli* et de la communauté multi-espèces 4S).

Souche	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Kocuria salsicia</i>	<i>Rhodocyclus. sp</i>	<i>E. coli</i>
<b>Classe</b>	Gammaproteobacteria	Bacilli	Actinobacteria	Betaproteobacteria	Gamma Proteobacteria
<b>Ordre</b>	Pseudomonadales	Bacillales	Micrococcales	Rhodocyclales	Enterobacteriales
<b>Famille</b>	Pseudomonadaceae	Bacillacées	Micrococcaceae	Rhodocyclaceae	Enterobacteriaceae
<b>Genre</b>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Kocuria</i>	<i>Rhodocyclus</i>	<i>Escherichia</i>
<b>Espèce</b>	<i>Fluorescens</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Salsicia</i>	<i>Unclassified Rhodocyclus</i>	<i>Coli</i>
<b>Gram</b>	Négatif	Positif	Positif	Négatif	Négatif
<b>Ana/A-érobie</b>	Aérobie strict	Aérobie facultatif	Aérobie	Aérobie	Anaérobie facultatif

#### *Pseudomonas fluorescens* « Pf »

Les *Pseudomonas fluorescens* sont des bacilles ayant des capacités adaptatives aux conditions de vie difficiles. *Pseudomonas fluorescens* se trouve le plus souvent dans le sol, connue pour ses interactions avec les plantes qualifiées parfois de bénéfiques « Plant Growth-Promoting Rhizobacteria »<sup>105</sup>. Dans ce travail nous utilisons deux souches de *Pseudomonas fluorescens* WCS365 (Tab.2). La souche WCS365 wild type et une deuxième exprimant la protéine fluorescente mCherry<sup>106</sup>.

### ***Bacillus thuringiensis* « Bt »**

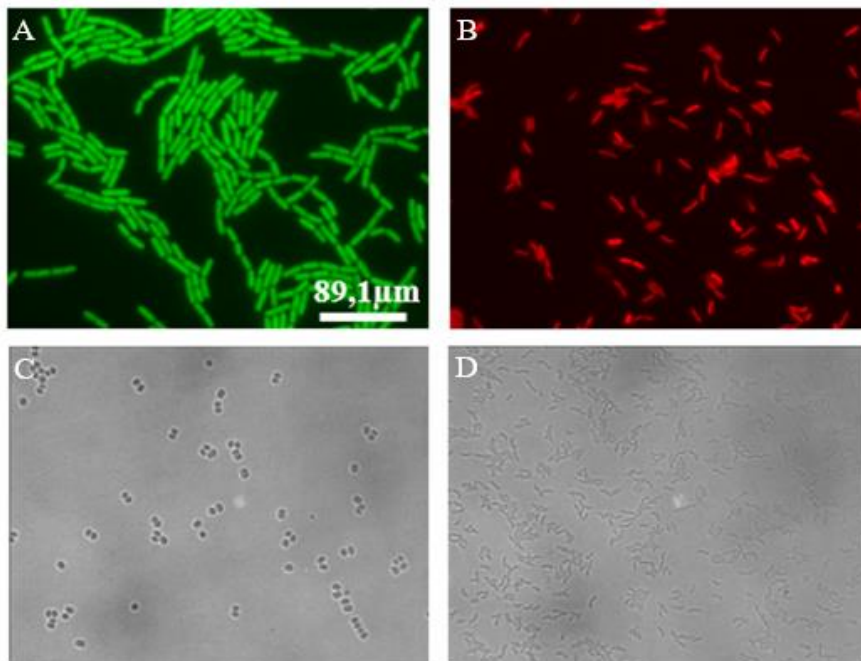
Cette bactérie a été très étudiée pour ses propriétés insecticides<sup>107 108</sup>. Le premier pesticide fabriqué à partir de ses spores a été mis au point en 1938 pour lutter contre les insectes agricoles. C'est un bacille qui sporule. On le trouve pratiquement dans tous les sols, dans l'eau, l'air et les végétaux. Nous utilisons une souche de *Bacillus thuringiensis* 407 cry- exprimant la protéine FAST.

### ***Kocuria salsicia* « Ks »**

Nous utilisons pour ce travail de recherche un *Kocuria salsicia* confirmé par les analyses taxonomiques basées sur 16S et ANI « Average nucleotide identity »<sup>109</sup>.

### ***Rhodocyclus sp.* « Rh »**

La bactérie *Rhodocyclus sp.* est assez mal connue. C'est une bactérie motile de petite taille.



**Figure 17: Image de microscopie confocale des 4 espèces du biofilm.** En fluorescence, (A) : *Bacillus thuringiensis* exprimant FAST et (B) : *Pseudomonas fluorescens* exprimant m-Cherry. En lumière transmise, (C) : *Kocuria Salsicia* et (D) : *Rhodocyclus sp.* Grossissement 100x.

## *Escherichia coli*

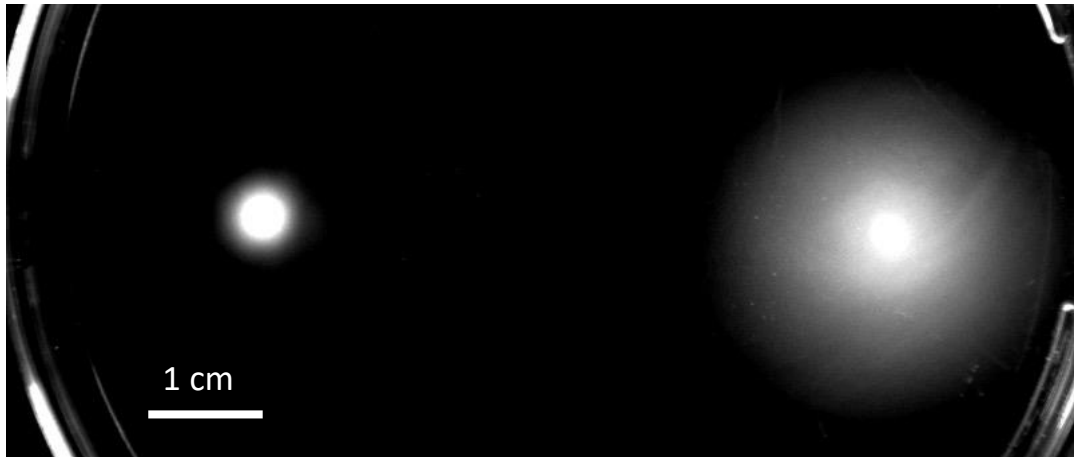
*E. coli* est un hôte commun du microbiote intestinal de l'humain et des animaux, en forme de bâtonnet. Elle est l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie facultative intestinale et parfois pathogène. C'est aussi un modèle de laboratoire très largement répandu et étudié. Dans le cadre de ce travail nous utilisons différentes souches d'*E. coli* K-12 classées comme MG1655 portant toutes le plasmide F<sup>70</sup>. Nous utilisons la souche « wild type » motile et la variante non-motile dans laquelle la séquence d'insertion IS1 située en amont du promoteur *flhD* est manquante, entraînant la suppression de la nage cellulaire flagellaire comme le montrent les tests de motilité (Fig.18).

Afin de suivre le développement du biofilm formé par ces souches en mono ou multi-espèces, nous avons transformé ces souches pour qu'elles expriment constitutivement des protéines fluorescentes en leur intégrant différents plasmides (Tab.2).

**Tableau 2: Tableau récapitulatif des souches d'*Escherichia coli* et des espèces constituant la communauté 4S.** Les souches originelles, les plasmides et les protéines d'intérêt qui leur sont associées. \*<sup>1</sup> : Insertion chromosomique via le plasmide Prn5101-Psar-Yfast. \*<sup>2</sup> : Insertion chromosomique (Lambda pR-mut3).

Souche utilisée	Souche originelle	Plasmide/Chromosome	Protéine exprimée	Motilité
<i>P.fluorescens</i> WCS365 m-Cherry	<i>P.fluorescens</i> WCS365	pMP7605 <sup>110</sup>	<b>m-Cherry</b> : sous le contrôle du promoteur <i>tac</i> <sup>106</sup>	+
<i>B.thuringiensis</i> FAST- chromosomique	<i>B.thuringiensis</i> 407 cry-	FAST* <sup>1</sup>	<b>FAST</b>	-
<i>Kocuria salcia</i>	Wild type	-	-	-
<i>Rhodocyclus sp.</i>	Wild type	-	-	+
<b>Souche d'<i>Escherichia coli</i> k12</b>				
<b>Souche d'<i>Escherichia coli</i> k12</b>	MG1655-F	pF <sup>70</sup> tet GPF* <sup>2</sup>	<b>Pilus F, GFP</b>	-
<b>Souche d'<i>Escherichia coli</i> k12</b>	MG1655-F	pF <sup>70</sup> tet pAG101pR KAN	<b>Pilus F FAST-mCherry</b>	+
<b>Souche d'<i>Escherichia coli</i> k12</b>	MG1655-F	pF <sup>70</sup> tet pAG101pR KAN	<b>Pilus F FAST-mCherry</b>	-





**Figure 18: Test de motilité.** La souche non motile (à gauche) et la motile (à droite). Les cellules ont été inoculées dans un Agar semi-solide 1.25% wt/vol après 24h de croissance en milieu MB à une concentration de  $4 \times 10^8$  cellule/ml.

## 2. Fluorescence dans les biofilms et construction de souches 'FAST'

Nous décrivons (ANNEXE A) pour les personnes intéressées les différents essais de construction de souches que nous avons réalisés dans ce travail. Nous y avons rassemblé les protocoles de biologie moléculaire que nous avons mis en œuvre et les souches obtenues ainsi que les essais infructueux afin de fixer la mémoire de ces essais pour la suite. Le moteur principal de ces constructions est le suivi des différentes cinétiques de chaque espèce constituant le biofilm 4S ainsi que l'espèce colonisatrice *E. coli* dans les études d'invasion du chap.5.

## 3. Milieux & cultures

Durant ce travail de thèse, trois principaux milieux de culture ont été utilisés — deux milieux minimum (M1, MB) et un milieu riche le LB, en version liquide et solide en boîte d'Agar. On trouvera leurs compositions en annexe B.

Le milieu M1 utilisé pour les cultures bactériennes planctoniques — cultures sur la nuit (d'une durée de croissance de 16 à 18h dites over-night (OVN)) et exponentielles (8 à 9h). Sur une échelle chronologique, les OVN sont des cultures lancées la veille de l'expérience biofilm (J-1), où une colonie sur boîte Agar-M1 est introduite dans 5ml de M1 avec l'antibiotique correspondant à chaque souche (Tab.3) en tube falcon de 50ml. Ensuite le tube est vortexé et incubé à 30°C avec une agitation de 200rpm pendant la nuit. L'étape de vortex est très importante pour éviter la formation des amas et agrégats de bactéries dans la culture liquide. La

culture exponentielle est obtenue par la dilution de la culture OVN dans 5ml de M1 sans antibiotique, incubée à 30°C avec une agitation de 200rpm. Le milieu MB est utilisé pour diluer les cellules issues de la culture exponentielle à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules/ml avant l'injection dans les canaux destinés à la croissance du biofilm qui se déroule sous flux continu de MB à un débit bien contrôlé de 1ml/h.

La culture sur boîte est réalisée sur M1 Agar + antibiotique pour sélectionner les souches par étalement à partir du glycérol stock -80°C. Ces boîtes sont incubées à 30°C pendant environ 62h (J-4) et seront ensuite conservées à 4°C pour une durée qui ne dépasse pas les 5-9 jours.

**Tableau 3: Tableau récapitulatif des antibiotiques correspondants aux espèces utilisées**

<b>Souche</b>	<b>Antibiotique</b>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS365 m-Cherry	Gentamicine
<i>Bacillus thuringiensis</i> FAST-c	Sans antibiotique
<i>Kocuria salcisia</i>	oxotrophine
<i>Rhodocyclus sp.</i>	Kanamycine
<i>Escherichia coli</i> F' FAST-mCherry	Tétracycline & kanamycine
<i>Escherichia coli</i> F'	Tétracycline
<i>Escherichia coli</i> F' GFP	Tétracycline & Ampicilline
<i>Escherichia coli</i> F' YFP	Tétracycline & Kanamycine

## II. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technologie de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une particule. Les cellules en suspension dans un flux passent une à une dans un faisceau laser. La diffusion physique de la lumière émise par la source lumineuse dépend de la taille et de la granularité cellulaire (contenu en granule, structure plus ou moins segmentée du noyau). La diffusion dans l'axe de la source lumineuse (forward scatter, FSC) renseigne sur la taille, la diffusion à 90°C (side scatter, SSC) renseigne sur la granularité ou structure. La lumière du laser va également exciter des fluorochromes dont on pourra mesurer l'émission à différentes longueurs d'onde.

Nous utilisons un FACS Calibur de Becton Dickinson Biosciences équipé d'un laser argon émettant un faisceau monochromatique d'une longueur d'onde de 488nm. Une série de filtres sélectionne des émissions à 530/30 nm (acquisition FL1), 585/42nm (acquisition FL2) et > 670nm (acquisition FL3) (cf. Annexe C). Notre principale application est d'évaluer et contrôler les niveaux de fluorescence des bactéries après les transformations introduisant l'expression de protéines fluorescentes. Les échantillons de bactéries à analyser sont dilués dans le tampon de cytométrie (FACS Flow BD constitué de chlorure de sodium, chlorure de potassium, phosphate de potassium monobasique, hydrogénophosphate disodique, phénoxyéthanol, fluorure de sodium et eau) à une concentration maximale de  $10^6$  cellules/ml.

Pour la visualisation et la quantification de l'intensité de la fluorescence FAST (en vert) nous étudions l'émission FL1, et FL3 pour l'intensité de fluorescence m-Cherry (en rouge).

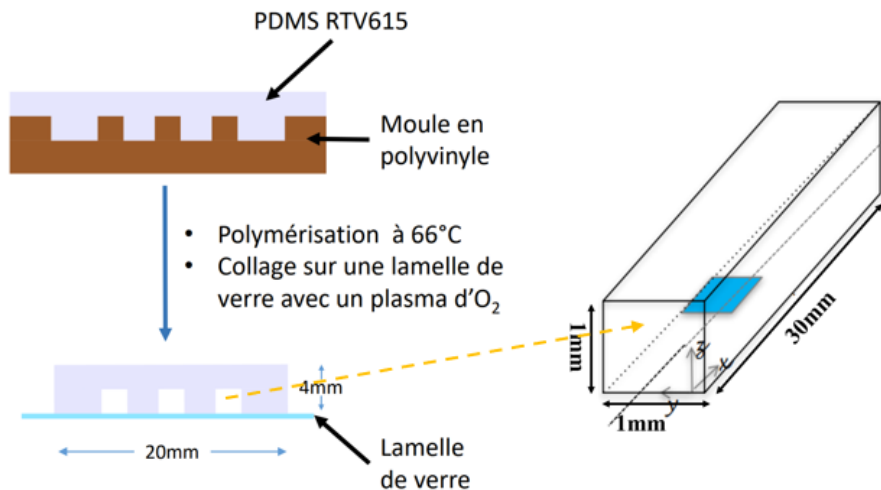
### **III. Croissance bactérienne en multi-plaques (Tecan)**

Dans le but de caractériser et comparer des vitesses de croissance en mode planctonique des différentes souches d'*E. coli*, nous mesurons l'absorbance (OD) à 600nm au cours de temps avec un lecteur de plaque. La mesure est faite en plaque 48 puits Greiner (flat bottom) sans couvercle et en utilisant un lecteur de plaque TECAN Infinite M200 pro. Les cultures en plaques sont incubées à 30°C, sous agitation orbitale de 3.5mm (200rpm) durant 120sec puis linéaire de 4.5mm (352rpm) 90sec, cela pour assurer une bonne homogénéité de nos cellules dans nos puits. Les mesures sont effectuées toutes les 10min sur des périodes d'environ 24h. Les mesures d'OD 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 mesures acquises par le TECAN. Pour les courbes d'OD, les données ont été étudiées en utilisant le logarithme népérien des valeurs mesurées.

### **IV. Dispositif millifluidique : Formation du biofilm**

Microfabrication : Nous faisons croître notre biofilm bactérien sous flux dans des canaux millifluidiques ayant une longueur de 30mm, une largeur de 1mm et une hauteur également de 1mm (Fig.19). Ces canaux sont moulés dans un petit bloc parallélépipédique constitué d'un mélange de polydiméthylsiloxane (PDMS) (RTV615A+B ; Momentive Performance Materials). Nous commençons par bien mélanger la base A et l'agent réticulant B

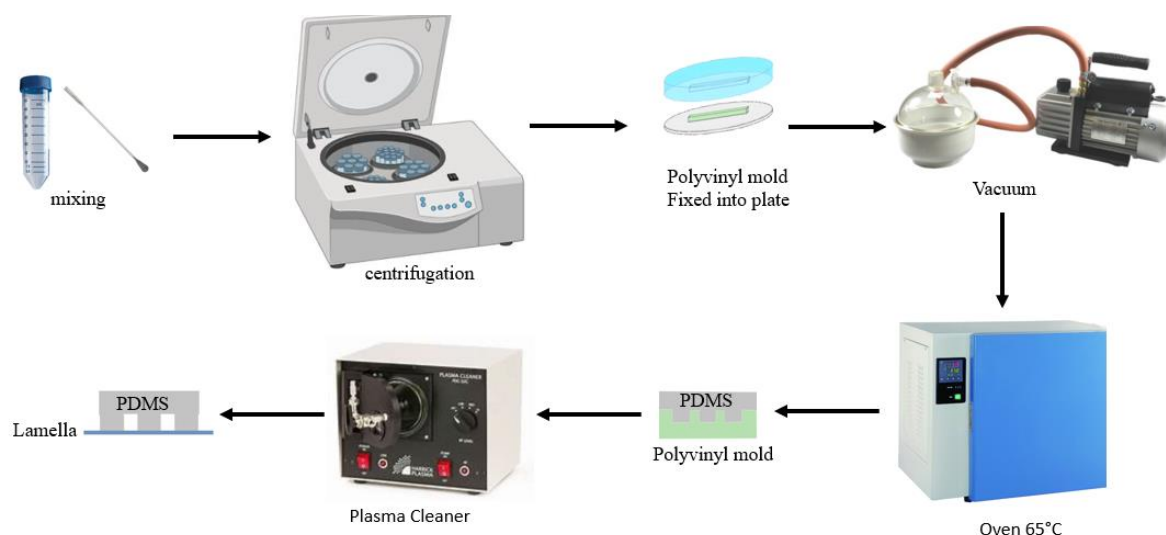
à un pourcentage de 90% et 10% respectivement. Ce mélange est ensuite centrifugé pendant 5min à 3000rpm pour évacuer les bulles d'air puis versé à température ambiante dans des moules préalablement micro-usinés en polyvinyle chloride (Fig.19 et Fig.20).



**Figure 19: microfabrication et Dimensions d'un canal millifluidique.**

Finalement, on pratique une étape de dégazage sous vide avant de placer le tout dans un four à 65°C pour laisser réticuler (Fig.20). Les patches en PDMS contenant les canaux sont ensuite découpés et percés à l'aide d'un emporte-pièce afin de permettre l'injection des fluides en continu pendant les expériences. Les entrées et sorties du canal millifluidique sont percées à la taille des futurs raccords et les tuyaux 0.25mm pour l'entrée liée aux seringues de milieux de nutriments et 0.75mm la sortie reliée « aux poubelles ».

Plasma cleaner : Le patch contenant les canaux ainsi qu'une lamelle de verre sont nettoyés avec de l'isopropanol avant d'être traités au plasma O<sub>2</sub> (Harrick) et immédiatement scellés les uns aux autres (Fig.20). Le traitement de la surface au plasma conduit à fonctionnaliser la surface du PDMS avec des trichlorosilane, ce qui permettra de lier le PDMS de manière covalente (à l'échelle atomique) à la surface de verre grâce à la création de liaison Si-O-Si. Nous obtenons ainsi des canaux fermés à l'exception des entrées sorties précédemment percées. Ces canaux sont ensuite remplis avec de l'eau ultrapure milli-Q, et laissés à reposer pour au moins 2h.



**Figure 20: Etapes de préparation des canaux microfluidiques en PDMS.**

### Encart 1 : Pourquoi le PDMS ?

C'est un polymère organo- minéral (une structure contenant du carbone et du silicium) de la famille des siloxanes, très utilisé dans la fabrication « microfluidique ».

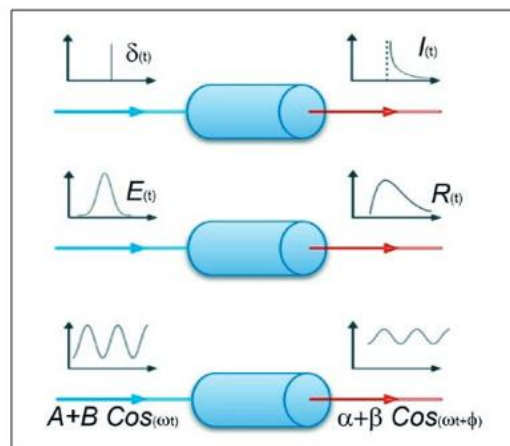
- Le PDMS est transparent aux fréquences optiques (240nm-1100nm), ce qui facilite l'observation sous microscope.
- Le PDMS à une autofluorescence faible <sup>111</sup>
- Le PDMS est considéré comme biocompatible et a un faible coût comparé aux matériaux utilisés précédemment (comme le silicium).
- Le PDMS se colle de manière étanche sur du verre ou sur une autre couche de PDMS avec un simple traitement plasma. Ceci permet de fabriquer des dispositifs en PDMS multicouches.
- Le PDMS est viscoélastique ce qui permet une connexion facile et sans fuite des connecteurs.
- Le PDMS est perméable aux gaz. Ceci permet d'effectuer des cultures cellulaires. Et de contrôler/changer la quantité de gaz à travers le PDMS.

Pendant la croissance du biofilm, la circulation du milieu est assurée par des tubes microbores Tygon (0.020" ID and 0.06" OD) approvisionnés par Phymep (France). Après l'inoculation des bactéries en phase exponentielle dans les canaux à une concentration de  $10^6$  cellules/ml pour chacune des espèces, nous installons en entrée de canal de fins connecteurs métalliques qui forment des goulots limitant la remontée à contre-courant par des bactéries qui

nagent. Le biofilm est stabilisé ensuite pendant 1h-1h30 à 30°C avant qu'on applique un flux de milieu contrôlé dans les canaux généralement à un débit de 1ml/h.

## V. FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

La microscopie à imagerie de durée de vie de fluorescence (FLIM), une technologie utilisée pour recueillir et interpréter une image de durée de vie de fluorescence. La technique permet de mesurer la décroissance de fluorescence d'un fluorophore sur une échelle de temps de quelques nanosecondes à quelques milliers de nanosecondes. Les mesures des durées de vie de fluorescence engagent deux types d'approches distinctes : la méthode impulsionnelle et la méthode fréquentielle.

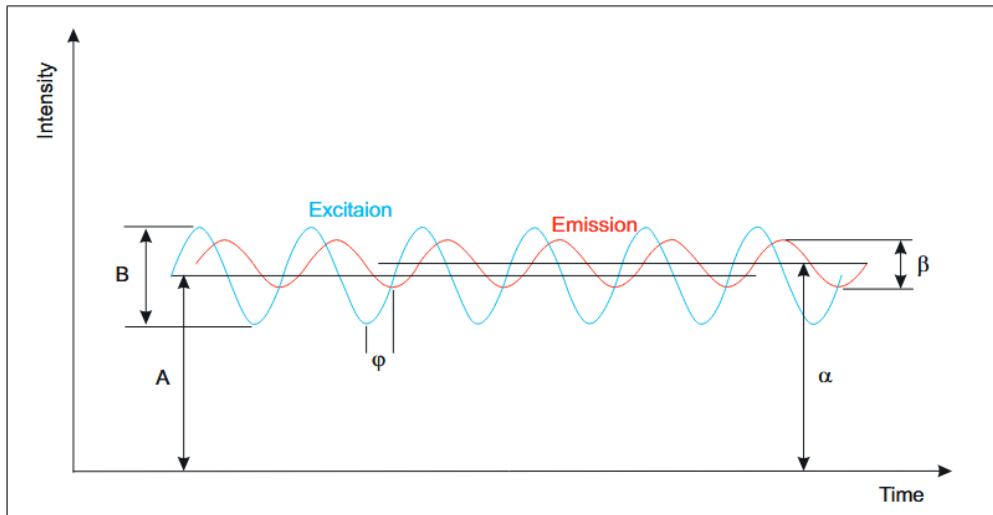


**Figure 21: Représentation schématique du principe des techniques de mesure de la fluorescence résolue dans le temps.** En haut : Une impulsion d'excitation appliquée à un échantillon fluorescent (cylindre bleu) et cet échantillon émet une fluorescence avec une décroissance temporelle exponentielle  $I(t)$ . En bas : On applique une excitation à modulation sinusoïdale et on mesure l'émission sinusoïdale résultante.

Dans la méthode impulsionnelle avec des flashes très courts de l'ordre de la fraction de nanoseconde, l'excitation est pulsée et on mesure la décroissance de fluorescence de la molécule. On analyse l'émission comme un signal à décroissance exponentielle (Fig.21).

### 1. Principe de la mesure fréquentielle

La méthode fréquentielle consiste à exciter le fluorophore avec une lumière continue, mais modulée en intensité à une fréquence donnée. La fluorescence émise par le fluorophore étudié est modulée à la même fréquence avec un retard de phase,  $\Delta\phi$ , causé par la durée de vie non nulle du fluorophore. De même, l'amplitude de la modulation est plus faible, ainsi que l'intensité moyenne.



**Figure 22: Illustration de la modulation et du déphasage dans la mesure fréquentielle.** La ligne bleue représente la forme d'onde d'excitation avec une intensité moyenne du signal A et une amplitude B. La ligne rouge représente la forme d'onde de l'émission. En raison de la durée de vie finie de l'état excité, la forme d'onde d'émission est déphasée ( $\phi$ ) et démodulée, c'est-à-dire que l'amplitude de la forme d'onde d'émission ( $\beta$ ) divisée par le signal moyen ( $\alpha$ ) est réduite par rapport à la modulation de l'excitation ( $B/A$ ).

Dans le domaine fréquentiel, deux paramètres importants liés à la durée de vie sont obtenus à partir de l'émission détectée (Fig.22).

- Le déphasage : plus la différence de phase entre l'excitation et l'émission est faible, plus la durée de vie de l'état excité est courte.
- La modulation : le retard entre l'excitation et l'émission entraîne une perte de modulation dite démodulation du signal de fluorescence. Plus la durée de vie de fluorescence est élevée, plus la démodulation est importante.

La durée de vie déterminée à partir de la phase (éq.1) est souvent appelée "durée de vie de la phase  $\tau_\phi$ " et la durée de vie déterminée à partir de la modulation (éq.2) est appelée "durée de vie de la modulation  $\tau_M$ ". Le déphasage peut varier de 0 à  $\pi/2$ , et la modulation relative de 0 à 1.

$$\tau_\phi = \omega^{-1} \tan \Delta\phi \quad (\text{éq.1})$$

$$\tau_M = \frac{1}{\omega} \left[ \frac{1}{M^2} - 1 \right]^{1/2} \quad (\text{éq.2})$$

## Encart 2 : Mesure fréquentielle : Équations

L'équation du signal de l'excitation modulée à une fréquence  $\omega$  est donnée par l'équation suivante :

$$E_{\omega}(t) = E_0[1 + M_{E,\omega} \sin(\omega t - \phi_{E,\omega})]$$

Où  $E_0$  est la composante continue du signal,  $M_{E,\omega}$  est l'amplitude relative de la modulation de l'excitation est donnée par B/A (Fig.22), et  $\omega$  est la fréquence angulaire donnée par  $\omega = 2\pi f$  ( $f$  est la fréquence de modulation).

L'émission décalée en phase de  $\phi$  par rapport à l'excitation est donnée par l'équation suivante :

$$F_{\omega}(t) = F_0[1 + M_{F,\omega} \sin(\omega t - \phi_{F,\omega})]$$

$F_0$  est la composante continue du signal émis,  $M_{F,\omega}$  est l'amplitude relative de la modulation de l'émission donnée par  $\beta/\alpha$ .

Ces signaux d'excitation et d'émission affichent un déphasage :

$$\Delta\phi = \phi_{F,\omega} - \phi_{E,\omega} = \text{Arctan}(\omega\tau)$$

et une démodulation ou modulation relative,  $M$ , égale à :

$$M = \frac{M_{F,\omega}}{M_{E,\omega}} \quad \& \quad M^2 = 1 / (1 + (\omega\tau)^2)$$

## 2. Mesure dans le biofilm : Détails techniques

La détermination du déphasage et la démodulation est assurée par le logiciel LI-FLIM par ajustement des fonctions sinusoïdales d'excitation et d'émission. Pour cela, avant toute mesure de temps de vie de fluorescence, nous commençons par mesurer une référence, dont on connaît la durée de vie. Pendant ce travail de thèse, nous utilisons la fluorescéine ayant un temps de vie est de  $4\text{ns}^{112}$ . Nous considérons que le signal de la référence donne les caractéristiques de l'excitation, soit formellement un temps de vie nul, car nous travaillons à une fréquence de 0.1MHz. La fréquence de modulation est un paramètre critique. En effet, la sonde que nous utilisons, a une durée de vie longue comparée à d'autres molécules, environ  $1600\text{ns} \pm 150\text{ns}$  à

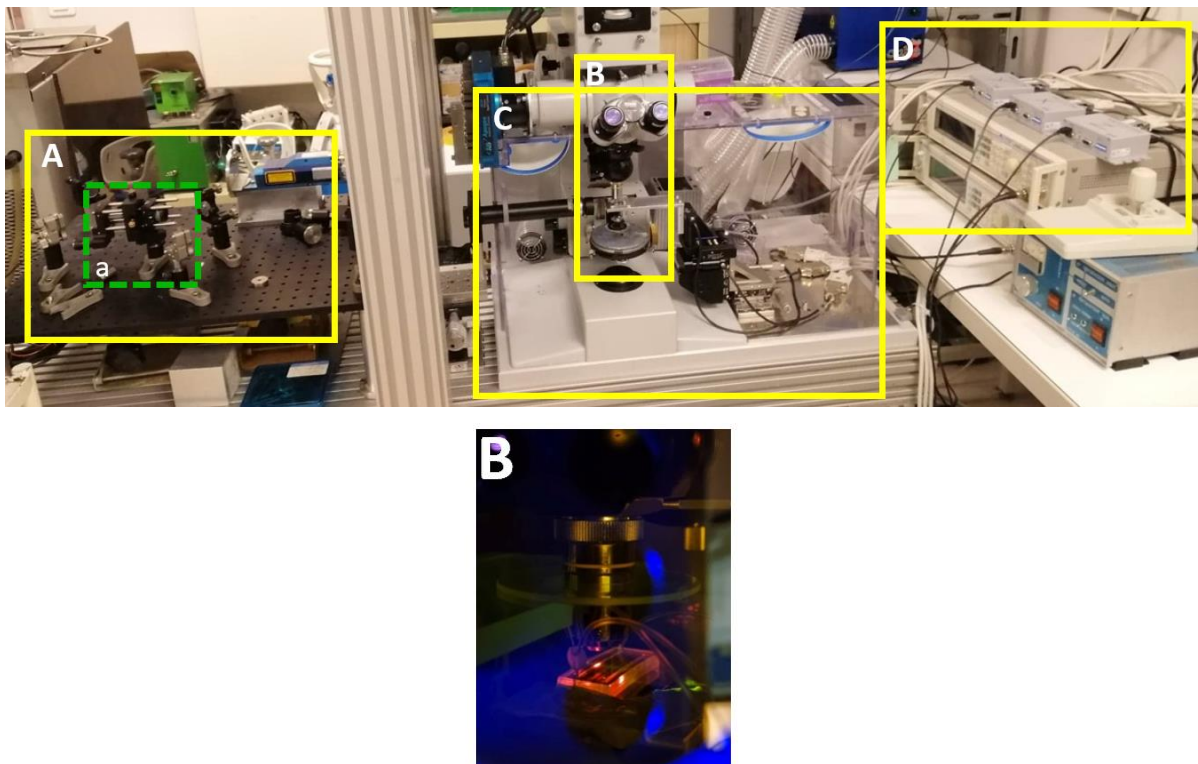


pression atmosphérique et 30°C. Cette durée de vie augmente lorsque la concentration en oxygène décroît. Dans l'environnement du biofilm, nous nous attendons à atteindre des valeurs de temps de vie élevées (>4000ns). Nous avons donc choisi d'utiliser la fréquence de modulation la plus faible, accessible avec notre dispositif électronique. Tous les paramètres de la mesure sont réglés à travers l'interface FLIM Lambert Instruments.

NB : Tout le long de ce travail, les temps de vie analysés et présentés sont les temps de vie de modulation. Théoriquement et selon le principe de mesure, les deux mesures ont la même efficacité et fiabilité.

## VI. Dispositif expérimental

Quatre grandes parties constituent notre dispositif expérimental et font sa particularité :



**Figure 23:Dispositif expérimental.** A : Excitation (a : Filtre spatial), B : Échantillon et visualisation, C : Contrôle de température et d'O<sub>2</sub>, D : Partie électronique.

## 1. Contrôle de température et de l'O<sub>2</sub>

Pour que l'atmosphère de notre expérience soit parfaitement contrôlée en température et en oxygène, nous avons installé une première enceinte dédiée au contrôle de la température, englobant tout le microscope, désignée spécifiquement avec Life Imaging Services sur la base d'un cube d'environ 80cm de côté. À l'intérieur de cette boîte, une deuxième enceinte plus petite, que l'on appellera, « enceinte réduite » est installée au plus près de l'échantillon avec un contrôle d'oxygène ambiant. La variation du taux d'oxygène est possible par l'injection d'un mélange « Air-Argon » à un débit de 100L/h commandé par une boîte dite « the brick » (Life Imaging Services). Une vérification de l'application de la consigne fixée par le contrôleur du taux d'oxygène est effectuée grâce à un détecteur d'O<sub>2</sub> placé dans l'enceinte réduite. Ce détecteur est commandé par ARDUINO permettant d'enregistrer en continu la valeur du taux d'O<sub>2</sub> dans l'enceinte.

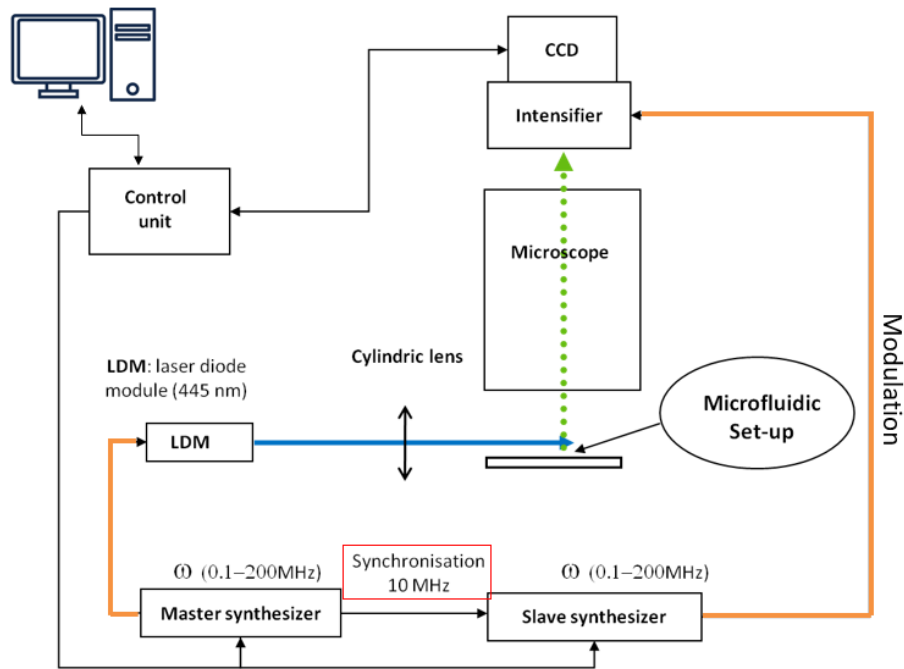
## 2. Microscope

Nous utilisons un microscope droit ZEISS UMSP 80 avec un objectif d'un grossissement x10 et d'une ouverture numérique de 0.2. Sur le trajet optique, on trouve une lentille de grossissement x6. Le facteur de grossissement est donc 16. Le microscope est équipé de 3 platines motorisés (PI C-663 STEPPER MOTOR CONTROLLER (Mercury Step)) contrôlées à la fois par « PI software » et « Matlab ».

Pour vérifier le stade de développement du biofilm, nous prenons des images en lumière transmise avec une caméra « Flir » (objectif de 8mm), installée sur l'un des oculaires du microscope. Nous récupérons des images capturant un champ de 1000µm x 1000µm en xy. Cette caméra est commandée par le logiciel « micromanager », et nous utilisons un temps d'exposition de 50ms pour toutes les acquisitions des différentes expériences.

## 3. Montage électronique

La partie électronique est constituée de deux synthétiseurs de fréquence et d'une unité de contrôle, ainsi que d'un intensificateur lié à une caméra CCD.



**Figure 24: Compartiment électronique du dispositif.** Connexions électroniques permettant la modulation des signaux et l'acquisition de la mesure FLIM.

- Synthétiseurs de fréquence

Nous utilisons deux synthétiseurs de fréquence (Générateur de signal IFR Aeroflex 2025 (USA)) (0.1-250mHz) synchronisés à une fréquence fixée à 10MHz par le constructeur. Un « master » qui module le laser et un « slave » qui module la photocathode.

Ce qu'on regarde c'est le déphasage du signal entre les deux sinusoïdes excitation et émission. Ces sinusoïdes sont obtenues suite à des mesures d'intensité à 12 phases (0,30,60,90, 120, jusqu'à 360°). En effet plus on collecte de points plus on construit de manière fine la sinusoïde. On peut effectuer entre 6 et 36 phases. Cependant, par expérience, on a observé qu'au-delà de 12 phases nous n'améliorons plus le fit de la sinusoïde. C'est donc un compromis entre un temps raisonnable d'acquisition et un résultat de fit robuste et précis.

- Détecteur CCD :

La différence entre un microscope classique et un microscope FLIM réside dans le détecteur. Dans le cas de notre application, et pour analyser la modulation de l'émission, notre détecteur doit être modulable. Nous ne pouvons pas moduler directement la caméra CCD (1024 \*1024 pixels). Par conséquent la détection CCD est couplée à un étage d'amplificateur constitué par une photocathode modulable et une galette de microcanaux (25 mm Modulated low light

level ICCD Camera II25MD, Lambert Instruments). Dans ce système, le bruit est principalement dû à des effets thermiques, c'est pourquoi la photocathode est refroidie à 10°C par un système thermoélectrique pouvant descendre jusqu'à -5°C. Le système est relié à un ordinateur par une connexion RS232C qui permet de récupérer les données et de commander les différents paramètres, via le logiciel LIFLIM développé par la société Lambert Instruments.

Les résultats sont récupérés sous forme d'une image de 1024x1024 pixels capturant un champ de 1,6mm x 1,6mm en x, y. Nous utilisons un temps d'exposition de 500ms pour toutes les acquisitions des différentes expériences.

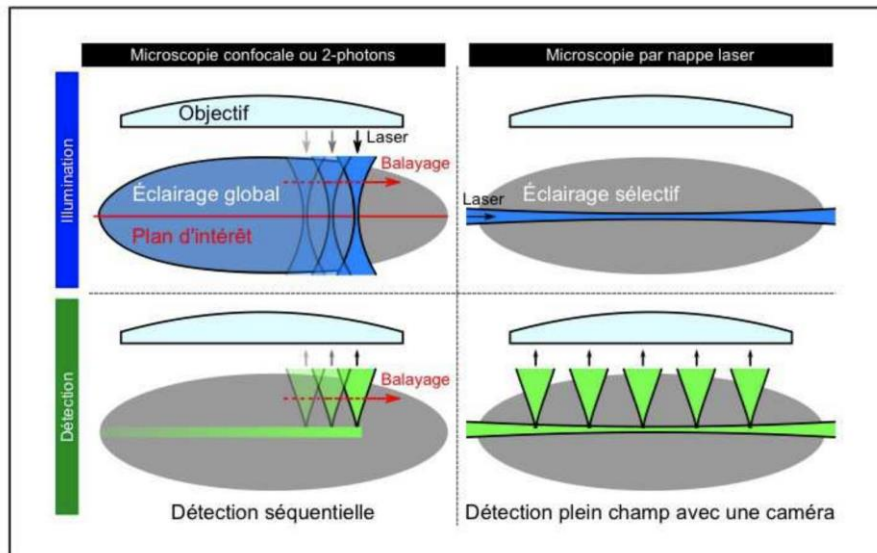
## **4. Montage optique – Nappe Laser**

### **4.1.Modulation du LASER**

Nous utilisons, une excitation continue avec une modulation temporelle sinusoïdale de l'amplitude à 0.1MHz. La Diode Laser (LDM 442.50.A350, société OMICRON) ayant un pic d'émission à 445nm, une puissance 50mW, et une modulation analogique jusqu'à 350MHz est commandée par un logiciel dit omicron. L'intensité du laser varie entre 100-300mV, nous fixons un offset de 200mV. L'excitation est une intensité continue sur laquelle on rajoute un signal sinusoïdal oscillant autour de la valeur d'offset.

### **4.2.Nappe LASER**

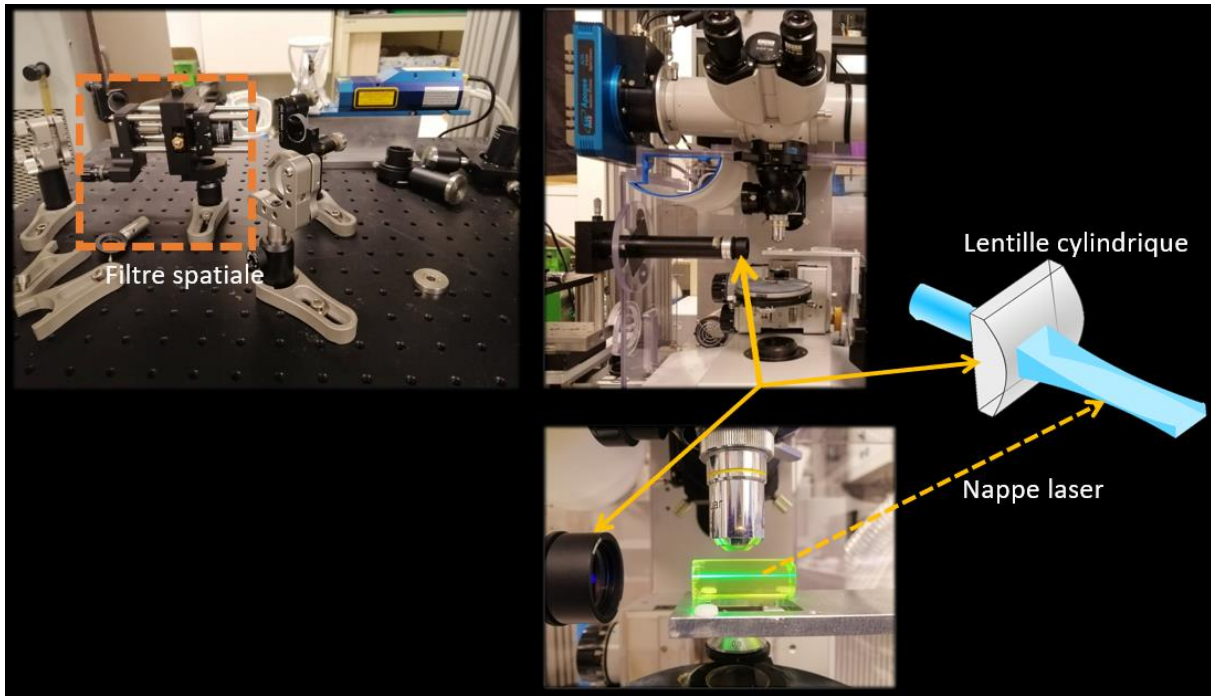
Une partie importante de mon travail de thèse a consisté en la mise au point et la caractérisation du montage optique dédié à la cartographie tridimensionnelle de l'oxygène dans le biofilm. Nous avons installé une illumination par nappe laser, qui permet de passer de la situation où l'on éclaire et enregistre un seul point du plan focal de l'objectif, à une situation où tout le plan focal est illuminé. L'échantillon est éclairé sur le côté par une nappe laser positionnée dans le plan focal de l'objectif (Fig.25).



**Figure 25: Avantage de l'utilisation d'une nappe laser : illumination d'un plan d'intérêt<sup>113</sup>.**

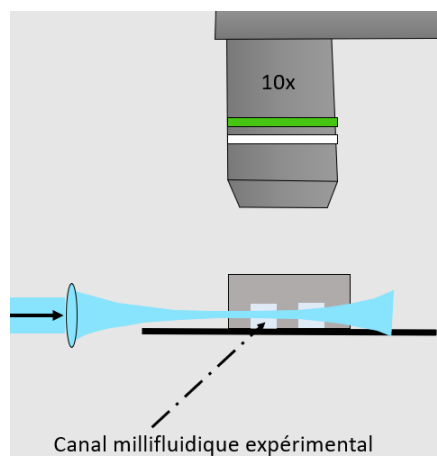
En plus des gains en performance de l'imagerie, la microscopie par nappe laser présente un avantage du point de vue de la biologie de l'échantillon. Avec les techniques point à point, où l'illumination et l'observation sont colinéaires, une grande partie de l'échantillon subit inutilement l'illumination. Cependant avec la technique d'illumination par nappe laser, seul un plan de l'échantillon est illuminé et imagé, ce qui limite au maximum les effets de photoblanchiment.

Nous utilisons une lentille cylindrique convergente d'une focale  $f=50\text{mm}$  (Fig.26). Le faisceau sera amené de la source au moyen de plusieurs miroirs réfléchissants diélectriques (Thorlabs 881 502) dans un trajet optique bien déterminé. Un filtre spatial (Thorlabs, référence KT311) a pour rôle d'améliorer le caractère gaussien du faisceau laser et par la suite améliorer l'épaisseur de la nappe pour des mesures plus précises en 3D. Il est installé entre deux miroirs réfléchissants sur le trajet optique (Fig.26). Pour la mesure de référence et à cause des phénomènes de photoblanchiment de la fluorescéine, nous utilisons un filtre de densité optique (0.5 ou 0.6 ou 1.3) pour atténuer l'intensité du laser sur le trajet optique avant d'arriver à la lentille.



**Figure 26: Montage optique.** Nappe Laser passant par un barreau d'uranyle (désignée par une flèche orange trait discontinu) obtenue par le passage du laser à travers d'un filtre spatial (encadré sur la figure) ensuite une lentille cylindrique fixée dans un tube optique (désignée sur la figure par une flèche orange, trait continu).

La lentille cylindrique est fixée dans un tube optique (Fig.26), lui-même fixé sur des platines motorisés x, y et z. La position du tube est très peu modifiable elle est fixée par le fait que le laser doit passer droit au centre de la lentille pour une construire correctement la nappe laser. Avant de lancer une expérience, nous vérifions le réglage en visualisant la nappe dans le barreau d'uranyle (Fig26).

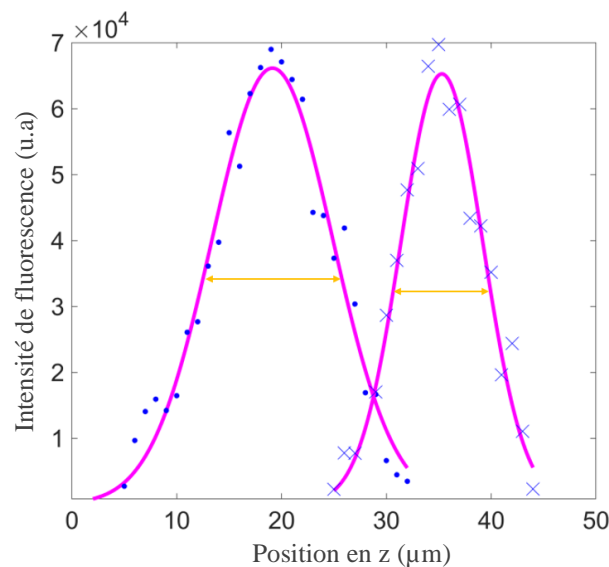


**Figure 27: Illumination par nappe laser.** Le canal millifluidique en PDMS est illuminé par le côté.

L'épaisseur effective de la nappe dans l'échantillon est mesurée en imageant des billes fluorescentes fixées dans l'Agar. Cette épaisseur définit la résolution spatiale en z de l'expérience par l'éclairement d'un plan unique du canal millifluidique.

### Caractérisation de la nappe Laser

En théorie, l'épaisseur minimale de la nappe est donnée par :  $e_{Nappe} = d * \frac{f_2}{f_1}$  où d est le diamètre du trou du filtre spatial (10 $\mu$ m),  $f_1$  la focale de la lentille de sortie du filtre spatial (40 mm) et  $f_2$  la focale de la lentille cylindrique (50 mm) soit 12,5  $\mu$ m dans la zone de focalisation maximale. Afin de déterminer l'épaisseur effective au site de mesure, nous remplissons un canal de mesure de microbilles de 0.1  $\mu$ m de diamètre. Une solution à 2% d'Agar est réalisée à chaud et ajustée empiriquement à une concentration permettant d'obtenir une distribution de billes bien isolées puis refroidie. Les billes sont assimilables à des sources ponctuelles grâce à leur faible diamètre. Nous réglons la position de la nappe laser et celle de l'échantillon pour obtenir la mise au point sur un ensemble de billes dans le plan focal de l'objectif. Nous enregistrons ensuite une pile d'images en déplaçant la nappe par pas de 1 $\mu$ m sur toute la hauteur du canal. On extrait alors le profil d'intensité de chaque bille en fonction de la position de la nappe en z à une position (x,y).



**Figure 28: Méthode de la Largeur à mi-hauteur.** Exemples de profil d'intensité de deux billes en fonction de la position de la nappe en z à leurs positions (x, y). Les données expérimentales sont présentées par des points -●- et -x- bleus. Les ajustements sont présentés par le trait continu rose. La largeur à mi-hauteur est présentée par la double flèche orange.

Chaque profil présente bien un caractère gaussien, dont l'ajustement nous permet d'estimer l'épaisseur de nappe qui sera donnée par la largeur du profil gaussien à mi-hauteur (Fig.28). À partir de la distribution des largeurs à mi-hauteur en fonction de la position des billes en x et y déterminée, nous mesurons une moyenne de  $13,31\mu\text{m} \pm 2,8$ .

## VII. Mesure de la concentration en O<sub>2</sub>

### 1. Principe de l'utilisation des micelles de ruthénium (MiRu)

Nous avons donc choisi de mesurer la concentration locale en oxygène en utilisant une sonde fluorescente — le complexe de ruthénium (Ru) (Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthénium (II) dichloride C<sub>72</sub>H<sub>48</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>Rr (Alfa Aesar-ThermoFischer)) — dont le rendement quantique dépend d'O<sub>2</sub>. Notre méthode consiste à déterminer le temps de vie de fluorescence de cette sonde. La fluorescence du Ru est sensible à la concentration en oxygène du fait d'un phénomène de « Quenching ». En effet, les collisions entre le ruthénium et les molécules d'oxygène provoquent des désexcitations sans émission de lumière qui diminuent le temps de vie observé<sup>114</sup>. Ce phénomène est décrit par la loi de Stern-Volmer :

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_q \cdot [O_2]$$

Où  $\tau_0$  est le temps de vie de fluorescence en absence d'O<sub>2</sub>,  $\tau$  le temps de vie de fluorescence en présence d'O<sub>2</sub>,  $K_q$  la constante reliée au taux de désactivation, et  $[O_2]$  la concentration en oxygène.

Notre méthode consiste à mesurer les temps de vie en microscopie par FLIM pour accéder à la distribution spatiale des temps de vie de notre sonde.

### 2. Préparation des micelles de ruthénium (Adaptation de la sonde pour la mesure en biofilm)

Les collisions entre les molécules de Ru et celles d'oxygène provoquent la formation d'oxygène dans un état singulet toxique pour les bactéries. Pour neutraliser cette toxicité, nous avons encapsulé la sonde (complexe du ruthénium) dans des micelles lipidiques<sup>82</sup> suivant la méthode de Douarche et collaborateurs . Ainsi, l'oxygène singulet est formé dans les micelles



et désactivé avant qu'il n'atteigne la membrane bactérienne, ce qui protège de la toxicité du ruthénium.

Nous mélangeons 400µl de lipides (Polar lipids, 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-N [Methoxy(Polyethylene glycol)-2000] (ammonium salt, AVANTI 880160C) à une concentration de 25mg/ml dans le chloroforme, avec 20µl de la solution de ruthénium à une concentration de 1mM dans un tube à essai en verre. La phase liquide est ensuite évaporée sous vide pendant 18h afin d'éliminer le chloroforme. Puis dans un bain-marie, préchauffé à 90°C, nous ajoutons 1ml d'eau distillée sous agitation légère pour aboutir à une structuration des micelles autour du complexe ruthénium, mais également des amas et agrégats de lipides qui sont indésirables. Nous transférons ensuite le contenu des tubes à essai dans des tubes Eppendorf pour une étape de centrifugation à 12500rpm pendant 30min et prélevons le surnageant exempt d'agrégats. Finalement pour concentrer notre échantillon, nous filtrons la solution avec des tubes Eppendorf à filtres (VIVASPIN 500, 10kDa MWCO).

### 3. Calibration de la sonde

Afin de relier le temps de vie à la concentration en O<sub>2</sub> par l'équation de Stern-Volmer, nous devons déterminer les constantes  $K_q$  et  $\tau_0$ . Pour cela, nous varions les pourcentages d'oxygène à 30°C et mesurons les temps de vie des Mi-Ru. Nous pouvons alors tracer la droite :

$$1/\tau = K_q/\tau_0 [O_2] + 1/\tau_0 \quad \text{de pente } K_q/\tau_0 \text{ et d'ordonnée à l'origine } 1/\tau_0$$

(Fig.29).

Ces expériences sont effectuées en une cuve ouverte, et on fait varier l'oxygène dans l'enceinte réduite. La stabilisation du pourcentage visé est vérifiée en enregistrant les images de temps de vie jusqu'au plateau. Les pourcentages d'O<sub>2</sub> dans l'enceinte réduite sont vérifiés par des mesures simultanées effectuées par un détecteur placé dans l'enceinte contrôlée. Les constantes sont extraites du fit linéaire de :

$$1/\tau = p_1 * [O_2] + p_2$$

Nous obtenons :

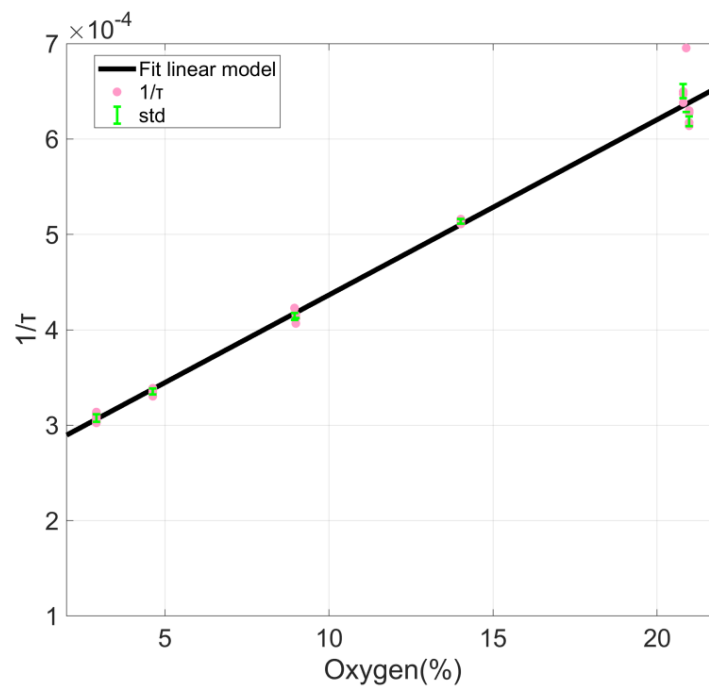
$$\tau_0(ns) = \frac{1}{p_2} = 3955,69 \text{ ns} \pm 197,78$$

et :

$$K_q(\%) = p_1 * \tau_0 = 0,072666 \% \pm 0,00363\%$$

À partir des constantes calculées et du temps de vie, nous obtenons les concentrations locales en O<sub>2</sub> en appliquant la formule de conversion suivante :

$$[O_2] = \frac{\frac{\tau_0}{\tau} - 1}{K_q}$$



**Figure 29: Calibration.** Ajustement des données  $1/\tau$  en fonction de  $[O_2]$  selon un modèle linéaire (trait noir). Les points de la droite sont des données expérimentales obtenues sur différents jours d'expériences.

## VIII. Microscopie épifluorescence

Pour les enregistrements de fluorescence classiques en épifluorescence, nous avons utilisé un microscope inversé NIKON TE300 avec une platine x, y, z motorisée. Les images obtenues à l'aide d'un objectif 20x Fluor plan (NA 0.45 WD 8,2-6,9mm). Les acquisitions en lumière transmise ont été recueillies en illumination directe (sans phase). Pour les acquisitions de la fluorescence du complexe FAST : HBR-2.5-DM, nous utilisons le jeu de filtres : Exc ; 482/35, DM 506 Em. FF01-536/40 ; pour la protéine mCherry : Exc.562/40nm DM 593 Em. 641/75. L'excitation a été réalisée via une boîte de LEDs (CoolLed pE-4000). Dans quelques cas précisés, nous utilisons un module confocal à spinning disk Crest X LIGHT V2 (GATACA SYSTEMS, France) avec une résolution axiale de 5.8 $\mu$ m. Les images sont obtenues en utilisant un objectif 60x, 1.4NA à immersion à huile. L'excitation a été réalisée via une boîte LDI 89 NORTH.

## IX. Automatisation des acquisitions des données de temps de vie de fluorescence

Motorisation des déplacements en x, y et z : Nous avons installé des platines motorisées pour assurer la commande digitale des déplacements précis au  $\mu$ m près et le retour à toute position préalablement définie, indispensable pour des acquisitions de time-lapse multi-positions.

Automatisation des déplacements en x, y et z : Nous avons mis en place un interfaçage commandé par le logiciel Matlab et des routines adaptées pour piloter automatiquement des déplacements vers différentes adresses (x, y, z) définies. (Annexe D).

Automatisation de l'injection des MiRu : Afin de réaliser la cartographie spatio-temporelle de l'oxygène sur les 50h de développement du biofilm — une durée ne permettant pas l'injection en continu des micelles de ruthénium Mi-Ru, la quantité de lipides requise étant inaccessible — nous avons mis au point une injection séquentielle des Mi-Ru. Pour surmonter ce challenge, nous avons mis en place une routine permettant de commander deux pousses seringues programmables (KD Scientific) pour des injections de Mi-Ru synchronisées avec l'acquisition des images de temps de vie (Annexe D).

Acquisition des images de temps de vie en time-lapse multi-positions : Nous avons mis en place un interfaçage commandé par le logiciel Matlab pour piloter automatiquement l'acquisition en time-lapse sur des durées allant jusqu'à 60h de croissance du biofilm. Le biofilm croît sous flux continu de MB. Chaque 2h, le flux de MB est automatiquement arrêté pour être aussitôt remplacé par un flux de micelles de ruthénium pendant 180s à un débit de 1ml/h. Une fois cette durée est écoulée, le flux des micelles de ruthénium est arrêté pour lancer des acquisitions de temps de vie par FLIM à différents z avec les mêmes coordonnées x, y. Dès la fin des acquisitions le flux MB est automatiquement relancé. Toutes ces étapes sont automatisées grâce à l'interface MATLAB (Annexe D).

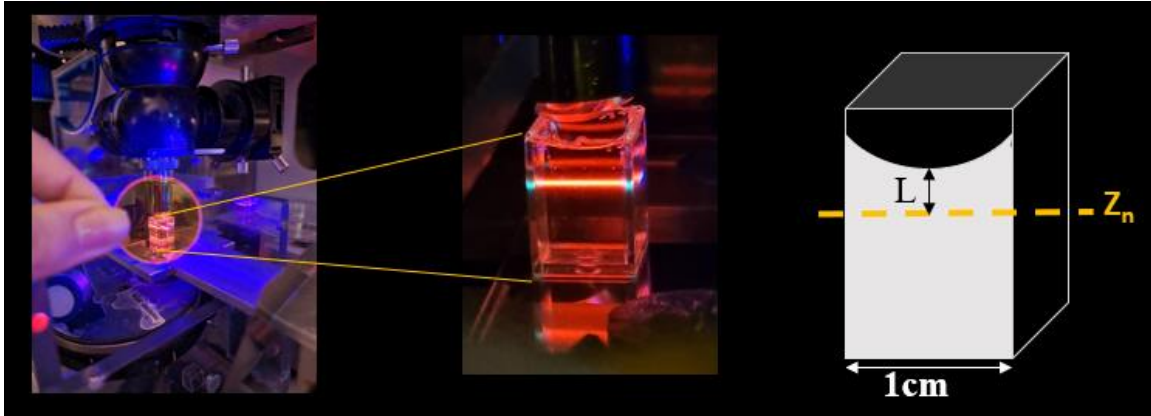


## Chap. 3. Transferts de l'oxygène dans un canal millifluidique sous flux

### I. Caractérisation des dynamiques d'échange d'oxygène en régime stationnaire (sans flux)

Dans cette partie du travail, nous voulons déterminer les temps caractéristiques et comprendre les étapes clés de la circulation d'oxygène dans les canaux millifluidiques de PDMS conçus pour la croissance du biofilm. L'objectif est de pouvoir comparer les temps caractéristiques avec les temps biologiques du biofilm dans les conditions de l'expérience. Pour cela, nous allons examiner en premier lieu les échanges en oxygène dans des configurations simplifiées. Nous regarderons la dynamique caractéristique de la sonde dans une cuve ouverte à l'air libre. Puis nous examinerons un canal en PDMS sans flux avant de nous concentrer sur l'effet du flux.

#### 1. Variation de l'oxygène environnemental en cuve ouverte



**Figure 30: Dispositif expérimental pour l'étude des échanges d'O<sub>2</sub> entre la solution dans une cuve ouverte et l'atmosphère ambiante.**

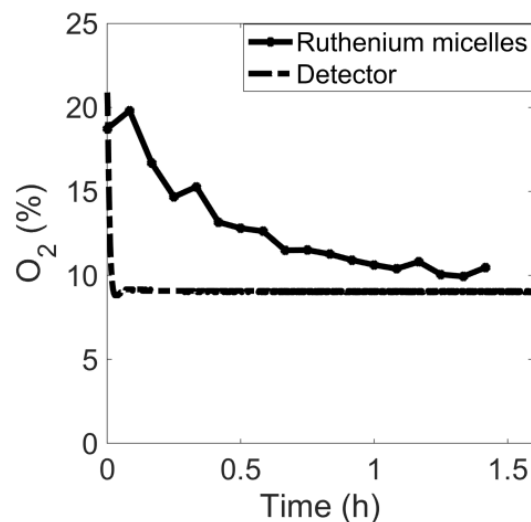
Dans cette configuration simple, nous caractérisons les dynamiques d'échanges d'oxygène entre l'air et la phase aqueuse contenant les micelles de ruthénium « MiRu ». Nous contrôlons les taux en oxygène environnemental (c'est-à-dire dans l'enceinte close de la cuve) et la température. Toutes les manipulations sont réalisées à la température constante de 30°C. La solution de micelles de ruthénium à une concentration de 2μM dans du MB est déposée dans une cuve ouverte carrée de 1cm de côté (Fig.30). La cuve est installée dans l'enceinte à O<sub>2</sub>

contrôlé, initialement à la pression atmosphérique en oxygène. Nous fixons ensuite les coordonnées (x, y, z) de la position d'observation dans la cuve. Le plan étudié en z est déterminé par la position de la nappe laser dans la cuve ( $z_n$ ). Une distance L sépare le plan qu'elle éclaire de la surface du liquide ;  $L = 0.35 \pm 0.02 \text{ cm}$  (Fig.30).

Lorsque le dispositif est réglé, nous isolons l'enceinte réduite de l'atmosphère ambiante en obturant toutes les ouvertures avec une pâte isolante (pâte Gum de chez Esprit composite, Silicone polyaddition, produit à base de polyorganosiloxanes (4% + charges minérales inertes)). Nous pouvons alors appliquer des variations d' $\text{O}_2$  ascendantes ou descendantes de différentes amplitudes et mesurer des cinétiques lors de l'établissement de l'équilibre dans la solution.

### 1.1. Variation descendante de 21 à 10% et analyse

Un mélange air-argon est injecté dans l'enceinte à  $t=0$  avec une régulation visant à atteindre un taux d'oxygène environnemental de 10%. Simultanément, on lance la mesure de la concentration d'oxygène environnemental par le capteur implanté dans l'enceinte et l'acquisition des images de temps de vie de fluorescence des micelles de Ru dans la solution au point (x, y, z) (Fig.31).



**Figure 31: Cinétique de variation descendante d' $\text{O}_2$ .** La concentration d'oxygène en fonction de temps mesurée dans l'enceinte par le capteur (trait discontinu) et dans la solution par l'acquisition des images de temps de vie de fluorescence des MiRu (trait continu).

### Encart3 : calcul des constantes

#### Modèle cinétique du premier ordre

##### Variation ascendante ( $k_{on}$ )

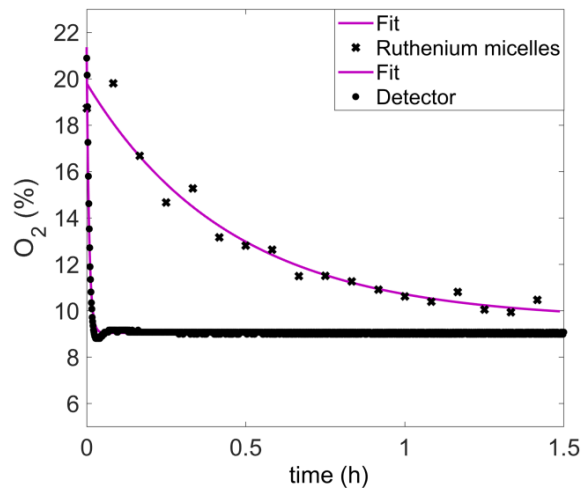
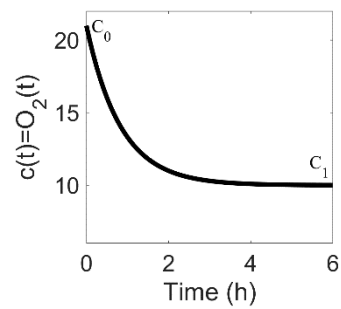
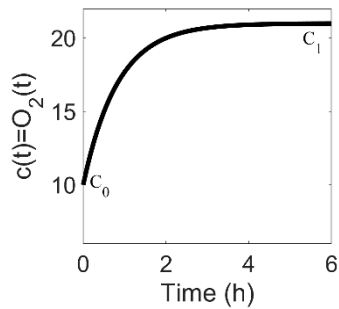
$$C(t) = (C_1 - C_0) (1 - e^{-kt}) + C_0$$

##### Variation descendante ( $k_{off}$ )

$$C(t) = (C_0 - C_1) e^{-kt} + C_1$$

$C_0$  = concentration initiale

$C_1$  = concentration finale



**Figure 32: Exemple d'ajustement des données selon les modèles cinétiques présentés ci-dessus.** Variation de 21% ( $C_0$ ) à 10% ( $C_1$ ). Données expérimentales d'oxygène environnemental dans l'enceinte réduite données par le détecteur (en points) ainsi que celles d'oxygène dans la solution, rapportées par les micelles de ruthénium (en symbole x). Les ajustements correspondants selon le modèle cinétique de premier ordre sont présentés par un trait continu violet.



Pour comparer les différentes conditions expérimentales sur des bases quantitatives, nous avons analysé les cinétiques de variation de l'O<sub>2</sub> en utilisant un modèle cinétique du 1<sup>er</sup> ordre (Encart 3) qui décrit bien les données expérimentales à la fois pour les phases de variation ascendante avec une constante  $k_{on}$  et pour les phases de variation descendante avec une constante  $k_{off}$ . Sur la base de ces constantes, nous calculons un temps de demi-réaction désigné par «  $t_{1/2}$  » comme suit :

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

Les résultats présentés dans la figure 31 indiquent que l'établissement de l'équilibre environnemental en O<sub>2</sub> à 10% dans l'enceinte est atteint rapidement soit avec une constante de  $2,18 \text{ min}^{-1} \pm 0,25$  (Fig.32). C'est équivalent à un temps de demi-réaction  $t_{1/2} = 0,32 \text{ min}$  (~19s). Dans la solution des micelles la stabilisation d'oxygène prend plus de temps avec une constante est de  $0,036 \text{ min}^{-1}$  (Fig.32) et un  $t_{1/2}$  de 19min (~1155s).

Conclusion préliminaire : L'établissement du taux d'oxygène fixé dans l'enceinte contrôlée n'est pas l'étape limitante. Le temps long observé correspond au temps nécessaire pour l'établissement de l'équilibre dans la solution.

## 1.2. Autres variations

. Variation descendante de 10% à 3%

À partir de l'O<sub>2</sub> environnemental à 10% d'oxygène, nous poursuivons l'expérience en diminuant la consigne d'oxygène à 3% dans l'enceinte et déterminons une nouvelle constante  $k_{off}$ .

. Variation ascendante de 3% à 10%

À partir de l'équilibre à 3% d'O<sub>2</sub>, nous appliquons une variation ascendante, la consigne est de repasser à 10% en oxygène. Cette fois on mesure une constante  $k_{on}$  (Tab.4).

**Tableau 4: Constantes d'extraction «  $k_{off}$  » et de dissolution «  $k_{on}$  » de l'oxygène dans l'enceinte et dans la solution en cuve ouverte. Les valeurs entre parenthèses donnent l'intervalle de confiance sur  $k$ .**

Variation d'O <sub>2</sub> (%)	$k(\text{min}^{-1})$ Enceinte	$k(\text{min}^{-1})$ Solution	$t_{1/2}$ (min) Enceinte	$t_{1/2}$ (min) Solution
21% → 10%	2,18 min <sup>-1</sup> (2,15-2,21)	0,036 min <sup>-1</sup> (0,02-0,048)	0,32 min	19 min
10% → 3%	0,73 min <sup>-1</sup> (0,72-0,74)	0,039 min <sup>-1</sup> (0,03-0,045)	0,94 min	17,8 min
3% → 10%	0,68 min <sup>-1</sup> (0,67-0,7)	0,074 min <sup>-1</sup> (0,57-0,09)	1 min	9,4 min

Le tableau 4 résume les constantes obtenues dans les différentes variations.

Nous observons des  $t_{1/2}$  pour la mise à l'équilibre de l'enceinte réduite de l'ordre de la minute et même si le  $t_{1/2}$  augmente pour les valeurs les plus basses de la consigne (table 4), nous voyons que l'établissement du taux d'O<sub>2</sub> dans l'enceinte est très rapide par rapport au temps nécessaire pour l'équilibration de la solution et que cette variation est négligeable. Il se peut que les temps plus élevés pour les valeurs basses d'O<sub>2</sub>, soient dus à de légères fuites d'étanchéité de l'enceinte. Nous obtenons les mêmes  $t_{1/2}$  dans l'enceinte (~1min) dans les deux sens de variation (10%3% et 3%10%).

Pour les variations d'O<sub>2</sub> dans la solution, nous observons une différence entre les constantes calculées suivant le sens de la variation (extraction ou dissolution). En effet pour l'évaporation de l'O<sub>2</sub> (10% à 3%) nous calculons dans la solution un  $t_{1/2}$  de 18min contre un  $t_{1/2}$  égale de 9.4min pour sa dissolution (3% à 10%). Donc, un  $t_{1/2}$  de dissolution de l'O<sub>2</sub> deux fois plus rapide.

L'étape limitante du processus concerne bien le changement de phase liquide/gaz de l'O<sub>2</sub> après variation de l'O<sub>2</sub> dans le milieu ambiant, quel que soit le sens de variation. La question se pose alors de savoir ce qui gouverne cette mise à l'équilibre de la solution.

Hypothèse 1 : Le temps caractérisant les échanges en oxygène est lié au temps de réponse des micelles de Ru à chaque variation d'O<sub>2</sub>.

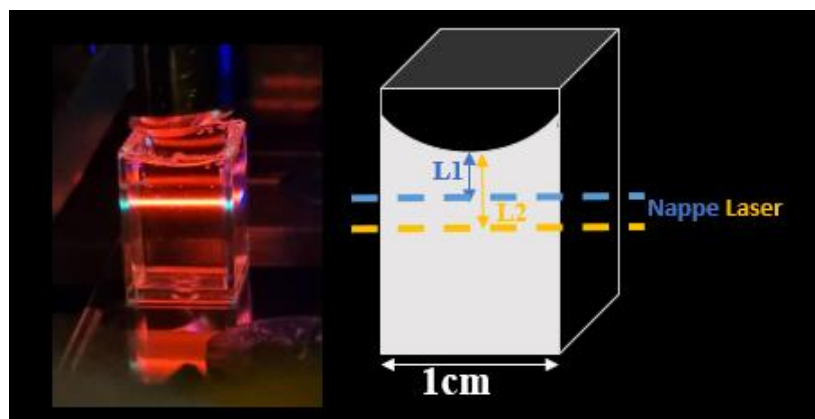
L'extinction de fluorescence de la sonde est une réaction de collision bimoléculaire entre l'O<sub>2</sub> le Ru très rapide. L'approche mutuelle des deux molécules Ru et O<sub>2</sub> est possible pendant la durée de vie de l'état excité inférieur à la microseconde (environ 1600 ns à 21% d'O<sub>2</sub> et 30°C dans les micelles). Par ailleurs, la diffusion de l'O<sub>2</sub> dans les micelles peut-elle limiter

le processus. La taille des micelles étant de l'ordre d'une dizaine de nanomètres, la diffusion de l'O<sub>2</sub> dans les micelles est rapide. Si on estime une taille de micelles de 10nm de diamètre, le temps de diffusion est de l'ordre de 0,04s ( $\sim 5,6 \cdot 10^{-4}$  min). Le temps de réponse de la sonde n'est donc pas une étape limitante dans le processus d'atteinte de l'équilibre de la solution. Nous écartons l'hypothèse 1.

En variant l'oxygène dans l'enceinte contrôlée, nous créons un gradient de concentration entre le milieu ambiant et la solution des micelles de Ru ce qui va induire un flux d'O<sub>2</sub> visant à rétablir l'équilibre. Ce transfert de l'O<sub>2</sub> de la phase gazeuse vers la solution se déroule suivant un coefficient de partage et implique cinétiquement un coefficient de transfert. L'équilibration de la solution implique également la diffusion de l'O<sub>2</sub> dans la solution.

Hypothèse 2 : Le temps caractérisant l'atteinte de l'équilibre de la solution après variation de l'O<sub>2</sub> est lié au transfert gaz-solution et/ou à la diffusion de l'O<sub>2</sub> dans la solution.

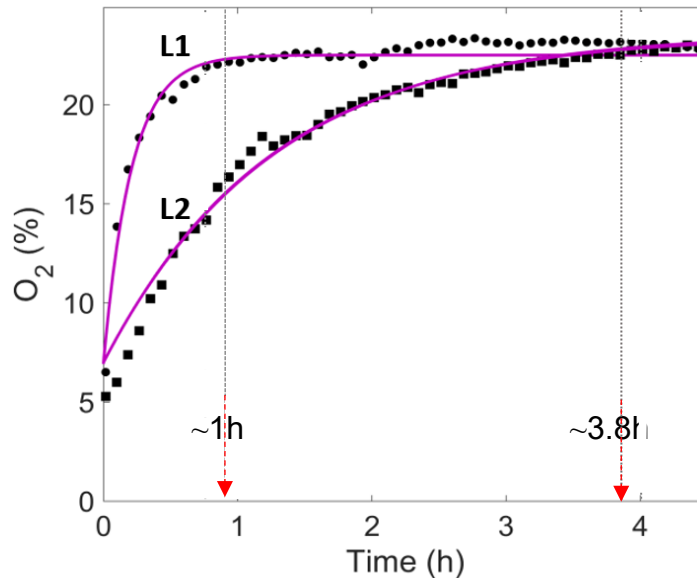
Pour étudier cette hypothèse, nous effectuons une expérience afin de tester le rôle joué par la diffusion dans l'établissement de l'équilibre en oxygène dans la solution. Notre expérience consiste à varier la distance L séparant notre plan de mesure (illuminé par la nappe laser) et la surface de contact air-liquide. Nous enregistrons les cinétiques de l'établissement de l'équilibre en O<sub>2</sub> dans la solution dans chacune des configurations pour les deux distances L1 et L2 (Fig.33).



**Figure 33: Cinétique d'établissement de l'oxygène dans une configuration simple (cuve ouverte) à deux hauteurs de mesure différentes L1 et L2.**

Suivant le même protocole décrit pour les variations précédentes d'O<sub>2</sub>, nous varions le taux d'oxygène dans l'enceinte, et mesurons la cinétique de mise à l'équilibre par l'acquisition des images de temps de vie. Pour ces expériences, nous varions l'O<sub>2</sub> ambiant de 7% à 21%. Les

constantes obtenues pour les acquisitions aux positions L1= 0.35±0.01 cm et L2 =0.45±0.01 cm sont respectivement de 0.074min<sup>-1</sup> ±0.011 soit un t<sub>1/2</sub>= 9.36 min et de 0.015 min<sup>-1</sup> ±0.001 soit un t<sub>1/2</sub>= 46,2 min et donc un facteur 5 dans les temps d'équilibration pour les deux configurations (Tab5). Plus on s'éloigne de la surface du liquide pendant l'acquisition plus la cinétique de l'établissement de l'équilibre en O<sub>2</sub> dans le canal est ralentie. Ce qui suggère que la diffusion dans l'eau influence significativement l'équilibration.



**Figure 34: Détermination des constantes de dissolution de l'oxygène k<sub>on</sub> (7%-21%) dans la solution de MiRu dans les deux cas de mesure L1 et L2.** Les données expérimentales sont ajustées selon les modèles cinétiques de premier ordre (encart3). Elles sont présentées par des points -●- pour les mesures en L1 et des carreaux -■- pour L2. Le temps d'équilibration estimé est désigné par le trait discontinu. Les ajustements sont présentés par le trait continu violet.

Si on calcule les temps aux temps caractéristiques de diffusion attendus sur les deux hauteurs L1 et L2 considérées en utilisant l'approximation issue de la première loi de Fick,

$$t = \frac{L^2}{D}$$

et un coefficient de diffusion de l'O<sub>2</sub> dans l'eau à 30°C égal à 2.56\*10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>, on obtient des temps t1 et t2 respectivement égaux à 1.33h et 2.7h qui sont du même ordre de grandeur que les temps mesurés mais ne s'ajustent pas parfaitement par leur valeur. En particulier, t1 est plus élevé d'environ 30% que le temps mesuré sur L1 et t2 environ 30% moins élevé que le temps mesuré sur L2. Ces résultats reflètent probablement l'incertitude sur la mesure des distances L1 et L2 à l'interface avec la présence du ménisque complique la configuration.

**Tableau 5: Temps de diffusion et de mise à l'équilibre de l'oxygène dans la solution à deux hauteurs de mesure par rapport à l'interface air-liquide L1 et L2.**

	L1 (0.35±0.01cm)	L2 (0.45±0.01cm)
<b>Temps de diffusion <math>t_d</math> (h)</b>	1.33	2,7
<b><math>t_e</math> (h)</b>	0.8	3.8

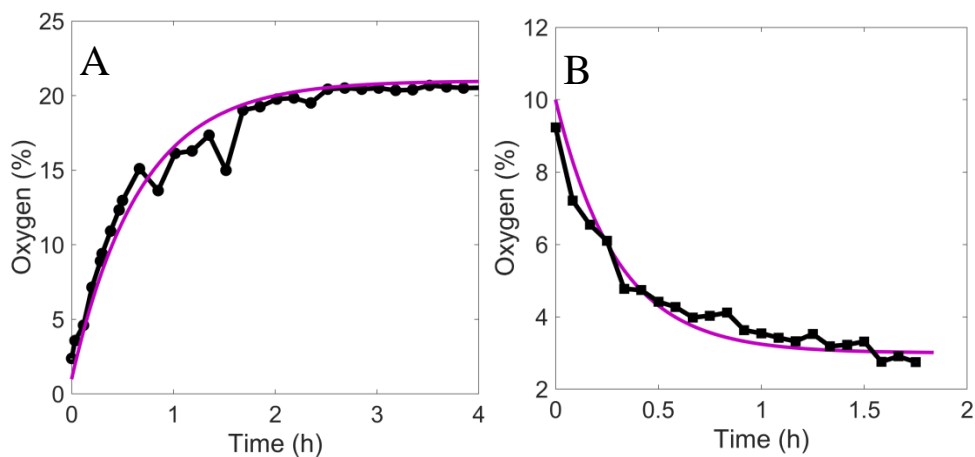
Néanmoins, l'hypothèse la plus probable reste que l'équilibration de l'O<sub>2</sub> dans ce schéma de la cuve ouverte est dominée par la diffusion. Cependant, la contribution d'une énergie de transfert gaz-liquide dans le processus de mise à l'équilibre n'est pas complètement exclue. Ceci pourrait peut-être expliquer la différence que nous observons entre la constante k de dissolution et celle d'évaporation de l'O<sub>2</sub>.

## 2. Variation de l'O<sub>2</sub> environnemental en canal de PDMS en absence de flux

Nous venons d'étudier les cinétiques de transport dans l'environnement simplifié de la cuve ouverte. Cependant, dans les conditions expérimentales, le dispositif consiste en un canal aqueux moulé dans du PDMS. Les échanges d'O<sub>2</sub> se font donc à travers le PDMS et nous avons étudié les cinétiques d'équilibration de l'O<sub>2</sub> dans ce dispositif afin de déterminer les temps caractéristiques correspondants.

Dans un premier temps, les expériences ont été réalisées dans le canal millifluidique en régime stationnaire, c'est-à-dire en absence de flux. Pour rappel, le canal a une longueur de 3cm, une section carrée de 1 mm de côté et nous travaillons à 30°C. Pour réaliser les mesures, nous utilisons une solution de micelles de ruthénium à 2 μM dans du MB injectée le canal. Le canal est installé dans l'enceinte à oxygène et température contrôlés, initialement à la pression atmosphérique en oxygène 21%. La position d'observation (x, y, z) est choisie à la moitié de la longueur du canal. La référence z<sub>0</sub> correspond à la lamelle de verre à la base du canal. Le plan z<sub>n</sub> d'observation est d'environ 4 micromètres de la lamelle. Ce plan sera illuminé par la nappe laser lors des acquisitions des images de temps de vie. Lorsque le dispositif est réglé, on procède comme précédemment pour modifier l'atmosphère ambiante en injectant un mélange contrôlé d'air-argon à t=0 et en enregistrant les niveaux d'O<sub>2</sub> simultanément dans l'enceinte (capteur implanté) et dans la solution contenue dans le canal (acquisition des temps de vie de MiRu).

La variation ascendante de 1% à 21% donne le résultat présenté (Fig.35 A). L'ajustement des données par l'équation cinétique du premier ordre donne une constante  $k_{on}$  égale à  $1.5h^{-1}$  soit un  $t_{1/2}$  de 27 min. La variation descendante de 10% à 3% (Fig.35 B) donne une constante  $k_{off}$  égale à  $3.4 h^{-1}$  soit un  $t_{1/2}$  de 12 min. On voit que dans ce cas l'extraction de l'O<sub>2</sub> est plus rapide que la dissolution. De plus, les temps caractéristiques dans le canal sont plus élevés qu'en cuve ouverte alors que la longueur de diffusion dans l'eau est beaucoup plus petite et donc les temps de diffusion dans l'eau attendus plus courts. En effet, sur 1mm qui est la longueur caractéristique du canal, le temps caractéristique de diffusion de l'O<sub>2</sub> est de l'ordre de 7 min. Ces résultats pointent donc vers une étape limitante liée à la présence du PDMS.

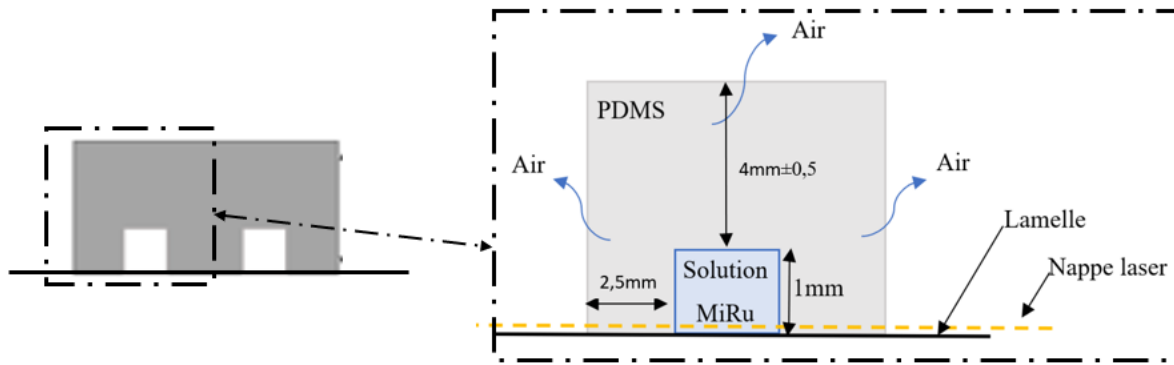


**Figure 35: Cinétique de variation de l'O<sub>2</sub> dans un canal millifluidique en PDMS.** A : Variation ascendante de 1% à 21%. B : Variation descendante de 10% à 3%

Le nouveau compartiment PDMS introduit de nouvelles étapes limitantes possibles :

- La diffusion dans le PDMS.
- Le transfert de l'O<sub>2</sub> de l'air vers le PDMS
- Le transfert de l'O<sub>2</sub> du PDMS vers l'eau

Si l'on considère précisément la géométrie du canal (Fig.36), on constate que la plus petite longueur de diffusion dans le PDMS est l'épaisseur latérale de 2.5 mm — c'est une longueur fixée par le moule.



**Figure 36: Échange d'oxygène à travers le PDMS**

Dans la littérature, le coefficient de diffusion de l'O<sub>2</sub> dans le PDMS<sup>115</sup> est donné égal à  $3,25 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s. Un coefficient proche de celui dans l'eau  $2,56232 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s. Si on calcule le temps de diffusion nécessaire pour parcourir 2.5mm dans le PDMS, on trouve :

$$t_{diff-PDMS} = \frac{0,25^2}{3,25 * 10^{-5}} = 1923s = 32min$$

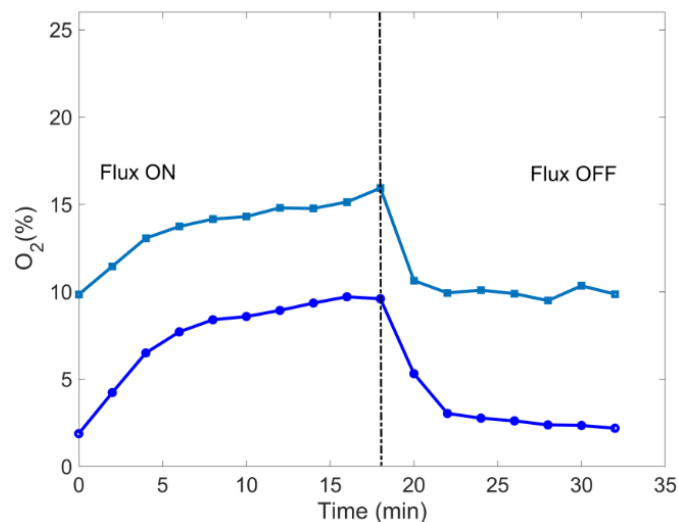
La hauteur du patch de PDMS au-dessus du canal peut varier avec la quantité de polymère utilisée dans la microfabrication, mais elle est toujours plus élevée que la longueur latérale. Des mesures que nous avons réalisées avec des dispositifs à deux hauteurs différentes au-dessus du canal,  $h_1=4mm$  (le minimum techniquement accessible par notre méthode de microfabrication) et  $h_2=5,5 \pm 0,2mm$  n'ont pas donné de différence cinétique significative, suggérant que c'est bien la plus petite longueur à parcourir dans le PDMS qui domine la cinétique. Cependant, les temps d'équilibration ( $\sim 1.5h$  et  $2.5h$ ) sont supérieurs au temps de diffusion calculé (32min). De plus il faut remarquer que le temps d'extraction de l'O<sub>2</sub> est plus court et donc que le processus de circulation de l'O<sub>2</sub> n'est pas totalement symétrique ce qui suggère qu'une étape de transfert pourrait ralentir l'import d'O<sub>2</sub> dans le canal dans une situation de déplétion entre le canal et l'atmosphère ambiante.

## II. Apport du flux en Oxygène

Dans les conditions expérimentales de la croissance du biofilm, on applique un flux continu de nutriments à un débit constant de 1ml/h. Nous venons de voir que les équilibres entre l'atmosphère ambiante et le canal s'effectuaient avec des temps caractéristiques de l'ordre de 30 min pour un gradient d'O<sub>2</sub> entrant et d'environ 12 min pour un gradient sortant en absence de flux.

Afin, d'évaluer la contribution du flux à l'équilibre global, nous nous plaçons à une atmosphère ambiante régulée à 10% en O<sub>2</sub> et à t=0, nous déclenchons à la fois le flux de milieu contenant des micelles et l'acquisition des données de temps de vie toutes les 2 minutes puis à t= 18 min alors qu'un plateau est atteint, nous stoppons le flux. La même expérience est réalisée avec une atmosphère ambiante régulée à 3%. Les résultats obtenus sont montrés dans la figure37.

Dans le cas des mesures à O<sub>2</sub> atmosphérique, nous n'observons aucune augmentation des taux d'O<sub>2</sub> mesurés suite au lancement de flux.



**Figure 37: Effet du flux sur la concentration d'O<sub>2</sub> dans le canal.** Les courbes montrent deux environnements contrôlés en oxygène à 10% (—■—) et à 3% (—•—). Le flux est lancé à t=0, la ligne tiretée indique le moment de l'arrêt du flux (t=18 min). Toutes les autres conditions sont identiques à la figure35.

Le milieu que nous introduisons est en principe à la pression partielle atmosphérique en O<sub>2</sub> de 21%. Nous observons (Fig.37) que le flux conduit à une disponibilité de l'O<sub>2</sub> dans le canal intermédiaire entre la concentration d'O<sub>2</sub> dans le milieu et celle de l'environnement. Cette



situation résulte de la combinaison des processus d'advection et de diffusion et transfert de l'O<sub>2</sub> à travers le PDMS. Nous atteignons ici les limites des évaluations des ordres de grandeur sur la base des temps caractéristiques et une modélisation plus complète est nécessaire pour discuter du mécanisme permettant d'aboutir à ces valeurs. Pour ce faire nous venons d'initier une collaboration avec notre collègue théoricien J-F Rupprecht à Centuri (Marseille).

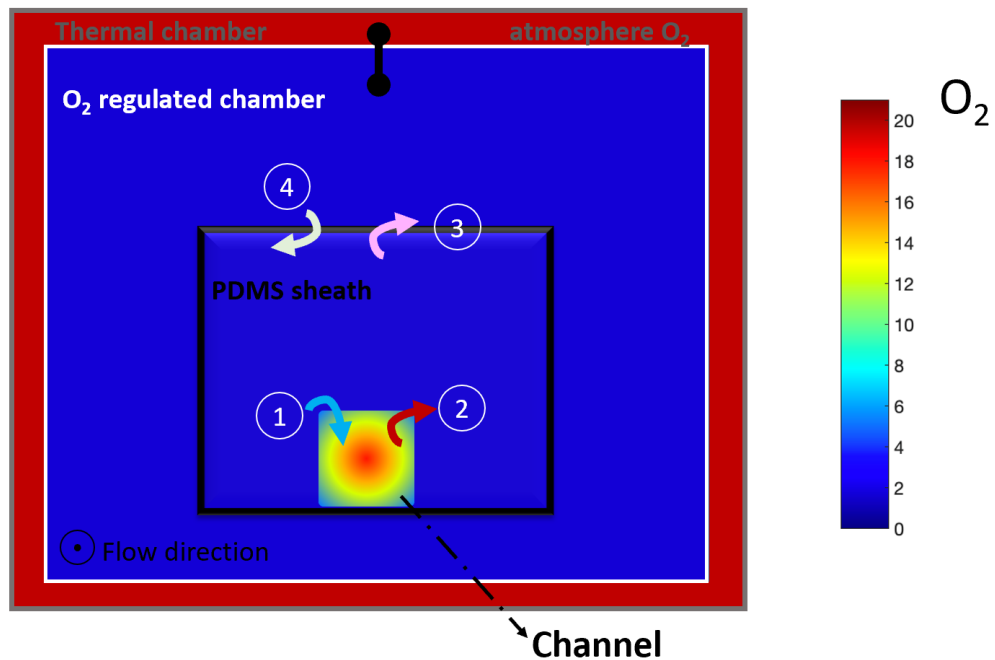
Cependant avant de pouvoir accéder à une description théorique complète, il est intéressant d'observer que les temps de mise à l'équilibre dans cette situation sont significativement plus courts que pour obtenir l'équilibre dans le canal lorsque nous modifions l'O<sub>2</sub> ambiant. La différence importante est que la variation en O<sub>2</sub> est assurée par l'apport du flux (fig.38 A) alors que dans le cas des expériences précédentes visant à équilibrer la solution dans le canal en régime stationnaire en l'absence de flux (Fig.38 B), on doit passer par une étape d'équilibration du patch de PDMS vis-à-vis de l'air ambiant. On remarque que le temps de retour à l'équilibre dans les expériences de flux (Fig.37) est particulièrement court, de l'ordre de quelques minutes. Nous concluons donc que l'étape d'équilibration de l'O<sub>2</sub> entre l'air ambiant et le PDMS ralentit significativement les échanges.

### Conclusion

L'ensemble des résultats regroupant les expériences en canal statique avec contrôle de l'O<sub>2</sub> et en canal en présence d'un flux de milieu nous amène à conclure que la cinétique la plus lente dans les processus d'échange de l'O<sub>2</sub> entre le canal et l'atmosphère ambiante est celle de l'équilibration du PDMS avec l'O<sub>2</sub> de l'air ambiant. En revanche, les échanges entre le canal lui-même et le PDMS sont rapides de l'ordre de quelques minutes avec un avantage au flux sortant.

Les dispositifs en PDMS sont très répandus aussi bien dans des applications de biophysique et de physico-chimie du fait de la très grande flexibilité du matériau<sup>116 117</sup>. Néanmoins, on voit que ce matériau n'est pas un élément neutre de l'expérience et que son rôle dans les échanges gazeux mérite d'être caractérisé dans les géométries et les méthodes de microfabrication précises de l'expérience. Des travaux de Markov<sup>115</sup> et collaborateurs soulignent également l'impact potentiel des traitements au plasma utilisés pour sceller les patches de PDMS au verre sur le coefficient de diffusion de l'O<sub>2</sub>. Nos résultats suggèrent l'existence d'une barrière au transfert de l'O<sub>2</sub> de l'air au PDMS qui pourrait dépendre de la conversion hydrophile hydrophobe décrite dans les travaux de Markov.

L'étude des échanges d' $O_2$  que nous avons menée dans ce chapitre sur notre dispositif doit nous éclairer dans nos travaux en présence de biofilm.



**Figure 38: Échanges d' $O_2$ .** Ce schéma décrit l'arrangement des différentes enceintes avec les échanges gazeux possibles. Les échanges ont lieu suivant le gradient d' $O_2$  entre le canal et le patch de PDMS (flèches 1 et 2) et entre le patch de PDMS et l'air ambiant (flèches 3 et 4). Le symbole (•—•) indique l'absence d'échange entre l'enceinte thermique et l'enceinte régulée en  $O_2$ . La concentration en  $O_2$  est représentée par un code couleur du bleu au rouge 0%-21%. La situation représentée est celle d'une enceinte réduite régulée à 3% au moment où un flux de milieu, en principe à 21%, est introduit dans le canal. Les échanges actifs seront ici les flux sortants (2) et (3). Nos résultats montrent que les échanges 3 et 4 sont les plus lents.



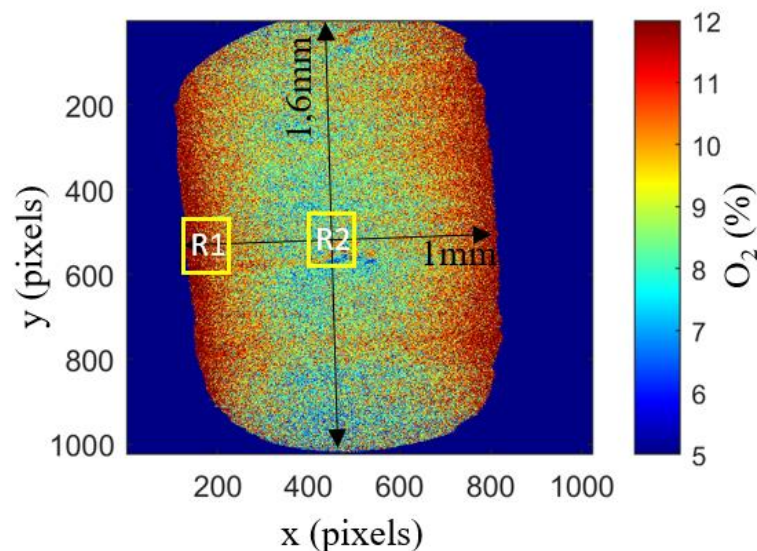
## Chap. 4. Suivi de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> d'un biofilm bactérien multi-espèces en cours de développement

Dans le but de mettre en évidence le rôle de la dynamique de l'oxygène dans le mécanisme de formation, les interactions inter-espèces et les cinétiques caractéristiques observées dans le biofilm modèle à 4 espèces, nous avons entrepris d'établir la distribution spatio-temporelle de l'oxygène au cours de la croissance de ce biofilm. Pour cela, nous avons mis au point une méthode de mesure *in situ*, non invasive et tridimensionnelle.

### I. Mise en place de la mesure

#### Cartographie de l'oxygène en biofilm 4S

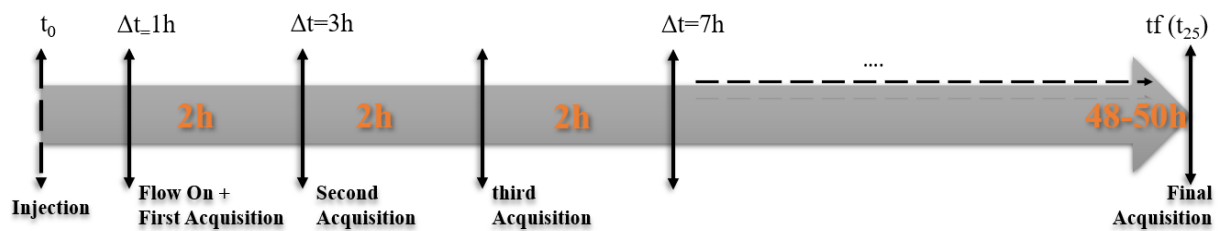
Nous suivons l'évolution des concentrations locales en oxygène grâce aux propriétés photochimiques des micelles de ruthénium (MiRu). Comme déjà expliqué dans la partie matériel et méthode (Chap.2), les collisions entre les molécules d'O<sub>2</sub> et les micelles de ruthénium résultent en une variation de temps de vie de cette dernière. Nous mesurons ces variations par la technique FLIM et les convertissons en concentration en O<sub>2</sub> (Fig.39).



**Figure 39: Exemple d'une cartographie d'O<sub>2</sub> au sein du biofilm 4S dans un canal millifluidique de 1mm de largeur et 30mm de longueur.** Les concentrations en O<sub>2</sub> dans cette figure sont codées suivant l'échelle de couleurs figurant à droite. Chaque pixel est une concentration locale en O<sub>2</sub>. (La taille de notre image est de 1.6mm x 1.6mm). On distingue

nettement l’empreinte du canal de 1mm de large. La longueur imagée est de 1.6mm. Cette image correspond à un temps de croissance  $\Delta t = 19h$  et un plan  $z = 4\mu m$ .

Pour une détermination 3D de la distribution spatio-temporelle de l’O<sub>2</sub> nous enregistrons une pile d’images FLIM en z pour une collection de temps t. En parallèle, vérifions la croissance du biofilm en lumière transmise à un seul z,  $z=z_1$  situé à  $4\mu m$  de la lamelle ( $z_0$ ) à l’aide d’une caméra placée sur un des oculaires. Une pile en z est effectuée chaque 2h pendant le développement du biofilm (48 à 50h). Au cours du développement du biofilm sous flux continu de MB des détachements de flocons de biofilm ont lieu aléatoirement. Ces flocons peuvent passer dans le champ lors des acquisitions et perturber la mesure. Afin d’éviter cela, nous avons pris la décision d’effectuer les mesures en arrêt de flux (voir chap2. IX Automatisation des acquisitions). Notons bien que le temps nécessaire pour une acquisition unique est de 20s, l’arrêt du flux est au maximum de 4,5min (cas standard d’une pile de 10z). Nous commençons toutes les séries d’acquisitions par la mesure de la référence (temps de vie de la fluorescéine).

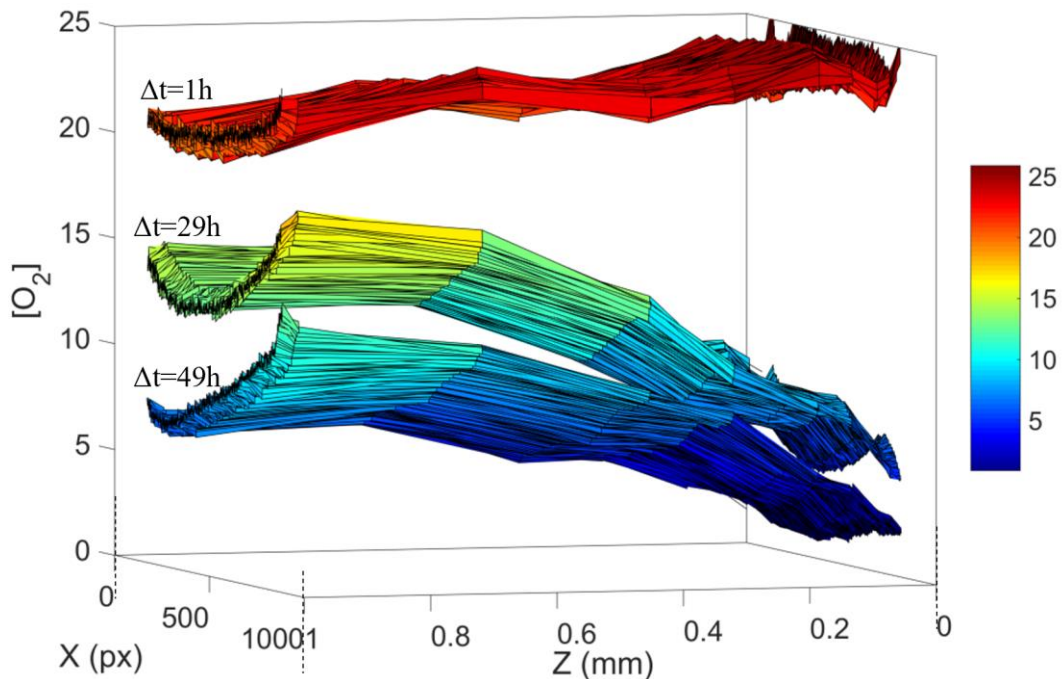


**Figure 40: Timeline du déroulement de l'expérience.**

$t_0$  correspond à l’injection du mélange de 4 espèces constituant le biofilm dans le canal millifluidique, chacune à une concentration de  $10^6$  cellules/ml. L’entrée du canal est reliée à deux pousses de seringues, à l’aide d’un connecteur sous forme d’Y, permettant ensuite l’injection séquentielle de MB et de MiRu. Le canal est fixé sur une platine motorisée et placé dans une enceinte thermostatée à 30°C. Le biofilm est stabilisé sans flux pendant environ 1h pendant ce temps, nous fixons la position de mesure en x,y (fixes) et  $z_0$ . Après ce temps de stabilisation, nous lançons un flux de MiRu (1 ml/h) pendant 180s, nous arrêtons le flux et nous optimisons ensuite les paramètres d’acquisition (MCP, temps d’acquisition ...) à travers l’interface FLIM pour un meilleur rapport signal/bruit puis nous lançons la routine des acquisitions automatisées. Le MB en flux continu sera arrêté toutes les 2h et substitué par un flux de MiRu pendant 180s, suivi par l’acquisition de la pile en z des temps de vie en flux arrêté. Le flux de MB est ensuite directement relancé après la dernière acquisition.

## II. Distribution spatio-temporelle 3D de l'O<sub>2</sub> d'un biofilm bactérien

La figure 41 donne une représentation 3D des résultats obtenus à  $\Delta t=1h$ ,  $\Delta t=29h$ ,  $\Delta t=49h$ . Chaque surface correspond à une pile de 10 z la distribution d'O<sub>2</sub> dans le biofilm à un temps t. La position z dans la hauteur du canal est en mm, allant de 0 (bas du canal : la surface de la lamelle) jusqu'à 1mm (haut du canal : surface en PDMS). Le code couleur correspond à des concentrations en O<sub>2</sub> allant du bleu pour les concentrations les plus faibles jusqu'au rouge pour les concentrations les plus élevées. X est la largeur du canal (1mm) présenté en pixels allant de 0 à 1000 pixels.



**Figure 41: Représentation 3D de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> au sein du biofilm 4S.** La concentration en O<sub>2</sub> est représentée par un code couleur allant du bleu vers le rouge figurant sur le côté à droite.

Cette vue globale met en évidence que :

-La concentration globale en oxygène diminue substantiellement dans tout le canal au cours du développement du biofilm en dépit du flux constant de milieu.

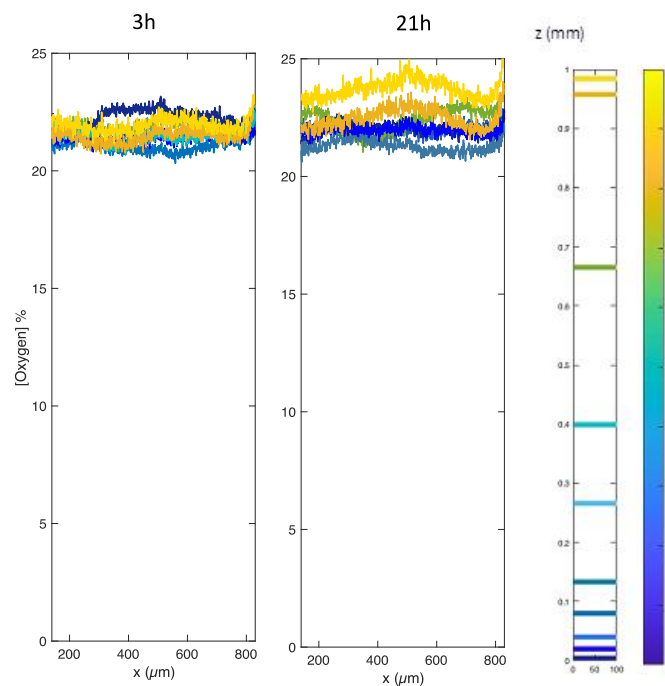
-Les gradients d'oxygène qui se forment au cours du développement du biofilm montrent des dépendances en x (gradient latéral) et en z (gradient vertical) couplées qui évoluent fortement sur les 40h qui mènent à l'équilibre de la communauté.

-Les gradients sont symétriques en x et asymétriques en z de même que la topologie du canal.

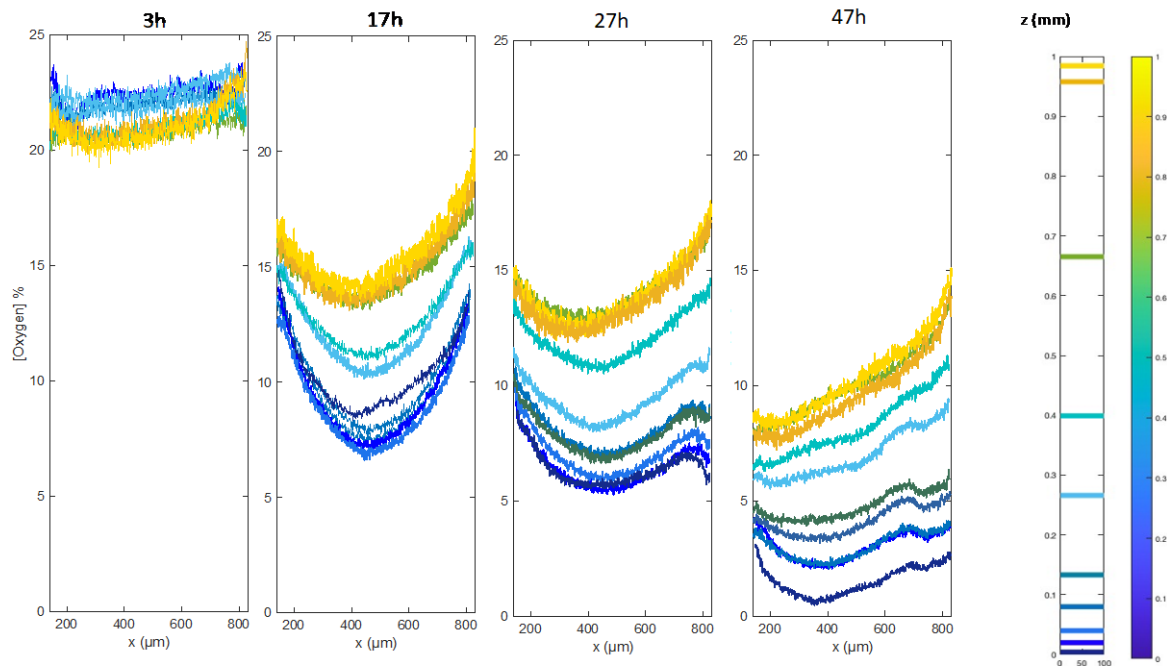
Pour mieux comprendre l'origine et l'installation de ces gradients, nous allons analyser plus avant leurs caractéristiques.

### 1. Gradients d'O<sub>2</sub> au cours du temps

La figure 42 montre la distribution de l'oxygène en x sur la hauteur du canal pour des micelles seules enregistrées suivant la même séquence qu'en présence de biofilm, à deux temps — 3h et 21h — et la Fig. 43 présente l'évolution de cette distribution en présence de biofilm à 3h, 17h, 27h et 47h. En absence de biofilm, aucune tendance n'est observée, à l'exception d'une légère augmentation de l'O<sub>2</sub> au contact du PDMS. Au contraire, en présence de biofilm (Fig.43), les mesures montrent l'installation d'un gradient initialement symétrique en x dont l'amplitude varie en fonction de la hauteur dans le canal.



**Figure 42: Distribution spatiale latérale de l'O<sub>2</sub> en absence de biofilm.** Concentration d'O<sub>2</sub> en fonction de la largeur du canal x, en absence de biofilm à 3h (image du gauche) et 21h (image de droite). Chaque courbe représente un z différent dans la hauteur du canal. z varie de 0 (lamelle de verre) à 1mm (haut du canal) ; les hauteurs sont données par le code couleur figurant sur les barres de droite. Pour chaque x, on moyenne la valeur sur les 200 pixels centraux en y. Les mesures sont faites avec MiRu seule selon la même alternance de MiRu et de MB qu'en présence de biofilm, chaque deux heures et pendant 24h.



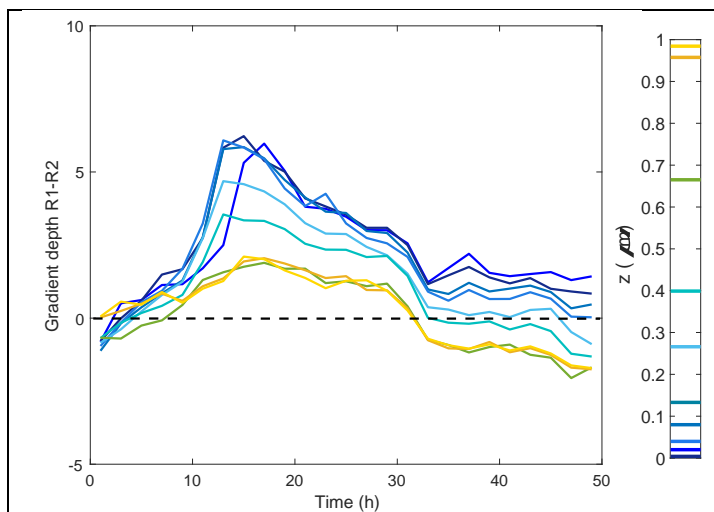
**Figure 43: Distribution spatiale latérale de l'O<sub>2</sub> en présence du biofilm 4S.** Concentration de l'O<sub>2</sub> en fonction de la largeur du canal x à différents stades de développement du biofilm, 3h, 17h 27h et 47h. autres conditions identiques à Fig.42.

Pour décrire l'évolution du gradient d'O<sub>2</sub> en x, on définit des régions d'intérêt R1 et R2, situées respectivement au bord gauche et au centre du canal comme indiqué Fig.39 et on évalue l'amplitude du gradient comme  $\Delta[O_2]_x = R_1 - R_2$  où  $R_1$  et  $R_2$  sont les moyennes des valeurs d'O<sub>2</sub> sur chacune des ROI (Fig.44). On considèrera aussi le gradient relatif, i.e.,  $\Delta[O_2]_x^r = R_1 - R_2 / R_1$  (Fig. 46).

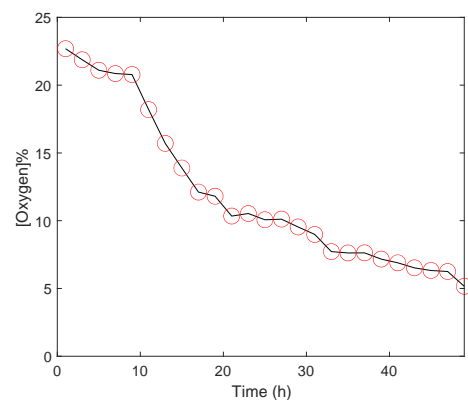
Les courbes du gradient absolu (Fig. 44) intègrent les variations du taux d'O<sub>2</sub> global qui diminue continuellement dans le canal (Fig.45). Il apparaît clairement que les gradients en O<sub>2</sub> varient de façon non monotone et définissent trois zones temporelles distinctes. Une première phase qui s'étend de 0 à 10h où le gradient d'O<sub>2</sub> n'est pas significatif. De même, la valeur moyenne du taux d'O<sub>2</sub> dans le canal ne varie pas significativement (Fig.45). À partir de 10h, la profondeur du gradient en x augmente rapidement pour atteindre un maximum aux alentours de 15h de croissance avant de décroître plus lentement jusqu'à 30h. À ce moment-là le gradient en x s'atténue fortement. On observe même qu'il s'inverse bien que faiblement pour les valeurs de z les plus élevées, c'est-à-dire sur la partie haute du canal à partir d'environ 500 μm. L'amplitude des gradients est plus forte pour les z petits, c'est-à-dire plus près de la lamelle de verre. Cependant l'allure des cinétiques est la même sur toute la hauteur du canal.



Concrètement, ces données montrent que le déficit d'O<sub>2</sub> augmente sur toute la partie centrale du canal de façon plus importante près de la lamelle, mais aussi sur toute la hauteur du canal. Cette asymétrie est en partie logique, compte tenu de l'asymétrie de construction du canal avec une face inférieure en verre et une face supérieure en PDMS. Si l'on trace la profondeur relative du gradient (Fig.46), on constate qu'un gradient est maintenu après 30h au plus près de la lamelle bien que son amplitude absolue soit faible comme on le voit sur la Fig. 44 du fait du très faible taux moyen d'O<sub>2</sub>. En revanche, la dissymétrie en x s'atténue progressivement dans la hauteur du canal soulignant l'existence d'environnements distincts en z.

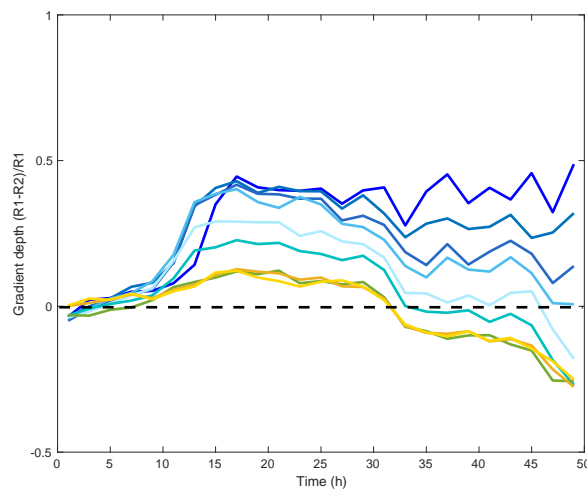


**Figure 44: Amplitude du gradient latéral d'O<sub>2</sub> ( $\Delta[O_2]_x = R_1 - R_2$ ) en fonction du temps de croissance du biofilm 4S.** Les courbes correspondent à 10 positions en z selon le code couleur indiqué par la barre latérale.



**Figure 45: Concentration moyenne en O<sub>2</sub> sur tout le canal.** La concentration en O<sub>2</sub> est moyennée sur tous les z (10z), tous les x (1024 pixels) et les 200 pixels du centre en y.

À ce stade, nous avons voulu confronter l'évolution de la distribution de l'oxygène à la distribution du biofilm en croissance dans le canal (Fig.47 D). Pour cela on suit en parallèle la croissance d'un biofilm 4S identique installé sur un microscope à épifluorescence permettant la collecte des données de lumière transmise et de fluorescence à deux longueurs d'onde. Comme nous l'avons montré dans un précédent travail, ce dispositif permet de suivre en temps réel, la croissance de la biomasse globale attachée aux surfaces et individuellement les populations de *Bt* et *Pf* qui représentent les espèces dominantes de la communauté.



**Figure 46: Profondeur relative du gradient d'O<sub>2</sub> ( $\Delta[O_2]_x^r = R_1 - R_2/R_1$ ) en fonction du temps de croissance du biofilm 4S. Autres informations telles qu'en Fig. 44.**

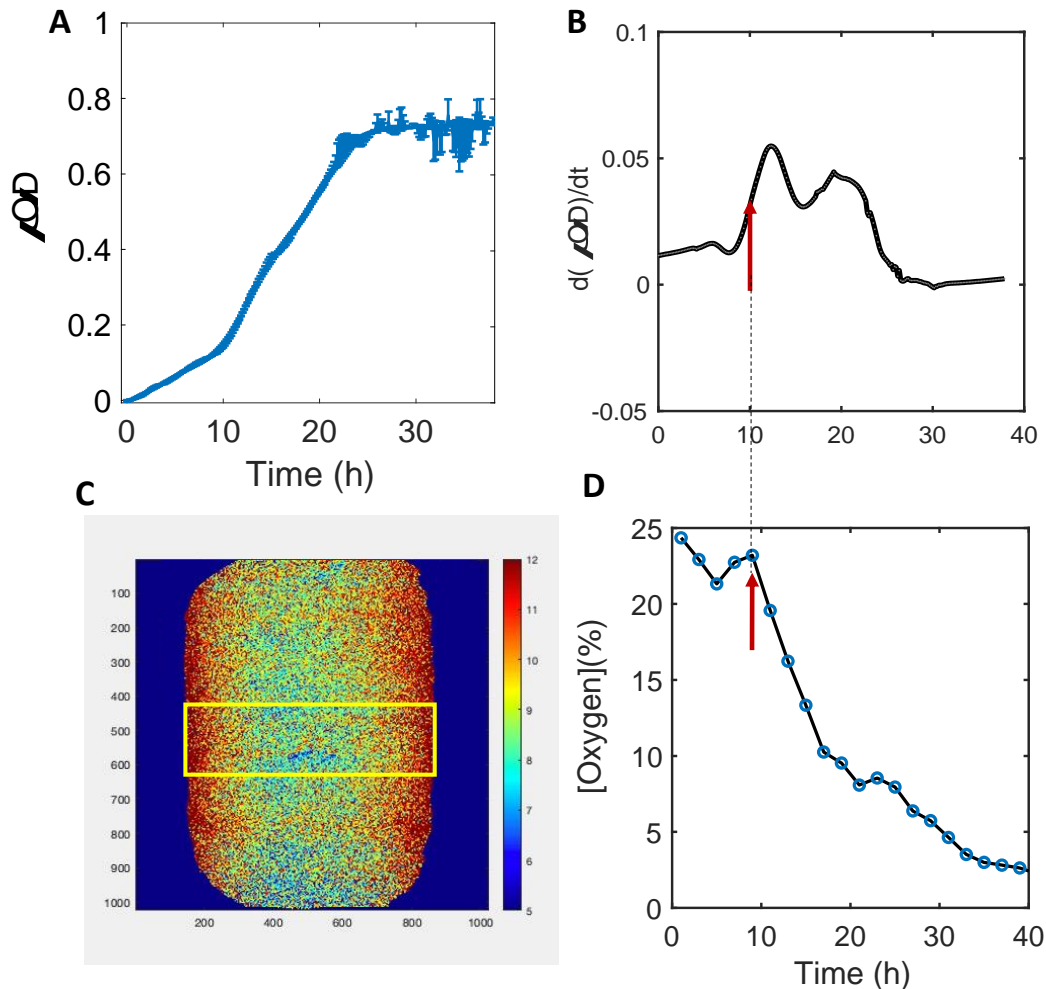
## 2. Distributions spatio-temporelles comparées du biofilm 4S et de l'oxygène dans le canal

Le développement du biofilm 4S suit un schéma spatio-temporel déterministe impliquant une succession de phases de croissance uniforme, de détachement, puis de récupération spatialement hétérogène. L'objet de la section suivante est de voir comment la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> se place dans ce schéma.

### 2.1. Biomasse et O<sub>2</sub> à la base du canal z=3μm

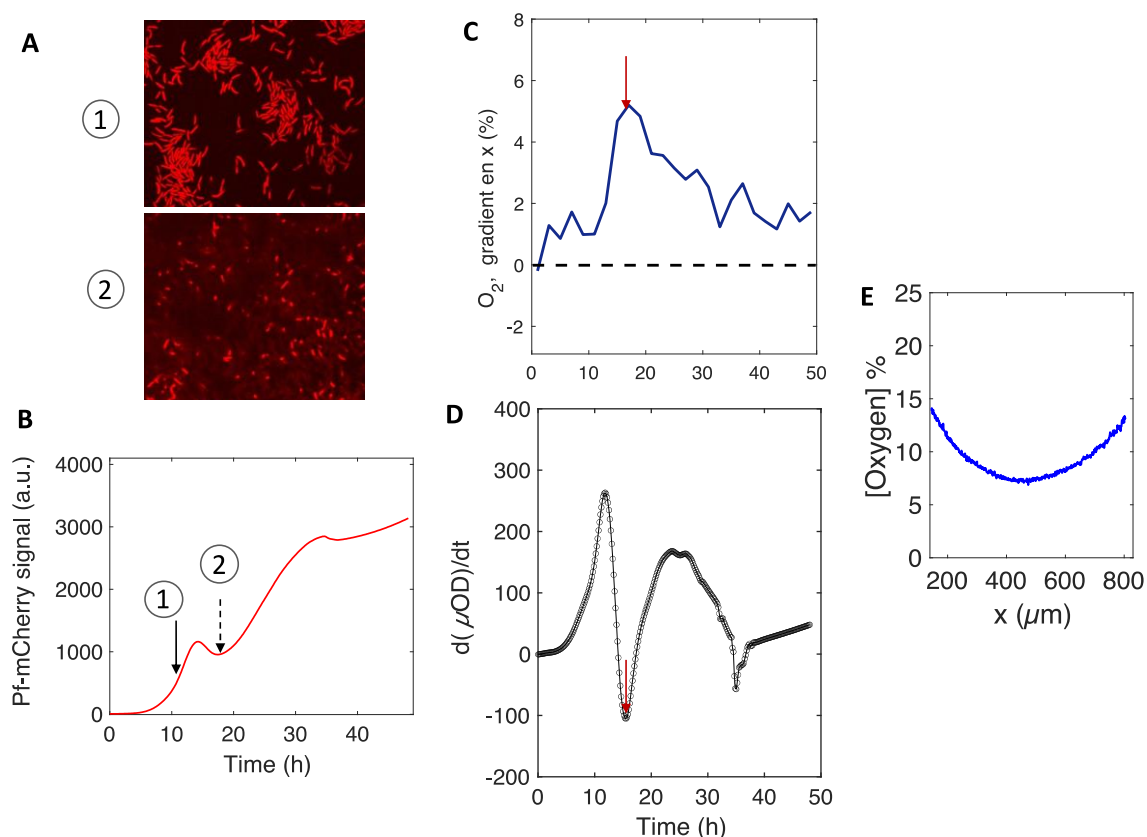
Nous comparons tout d'abord, la cinétique de croissance moyenne du biofilm à la lamelle avec les variations d'O<sub>2</sub> dans le plan situé au plus près de la lamelle  $z_1=4\mu\text{m}$ . La figure 47 A, montre la cinétique de croissance moyenne du biofilm dans le canal et sa courbe dérivée (Fig. 47 B) qui permet de souligner les variations de la vitesse de développement. La croissance du biofilm 4S entre dans une phase active avec une augmentation sensible de la vitesse de croissance après environ 8h de mise sous flux de milieu (Fig. 47 A et B), cette croissance active se poursuit sur une dizaine d'heures avant de montrer une nouvelle inflexion. En parallèle, sur la base des mesures effectuées sur les images de temps de vie comme indiqué sur la Fig. 47 C, nous traçons la cinétique de variation de l'O<sub>2</sub> au niveau de la lamelle (Fig. 47 C). Nous observons qu'une diminution nette de la concentration d'O<sub>2</sub> (valeur moyenne sur toute

la largeur du canal au niveau de la lamelle) survient à  $t=10\text{h}$ , soit 2h après l'entrée en croissance rapide du biofilm. On voit donc que dans la phase de croissance rapide du biofilm, l'augmentation de la population bactérienne entraîne une consommation d' $\text{O}_2$  qui devient rapidement suffisamment importante pour dépléter partiellement le pool d' $\text{O}_2$  du canal.



**Figure 47: Coïncidence temporelle du pic de la croissance moyenne du biofilm (à la base du canal) et la diminution du niveau d' $\text{O}_2$  dans le canal en fonction du temps.** (A) Cinétique de croissance moyenne du biofilm dans le canal en fonction du temps de la croissance du biofilm, reportée par  $\mu\text{OD}$  calculée sur la base des images du biofilm en lumière transmise (B) Courbe dérivée de croissance du biofilm montrée dans le panneau A. (C) Image de distribution de l' $\text{O}_2$  au sein du biofilm dans le canal, montrant un volume de mesure (x, y, z). (D) Cinétique de variation de l' $\text{O}_2$  au sein du biofilm dans le canal présenté par le volume montré dans le panneau C. Les flèches rouges montrent la coïncidence entre la phase de croissance rapide du biofilm donné par la courbe dérivée et le point de début de diminution du niveau d' $\text{O}_2$  en h.

## 2.2.Phase de détachement et gradient d'O<sub>2</sub> en x



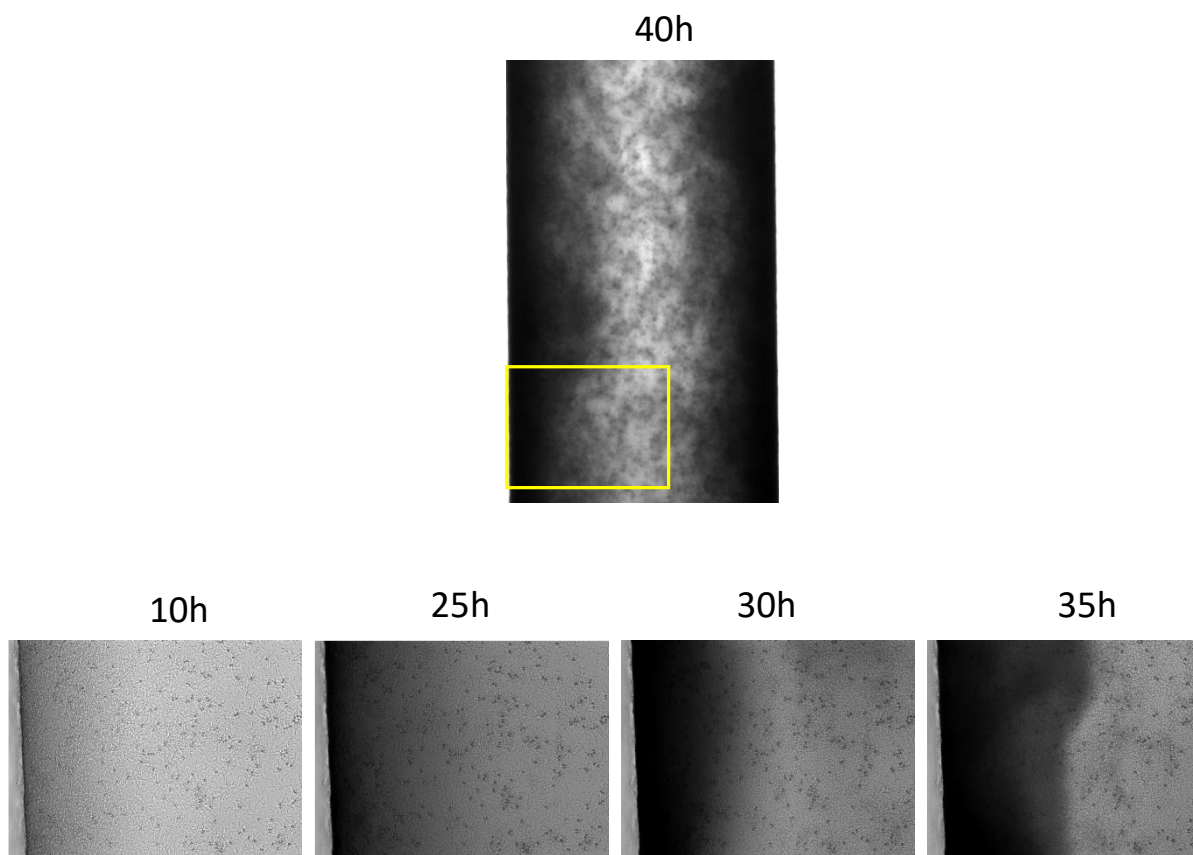
**Figure 48: Coïncidence temporelle du pic de détachement de *Pf* et de l'amplitude maximale du gradient d'O<sub>2</sub> en x.** (A) Images de microscopie de fluorescence (m-Cherry Exc 555 DM Em) dans la phase de croissance optimale où les *Pf* forment des microcolonies attachées à la surface (image du haut, numérotée 1) et en fin de détachement (image du bas numérotée 2) ; objectif 20x ; Dimensions de l'image 40µmx40µm. (B) Courbe de croissance de *Pf* dans le biofilm 4S obtenue sur la base de la fluorescence de m-Cherry. Les numéros 1 et 2 montrent les temps d'enregistrement des images du panneau A. (C) donne l'amplitude du gradient d'O<sub>2</sub> soit en fonction du temps et (D) est la courbe dérivée de la courbe de croissance montrée panneau C. Les flèches rouges montrent la coïncidence entre le point de gradient d'O<sub>2</sub> en x maximum et le maximum du détachement de *Pf* à t=17h.

Le développement du biofilm 4S connaît un épisode de détachement de l'une des espèces, *Pf* qui quitte massivement la surface de la lamelle en environ 2h avant de reprendre une croissance active (Fig.48). Le détachement est très visible à la fois sur les images (Fig.48.A) et sur les enregistrements de fluorescence de la protéine m-Cherry (Fig.48 B). La dérivée première de la fluorescence en fonction du temps met très nettement cet épisode en évidence (Fig.48 C). En rapprochant la variation du gradient en x (Fig.48 D) de la dérivée de la fluorescence, on constate que le détachement coïncide avec l'amplitude maximale du gradient d'O<sub>2</sub> en x au niveau de la lamelle.

### 2.3. Relocalisation latérale de la croissance du biofilm et gradients d'O<sub>2</sub>

en x

Après la phase de détachement de *Pf*, le biofilm reprend une croissance active relocalisée au niveau de la lamelle sur deux bandes latérales qui tendent à s'élargir (Fig.49).



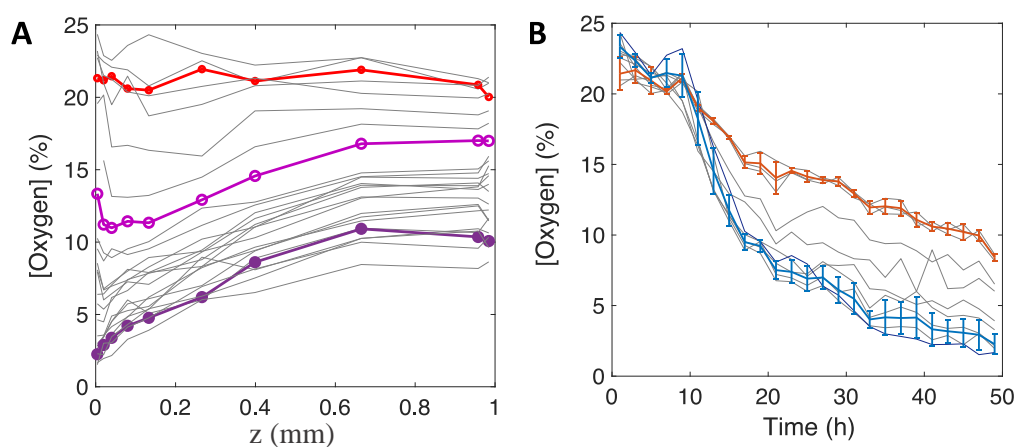
**Figure 49 : Transition spatiale du Biofilm** présentée par des images du biofilm en lumière transmise à 10h, 25h, 30h, 35h et 40h de sa croissance.

La distribution latérale de l'O<sub>2</sub> suit également ce schéma spatial, mais avec une dépendance temporelle différente. En effet, comme on vient de le voir, l'amplitude du gradient en x de l'O<sub>2</sub> culmine avec le détachement (Fig.48) après s'être amplifiée entre 10h et 20h, ce qui signifie que le gradient d'O<sub>2</sub> précède le déplacement de la croissance du biofilm sur les bords du canal. De plus, il faut constater que si la variation moyenne de l'O<sub>2</sub> par plan (exemple de z1 en Fig.48 C) semble bien évoluer inversement à la masse du biofilm, le profil latéral montre distinctement une accumulation de biofilm dans la zone à plus fort taux d'O<sub>2</sub> suggérant une relation causale inversée. Ces résultats suggèrent un scénario où la valeur moyenne de l'O<sub>2</sub> décroît comme la biomasse, mais avec une distribution spatiale où des zones à pression partielle

d'oxygène plus élevée de par la structure du canal favorisent la formation du biofilm. C'est la disponibilité de l'O<sub>2</sub> qui pilote l'organisation spatiale du biofilm. Notons que le gradient latéral d'O<sub>2</sub> qui va déclencher la transition spatiale du biofilm se forme dans une phase de croissance uniforme du biofilm du fait de l'asymétrie de l'environnement en fourniture d'O<sub>2</sub>. Le résultat contre-intuitif est que localement l'O<sub>2</sub> est plus élevé où le biofilm est plus épais. Ce phénomène tend à s'atténuer avec le temps. En résumé, la croissance uniforme du biofilm crée le gradient d'O<sub>2</sub> qui va induire un gradient de biofilm, qui atténue le gradient. Cette forme de rétroaction supporte potentiellement l'équilibre du système.

#### 2.4. Relocalisation verticale du biofilm et gradient en z de l'O<sub>2</sub>

Il a également été montré précédemment au laboratoire<sup>6 7</sup> que dans la deuxième phase de croissance du biofilm, la souche de *Pf*, et seulement elle, se développait significativement sur la face supérieure du canal (surface de PDMS). Le développement de la population dans cette niche séparée est décalé d'environ 6 heures par rapport à son développement au fond du canal. La population des *Pf* devient clairement détectable après la phase de détachement.



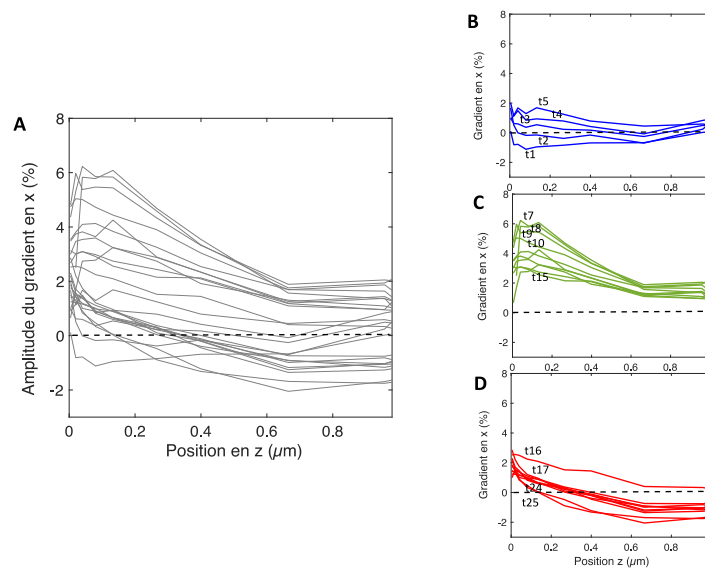
**Figure 50 : Asymétrie verticale de la distribution de l'O<sub>2</sub> qui varie dans le temps montrant une relocalisation verticale du biofilm.** (A) Concentration d'O<sub>2</sub> en fonction de la hauteur dans le canal z pour chaque temps rouge  $\Delta t=3h$ , rose  $\Delta t=15h$  et violet  $\Delta t=47h$ . (B) le niveau moyen d'O<sub>2</sub> dans la couche supérieure (présenté en orange) (à partir de 650 $\mu m$  de la lamelle) et de la couche basse (200 $\mu m$  près de la lamelle) (présentée en bleu) en fonction du temps.

La distribution de l'oxygène présente également une asymétrie verticale qui varie dans le temps. Pour examiner cela plus avant, on trace la concentration d'O<sub>2</sub> en fonction de la hauteur dans le canal z pour chaque temps (Fig.50 A). Ces courbes mettent en évidence une couche supérieure où à partir de 650 $\mu m$  de la lamelle, la concentration en O<sub>2</sub> est homogène et plus élevée que sur le reste de la hauteur du canal.

Si on trace le niveau moyen d'O<sub>2</sub> dans cette couche haute en fonction du temps en comparaison de celui de la couche basse des 200 μm près de la lamelle (Fig. 50 B), on observe que la concentration d'O<sub>2</sub> dans les plans supérieurs est toujours plus élevée que sur le reste du canal, mais qu'elle décroît avec le même profil cinétique. Le développement tardif de *Pf* sur la face supérieure pourrait donc bien lui aussi répondre au gradient d'oxygène. Ces observations confirment l'hypothèse d'une forme d'aérotaxie de l'installation du biofilm.

## 2.5. Longueurs caractéristiques des gradients

Nous venons de voir dans le paragraphe précédent qu'une couche avec une longueur caractéristique de 350 μm se trouve dans la partie supérieure du biofilm. Si on trace l'amplitude du gradient d'O<sub>2</sub> en x en fonction de z (Fig. 51), on retrouve cette longueur et on voit aussi apparaître une zone de 200 μm d'épaisseur près de la lamelle où l'O<sub>2</sub> ne varie pas en z dans la période intermédiaire de croissance du biofilm, c'est-à-dire de 10h à 30h.



**Figure 51: Amplitude du gradient d'O<sub>2</sub> en x en fonction de z.** (A) : tous les temps de la croissance du biofilm  $\Delta t$  1h jusqu'à  $\Delta t$  49h,  $t_n = (2n-1)$  heures. Les amplitudes en x en fonction de z ont été regroupées en 3 groupes de temps selon leur similarité. (B) : L'amplitude en x en fonction de z à  $\Delta t = 1$ h jusqu'à 9h. (C) : L'amplitude en x en fonction de z à  $\Delta t = 13$ h jusqu'à 29h. (D) : L'amplitude en x en fonction de z à  $\Delta t = 31$ h jusqu'à 49h.

En effet, si on examine individuellement les différents temps, on peut trier l'allure des gradients suivant z en trois catégories distinctes correspondant aux phases temporelles déjà détectées précédemment. Ainsi, on retrouve Fig. 51 B un gradient en x faible et quasiment plat en z pendant les 10 à 11 premières heures. Dans la phase intermédiaire qui suit, on voit

apparaître une zone d'environ 200 $\mu\text{m}$  d'épaisseur près de la lamelle où l'amplitude du gradient est maximale est constante. À partir de 30h, le gradient s'affaiblit et cette zone disparaît.

L'ensemble de nos résultats montre que le développement du biofilm et la variation du taux d' $\text{O}_2$  évoluent en lien étroit dans une forme de rétroaction impliquant la multiplication des populations, la consommation de l' $\text{O}_2$  par les cellules, la diffusion de l' $\text{O}_2$  dans le dispositif et de l'advection du milieu. Le biofilm lui-même ne s'étend pas physiquement à plus d'une cinquantaine de microns d'épaisseur, mais nous voyons que les gradients d' $\text{O}_2$  qui résultent de son installation dans le canal s'étendent bien au-delà ses limites physiques. L'allure du profil d' $\text{O}_2$  suggère que le biofilm 'pompe' l' $\text{O}_2$  sur un peu plus que la moitié de la hauteur canal et qu'il s'accumule dans les zones les mieux oxygénées laissant une sorte de tube central où le niveau d' $\text{O}_2$  est faible surtout au niveau de la lamelle qui ne bénéficie pas de la diffusion d' $\text{O}_2$  à travers sa surface contrairement à la surface du haut en PDMS. La zone centrale raccorde les environnements haut et bas qui évoluent à des niveaux d' $\text{O}_2$  distincts.

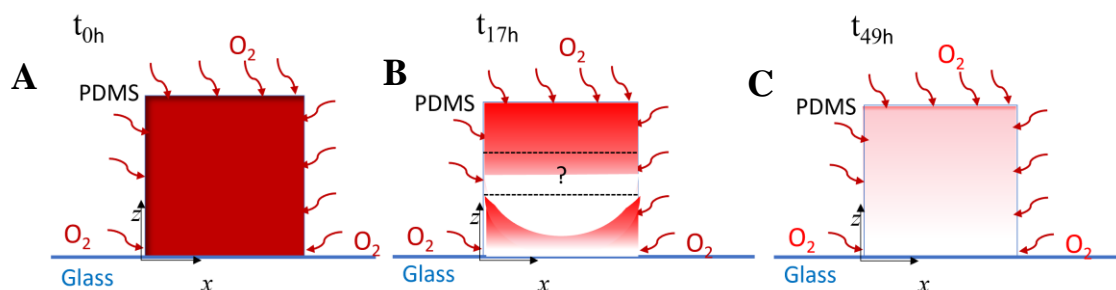
Une modélisation de la combinaison des processus de consommation, diffusion advection doit permettre de mieux décrire l'ensemble. En préalable de ce travail qui sera mené prochainement en collaboration avec nos collègues théoriciens, il est intéressant de considérer les temps caractéristiques mis en jeu sur la base des paramètres clés rassemblés table 6. On peut voir qu'à l'initiation du biofilm, la consommation potentielle d' $\text{O}_2$  par exemple par  $Pf$  est très faible par rapport à l' $\text{O}_2$  disponible en bon accord avec la période de 10h qui s'écoule avant d'observer des gradients d' $\text{O}_2$  significatifs. En revanche, en fin de croissance, le nombre de  $Pf$  attendus peut consommer la totalité de l' $\text{O}_2$  d'un canal à 21% en une minute.



**Tableau 6: Paramètres clés de la modélisation**

Composants du modèle			
Paramètres		Ordre de grandeur	Temps caractéristiques
Coefficient de diffusion de l'O <sub>2</sub>	D <sub>O<sub>2</sub></sub>	2.5x10 <sup>-9</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	400s (1mm) - 4s (100μm)
Taux de division	k	0.69 h <sup>-1</sup>	≈ 1h (temps de dédoublement)
Consommation d'O <sub>2</sub>	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	$Bt \approx 10^8$ molécules min <sup>-1</sup> cell <sup>-1</sup> $Pf \approx 2.5 \cdot 10^7$ molécules min <sup>-1</sup> cell <sup>-1</sup>	10 <sup>6</sup> Pf/ml injecté à t=0 nécessite environ 5 jours pour consommer tout le contenu du canal en O <sub>2</sub> (21%)
Vitesse d'advection moyenne	$\bar{v}$	≈ 30μm/s	1.8 min pour renouveler tout le canal en considérant une vitesse moyenne de $\phi/S$ avec $\phi=1$ ml/h
Volume du canal	V	30μl (1mmx1mmx30mm)	
Nb Cellule/canal à l'équilibre	n	$Bt \approx 2 \cdot 10^7$ $Pf \approx 2 \cdot 10^8$ (Mesuré après extraction du biofilm à 48h)	Consommé le contenu d'un canal entier chaque min (30 μl à 21% O <sub>2</sub> )

La modélisation de l'ensemble nous permettra de mettre des nombres sur le schéma de principe ci-dessous :

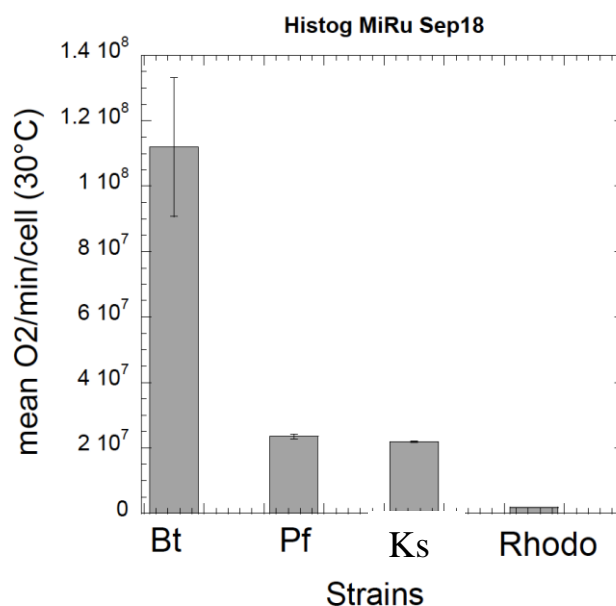


**Figure 52: Description qualitative du principe** de la combinaison des processus de consommation, diffusion advection dans le canal en présence du biofilm. (A) Consommation faible de l'O<sub>2</sub> par les bactéries à l'initiation du biofilm. O<sub>2</sub> (rouge foncé) homogène dans le

canal. (B) Des gradients d'O<sub>2</sub> significatifs apparaissent après ~12h de croissance de biofilm. (C) En fin de croissance, environnement anoxique et le nombre de *Pf* attendu peut consommer la totalité de l'O<sub>2</sub> dans le canal.

### III. Profils spatio-temporels individuels

Comme nous venons de le voir, l'installation des quatre espèces de bactéries dans le canal sous flux conduit à la formation de deux biofilms différents installés dans des niches distinctes, l'un résultant de l'assemblage des 4 espèces sur la lamelle de verre et un biofilm mono-espèces de *Pf* installé sur la face supérieure en PDMS. Nous venons de voir les relations étroites de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> avec le développement de ces deux communautés adhérentes. Pour éclairer plus avant nos conclusions, nous avons entrepris de mesurer également la distribution de l'O<sub>2</sub> lors de la formation des biofilms mono-espèces pour *Bt*, *Pf* et *Ks*.

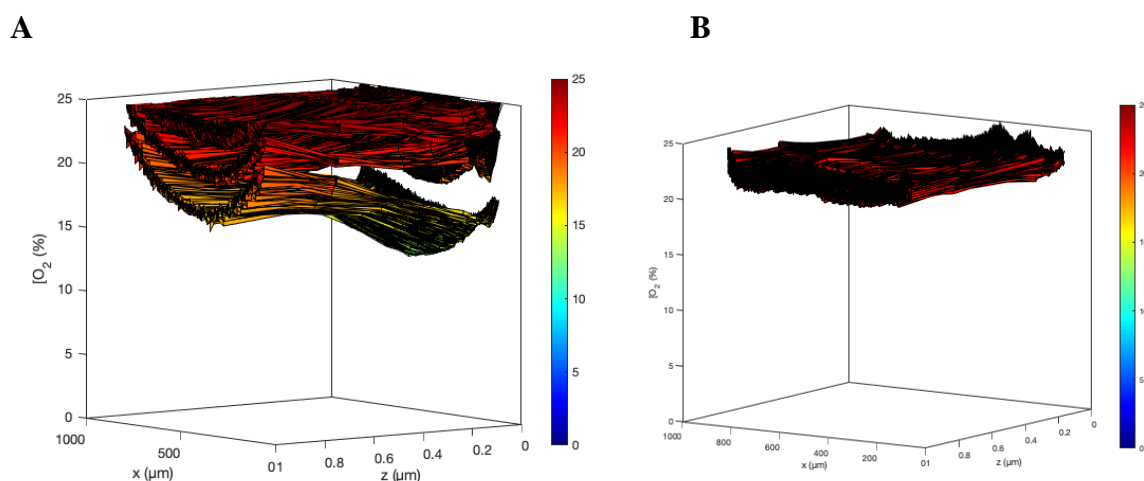


**Figure 53: Moyenne de la consommation individuelle d'O<sub>2</sub> de chaque espèce des bactéries.** Bactéries en suspension en MB à 30°. Expériences en collaboration avec Carine Douarche

La consommation individuelle des bactéries en nombre de moles d'O<sub>2</sub> par cellule et par unité de temps dépend des espèces. Il est admis depuis longtemps qu'elle est assez bien corrélée à la taille<sup>80</sup>. Les mesures faites au laboratoire sur des cultures planctoniques de chacune des espèces ont donné les résultats présentés dans la Fig.53 et confirmant le lien à la taille. Cependant, ce que devient cette règle dans l'élaboration d'un biofilm n'est pas clair.

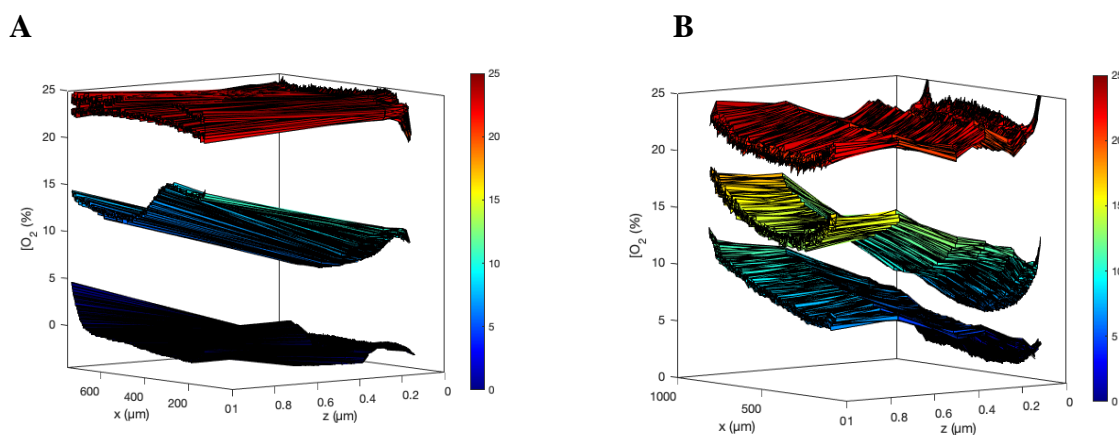
## 1. Biofilm de *Bt* mono-espèce

La figure 54 A, donne la représentation tridimensionnelle de l'O<sub>2</sub> dans le canal au long de la croissance du monobiofilm de *Bt*. On voit que la déplétion en O<sub>2</sub> est moindre en comparaison du biofilm 4S (Fig.41), mais suffit à établir des gradients en x et en z. On constate d'ailleurs que dans cette situation où aucun développement de biofilm n'a lieu sur la face supérieure, le gradient créé par la croissance de *Bt* à la lamelle même s'il est faible s'étend à la fin ( $\Delta t=49h$ ) sur toute la hauteur sur toute hauteur du canal. Notons cependant que toutes les valeurs d'O<sub>2</sub> restent supérieures à 15%.



**Figure 54: Représentation 3D de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> dans le canal en présence d'un biofilm mono-espèce de *Bt* (A) et en présence des micelles de ruthénium seules dans le canal (B) Les distributions présentées sur les deux panneaux A et B sont aux mêmes temps :  $\Delta t=3h$ ,  $\Delta t=19h$  et  $\Delta t=49h$ . Chaque couche est une pile en z présentée selon x et correspondant à un temps t, un jeu de couleur précisant les concentrations en O<sub>2</sub> allant du bleu (0%) au rouge (25%).**

## 2. Biofilm de *Pf* mono-espèce



**Figure 55: Représentation 3D de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> dans au sein d'un biofilm mono espèce de *pf* à Δt3h Δt19h Δt49h (A) VS celle déterminée au sein du biofilm 4S (B), aux mêmes temps t et avec les mêmes échelles et conditions. Chaque couche est une pile de cartographie en z selon x à un temps t. les couleurs représentent les valeurs des concentrations en O<sub>2</sub> allant du bleu (0%) jusqu'au rouge (25%).**

La Fig. 55 montre une très forte déplétion en O<sub>2</sub> liée à l'installation de *Pf* dans le canal en bon accord avec l'hypothèse du nécessaire partage des ressources en communauté multi-espèces qui expliquerait donc le développement plus favorable de *Pf* en biofilm mono-espèces. On constate aussi que l'amplitude des gradients en z est plus faible pour le monobiofilm de *Pf*. Nous n'avons pas à l'heure actuelle d'explications claires pour cela. La vitesse de déplétion pourrait jouer un rôle ainsi que l'homogénéité des populations situées en haut en bas du canal. La mise en œuvre d'un modèle quantitatif devrait nous permettre d'éclaircir ce point.

Quant à *Kocuria salsicia* et *Rhodocyclus sp.*, leurs profils d'O<sub>2</sub> sont peu intéressants. *Kocuria salsicia* est bloqué à un stade d'amas par *Bacillus thuringiensis* et ne participe pas à la transition spatiale du biofilm 4S<sup>6</sup>. Les cellules de *Rhodocyclus sp.* et en raison de leur petite taille, de leur forte motilité et de l'absence de marquage, l'évolution temporelle de cette population n'a pas pu être déterminée avec précision.

## IV. Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons démontré la relation étroite qui lie le développement d'un modèle de biofilm multi-espèces en canal millifluidique et la distribution spatio-temporelle de l'oxygène au sein du biofilm. La mesure in situ non destructive réalisée grâce aux micelles de Ruthénium a permis d'élaborer une cartographie tridimensionnelle de l'O<sub>2</sub> sur l'ensemble du canal aussi bien dans les zones occupées par le biofilm que sur les zones libres parcourues par le flux de milieu. Nous avons ainsi mis en évidence l'émergence de gradients selon une cinétique non monotone que nous avons pu confronter aux événements majeurs de l'installation du biofilm. L'ensemble des résultats nous a permis d'établir une relation causale où la première phase de croissance du biofilm et la consommation d'O<sub>2</sub> qui en découle induit des gradients en O<sub>2</sub> qui vont à leur tour gouverner la structuration spatiale du biofilm laquelle atténuera les gradients formés jusqu'à un profil stable qui perdure et coïncide avec l'équilibre dynamique de la communauté.

Nous voyons que ce mécanisme instaure une forme d'aérotaxie du biofilm. Le mécanisme qui sous-tend ce processus n'est abordé dans ce travail. Son éclaircissement serait sans aucun doute une avancée importante dans la compréhension de ces systèmes en flux. En effet, de nombreuses études ont été menées sur des colonies mono-espèces sur agar montrant la déplétion hétérogène en O<sub>2</sub><sup>85 86</sup> et l'importance de la disponibilité de l'O<sub>2</sub> sur la morphologie des colonies et la résistance aux antibiotiques<sup>118 92</sup>, aucune étude à notre connaissance ne décrit ces mécanismes sur un biofilm composite en flux. Une hypothèse basique serait de considérer que le niveau d'O<sub>2</sub> local contrôle la division des cellules et que la biomasse augmente sélectivement dans les zones les mieux oxygénées. Cependant comme nous l'avons déjà évoqué la relation liant la vitesse de croissance et le taux d'O<sub>2</sub> ambiant dépend beaucoup des espèces<sup>83</sup> et on ignore ce qu'elle devient en biofilm. Nous avons initié de premières expériences pour étudier cette relation chez *Pseudomonas fluorescens* en biofilm et constaté que le premier niveau de réponse de cette bactérie à une réduction du niveau d'O<sub>2</sub> consistait à induire son propre détachement. Une étude plus élaborée doit donc être entamée pour ce fonctionnement, en effet nous avons maintenant les moyens de quantifier exactement la concentration locale d'O<sub>2</sub> qui déclenche le détachement, ainsi que les vitesses de croissance associées. Cette observation montre bien qu'au-delà de sa consommation comme nutriment limitant, l'O<sub>2</sub> est un facteur de régulation de voies biologiques précises. Par ailleurs, le niveau d'O<sub>2</sub> va également

conditionner l'accumulation des espèces réactives oxydantes (ROS) et on sait que c'est aussi un facteur de régulation métabolique qui peut par exemple affecter la production d'EPS<sup>119</sup>.

Nous avons développé dans ce travail une expérience qui nous donne accès à la carte spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> de façon non-invasive avec une résolution temporelle de l'ordre de quelques minutes, suffisante à l'échelle du fonctionnement du biofilm. La résolution spatiale en (x, y) de l'ordre du pixel est également suffisante. Nous avons travaillé avec une résolution spatiale en z d'une dizaine de micromètres que l'on pourrait envisager d'améliorer pour entrer plus en détail dans le biofilm lui-même. La réduction de la focale de la lentille cylindrique pourrait amener en prenant soin de corriger les aberrations optiques à optimiser l'épaisseur de la nappe jusqu'à environ 3µm. Pour progresser davantage, des techniques de nappe de lumière sur réseau<sup>120</sup> sont développées, avec des résolutions axiales annoncées de 0.1µm. Cependant la mise en œuvre est complexe et descendre sous le micron en biofilm n'est sans doute pas nécessaire.

L'équilibre de l'oxygène apparaît ici comme un facteur majeur de la structuration de la communauté multi-espèce. Il est dominé par l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, l'espèce ayant la combinaison (taille de population x consommation individuelle d'O<sub>2</sub>) la plus élevée. L'accumulation au bord du canal qui jusqu'à présent avait surtout été décrite comme un effet de l'hydrodynamique<sup>121 122</sup> trouve ici un autre moteur.

Nous avons aussi montré que la consommation d'O<sub>2</sub> associée à la formation d'un biofilm est très importante du fait de la forte densité cellulaire du matériau vivant et de la limitation intrinsèque de la ressource fixée par la pression atmosphérique. Nous avons montré que le biofilm pompait l'oxygène au-delà de ces propres limites spatiales avec des longueurs caractéristiques de l'ordre de dix fois l'épaisseur du biofilm lui-même.

L'ensemble du processus est dans son détail étroitement lié à l'architecture du dispositif néanmoins le fonctionnement est général et l'impact des propriétés de l'environnement et de l'équilibre de l'O<sub>2</sub> sur les mécanismes de formation des biofilms est une règle universelle.



## Chap. 5. Colonisation de la communauté adhérente

### bactérienne 4 espèces par un cinquième élément, *E. coli*.

Le biofilm à 4 espèces, implanté en canal millifluidique en flux contrôlé de nutriments offre un système d'étude de ces communautés complexes que sont les biofilms multi-espèces. Les nouvelles questions quant à l'émergence de propriétés spécifiques, mais aussi de compétences écologiques peuvent y être abordées dès que l'on en comprend bien le fonctionnement.

La caractérisation de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> que nous avons menée au chapitre précédent a montré l'importance de la déplétion en O<sub>2</sub> sur l'installation biofilm. Nous réalisons dans le chapitre présent, l'étude d'une perturbation sociale sur le biofilm 4S, en introduisant une cinquième espèce et en étudiant son implantation dans le canal. Nous utilisons *E. coli* comme 5<sup>ème</sup> élément, car c'est une espèce très bien connue et étudiée dont la manipulation génétique est accessible.

Dans ce travail, nous avons caractérisé comment les différentes phases de développement du biofilm influencent l'intégration d'autres micro-organismes. Je vais présenter ici brièvement les principaux éléments que l'on pourra trouver plus en longueur dans le preprint<sup>123</sup> ajouté à la fin du chapitre. Ce travail ayant chronologiquement précédé la cartographie de l'O<sub>2</sub>, je discuterai les conclusions à la lumière de nos résultats du chapitre 4 en ouvrant des perspectives pour confirmer nos hypothèses.

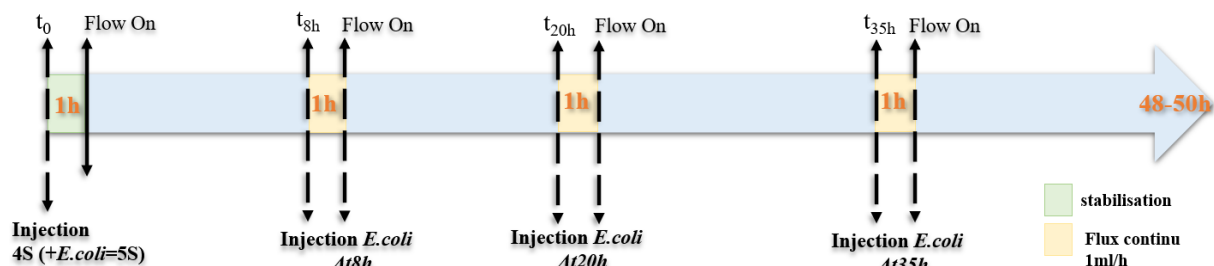


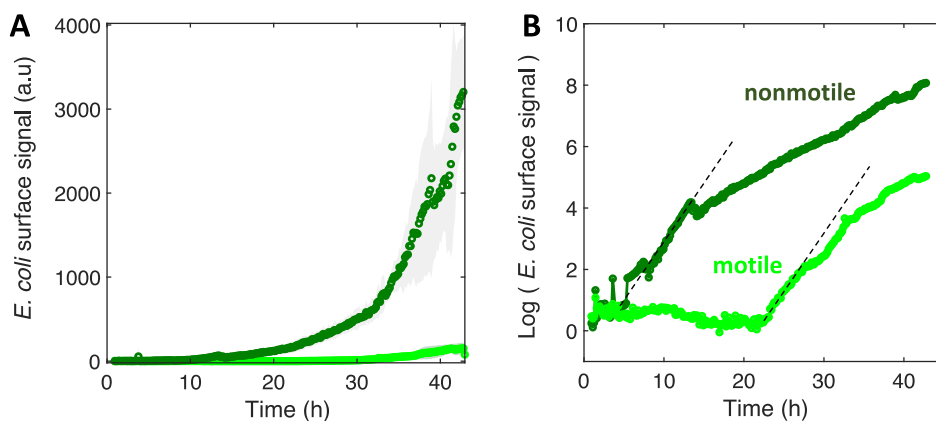
Figure 56 : Schéma simplifié des invasions du biofilm à différents stades de son développement.

Nous avons mis en place un protocole dans le but d'étudier la capacité des *E. coli* à coloniser la communauté 4S à différents stades de son développement. La 5<sup>ème</sup> espèce a d'abord



été co-injectée avec les 4 autres espèces à la même concentration pour explorer la formation d'une communauté à 5 espèces (5S). Puis nous avons examiné la capacité à intégrer ou envahir le biofilm après 8, 20 et 36 heures de croissance du biofilm (Fig.59). Ces temps correspondent respectivement au premier climax de la communauté de 4 espèces, au début de la seconde phase de croissance et à l'équilibre dynamique établi (Fig.47.B). Pour cette série d'expériences, les 4 espèces du biofilm n'expriment aucune fluorescence, leur développement est suivi par vidéo-microscopie de lumière transmise. Le comportement d'*E. coli*, l'espèce colonisatrice est, elle, marquée en fluorescence par l'expression de la protéine de fusion, m-Cherry-FAST. La capacité d'*E. coli* à s'intégrer au biofilm 4S à ces différents stades est étudiée pour une souche motile et une souche non-motile.

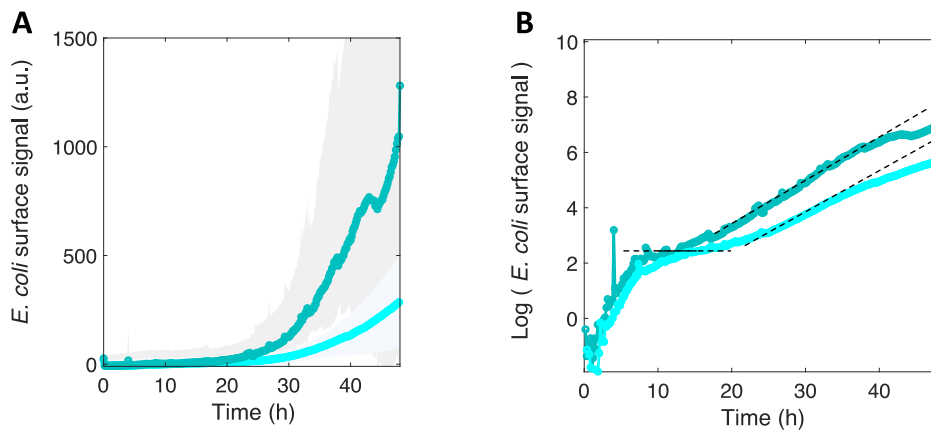
Afin d'évaluer les capacités d'*E. coli* à co-coloniser le biofilm nous avons tout d'abord établi sa capacité à former un biofilm mono-espèces en absence de tout autre colonisateur. La figure 57 montre deux cinétiques distinctes pour la souche motile et non motile avec principalement l'introduction d'un retard de plusieurs heures pour la souche motile.



**Figure 57: La motilité retarde la formation du biofilm.** A) Cinétiques de croissance d'*E. coli* en mono-biofilm rapportées par la fluorescence (Mot+ en vert clair et Mot- en vert foncé). B) Logarithme de l'intensité de la fluorescence d'*E. coli* dans le canal millifluidique pour Mot<sup>+</sup> (vert clair) et Mot<sup>-</sup> (vert foncé) en fonction du temps. Le logarithme est calculé à partir de l'intensité moyenne de 3 positions distinctes dans au moins 2 canaux différents. Le biofilm se développe sous un flux de 1ml/h de milieu, à 30°C. Les lignes pointillées soulignent la partie linéaire de la croissance.

Sur la base d'un modèle mathématique simple, nous proposons que la motilité retarde l'accès à la surface des bactéries. C'est un point important pour la discussion des résultats de ce chapitre à la lumière du chapitre 4.

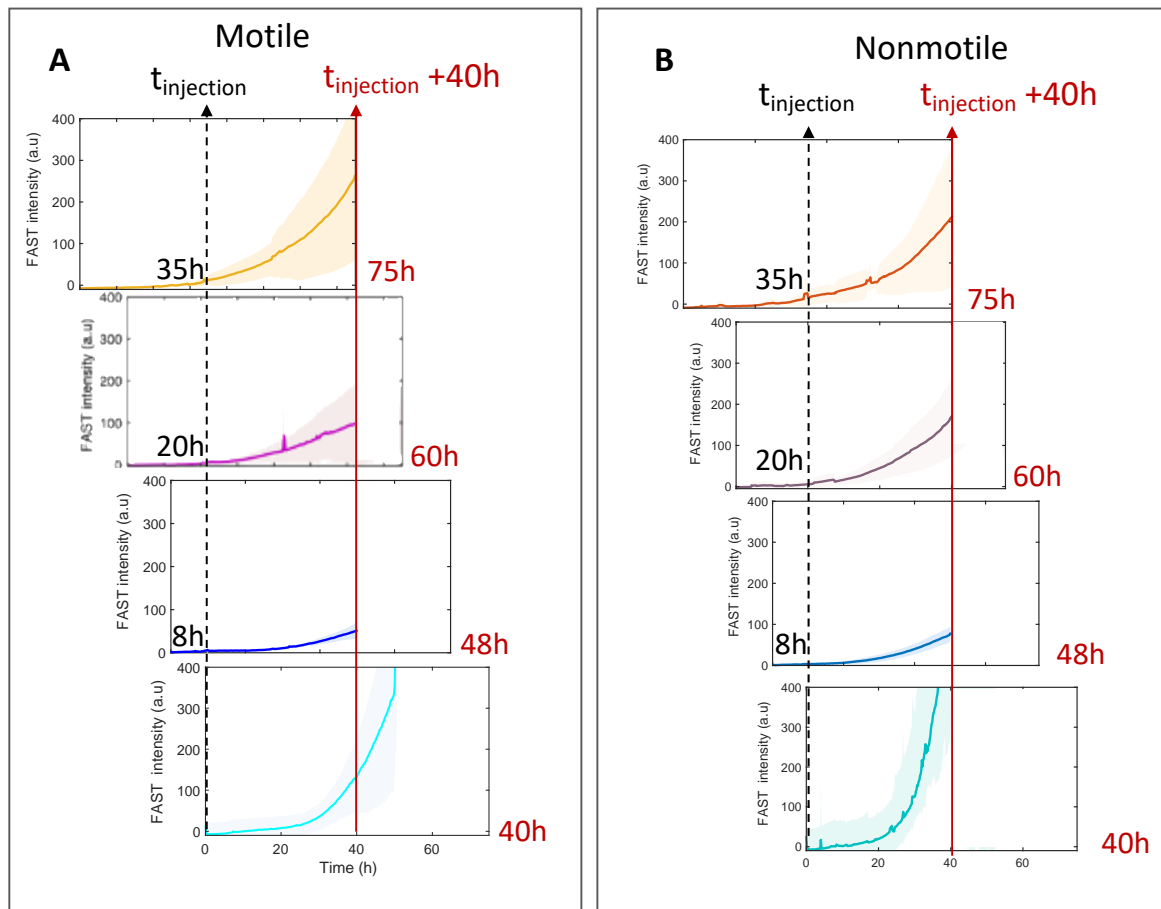
Nous nous sommes ensuite appuyés sur ces données de mono-espèce pour évaluer les effets de la présence des co-colonisateurs.



**Figure 58: Colonisation de surface d'*E. coli* motile et non motile en présence de co-colonisateurs.** Fluorescence des *E. coli* motiles (en cyan clair) et non motiles (en cyan foncé) (A) dans le biofilm formé en présence des quatre co-colonisateurs *Bt*, *Pf*, *Ks* et *Rh*. L'affichage logarithmique (B) met en évidence deux phases distinctes dans le développement d'*E. coli* dans le biofilm composite multi-espèces. Les lignes pointillées soulignent le niveau du plateau de la première phase et le taux de croissance de la deuxième phase.

Dans la situation de co-colonisation (5S) où la cinquième espèce est injectée en même temps que les 4S (Fig.58), nous observons que l'installation d'*E. coli* est 3 fois moins importante que lorsque l'espèce s'installe seule, en particulier dans le cas de la souche non motile. On observe aussi la succession de deux phases différentes du biofilm mono-espèces et présentant le même timing chez la souche motile et non motile, la présence de co-colonisateurs réduisant significativement la différence entre la souche motile et non motile. Les différentes phases ont été rapprochées des phases caractéristiques du développement du biofilm (cf. preprint) et constaté une synchronisation entre l'installation d'*E. coli* dans la communauté à quatre espèces et les climax du 4S. Ces résultats indiquent que la présence des co-colonisateurs a un impact important sur le processus de colonisation de la surface par *E. coli*, en induisant un remodelage cinétique de la colonisation et en abolissant presque complètement la différence entre les cellules motiles et non motiles dans leur efficacité de colonisation. Ce nous a amené à

formuler l'hypothèse d'un effet induit par le changement de l'environnement lié à l'installation des 4 espèces.



**Figure 59: *E. coli* ne parvient pas à coloniser la surface avec un biofilm multi-espèces préétabli.** L'intensité de la fluorescence FAST - qui signale la formation du biofilm d'*E. coli* - est montrée sur les 40 heures d'injection d'*E. coli* dans le canal où une communauté 4S s'est établie pour 0h, 8h, 20h et 35h du bas (0h) au haut (35h) du panneau A pour les cellules motiles et du panneau B pour les cellules non motiles. La flèche verticale en pointillés indique le moment de l'injection et la flèche rouge indique le moment  $t=40h$  après l'injection. Seule la situation de co-colonisation correspondant à l'injection au temps  $t=0$  présente une colonisation détectable par *E. coli*.

Nous avons poursuivi le travail en étudiant l'intégration d'*E. coli* aux différents stades de croissance du biofilm avec pour comparaison le rappel des cinétiques obtenues en 5S (Fig.58). Les *E. coli* sont injectés aux différents temps après le début de la croissance et l'on observe ensuite son intégration après 40h. On constate que dès 8h, la différence entre les cellules motile et les non motile est totalement abolie. De plus on trouve que l'installation et donc la colonisation du biofilm 4S préexistant est négligeable. En effet les niveaux de fluorescence ne dépassent pas significativement le bruit de fond introduit par la croissance du

4S. Nous avons conclu de ces résultats que la préexistence d'une communauté établie sur la surface empêche l'installation d'*E. coli*, qu'il soit motile ou non.

Nous avons discuté ce travail en avançant l'hypothèse d'un effet des co-colonisateurs et du biofilm préexistant passant par des variations imposées d'O<sub>2</sub> avant d'avoir obtenu la cartographie du 4S. En effet, nous étions déjà alertés sur des comportements de détachement et de variation de fluorescence pointant l'O<sub>2</sub> comme un paramètre potentiellement important de la structuration de la communauté 4S et nous avons observé que la présence des co-colonisateurs altérait nettement les effets de la motilité. Par ailleurs, on sait que la réduction du niveau ambiant d'O<sub>2</sub> affecte la motilité en particulier celle d'*E. coli*<sup>82</sup>. Nous avons donc supposé que l'un des effets importants de la présence des colonisateurs était d'altérer la motilité des cellules. Cette hypothèse reste plausible à la lumière des résultats du chapitre 4 où nous montrons les variations spatio-temporelles de l'O<sub>2</sub> largement corrélées aux phases de développement de la communauté 4S.

Pour confirmer cela, il faudrait maintenant que nous puissions coupler les mesures d'O<sub>2</sub> aux injections et au développement de la cinquième espèce de façon à confirmer ce lien. Cela supposerait l'installation et le pilotage d'une 3<sup>ème</sup> voie d'injection, un degré de complexité du montage supplémentaire, mais sans doute une approche possible.



**Title:**

**FLAGELLAR MOTILITY DURING *E. COLI* BIOFILM FORMATION PROVIDES A COMPETITIVE DISADVANTAGE WHICH RECEDES IN THE PRESENCE OF CO-COLONIZERS.**

**Authors:**

Wafa Benyoussef, Maxime Deforet, Amaury Monmeyran and Nelly Henry

**Authors address:**

Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire Jean Perrin (UMR 8237), 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

**Corresponding Author:**

Nelly Henry, Laboratoire Jean Perrin  
[nelly.henry@sorbonne-universite.fr](mailto:nelly.henry@sorbonne-universite.fr)

## Abstract

In nature, bacteria form biofilms in very diverse environments, involving a range of specific properties and exhibiting competitive advantages for surface colonization. However, the underlying mechanisms are difficult to decipher. In particular, the contribution of cell flagellar motility to biofilm formation remains unclear. Here, we examined the ability of motile and nonmotile *E. coli* cells to form a biofilm in a well-controlled geometry, both in a simple situation involving a single-species biofilm and in the presence of co-colonizers. Using a millifluidic channel, we determined that motile cells have a clear disadvantage in forming a biofilm, exhibiting a long delay as compared to nonmotile cells. By monitoring biofilm development in real time, we observed that the decisive impact of flagellar motility on biofilm formation consists in the alteration of surface access time potentially highly dependent on the geometry of the environment to be colonized. We also report that the difference between motile and nonmotile cells in the ability to form a biofilm diminishes in the presence of co-colonizers, which could be due to motility inhibition through the consumption of key resources by the co-colonizers. We conclude that the impact of flagellar motility on surface colonization closely depends on the environment properties and the population features, suggesting a unifying vision of the role of cell motility in surface colonization and biofilm formation.

## Introduction

Biofilms represent the preferred lifestyle for bacteria<sup>1</sup>. In these three-dimensional structures, the aggregated cells prosper in a self-produced polymer extracellular matrix that protects them from shear stress, grazers and biocides<sup>2,3</sup>. The formation of a biofilm is a highly multifactorial process in which the cell properties and the details of the environment are both important, bringing about a tremendous diversity in behavior.

In the planktonic state, most bacteria swim in a series of runs and tumbles and rotate their flagella assembled in bundles<sup>4-6</sup>, which provides a significant adaptive advantage in nutrient search<sup>7</sup>. The importance of this cell motility to biofilm formation has been investigated in a large spectrum of bacterial species and environmental conditions, resulting in differing viewpoints. For example, early research determined that motility was crucial for biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*<sup>8</sup>, *Listeria monocytogenes*<sup>9</sup> and *Escherichia coli*<sup>10,11</sup>. Furthermore, flagellar motility is often associated with increased virulence in pathogenic species, with motile bacteria exhibiting facilitated host colonization<sup>12</sup>.

Different functional mechanisms may actually be involved in motility effect to biofilm formation which do not necessarily engage flagella-assisted adhesion<sup>13</sup>. Motility per se can support aerotaxis, inducing interface accumulation which indirectly promotes biofilm formation<sup>8,14</sup>. It has also been shown that elongated motile bacteria could accumulate near the surface due to hydrodynamic trapping. However, this happens only at a reduced distance of the surface<sup>11,15,16</sup>. Besides, motility regulation overlaps with a complex signaling network that controls functions involved in biofilm formation such as quorum sensing or exopolysaccharide production<sup>17,18</sup>. It has therefore been difficult to determine both a clear causal relationship and the mechanisms that could support a hypothesis of motility as an advantageous feature for biofilm-forming bacteria.

In *E. coli*, flagellar activity has been proposed to facilitate the initial contact of the cell with the surface, potentially helping to overcome repulsive forces on the surface<sup>10</sup>. Nevertheless, when other surface appendages such as Curli or conjugative pili are constitutively expressed, flagella become dispensable for the initial adhesion and biofilm development<sup>19,20</sup>, suggesting motility per se might not be the adhesion promotion factor. On the other hand, flagella mechanosensory function as a surface-sensing tool has been proposed to govern the planktonic-sessile transition underlying biofilm formation<sup>21,22</sup>. However, in this case the surface



detection by the flagella culminates in motility downregulation. Consistently, high concentrations of the second messenger cyclic diguanylate (c-di-GMP) have been shown to correlate with motility downregulation and the development of a thick biofilm<sup>23,24</sup>. These results seem paradoxical with regard to the positive effect of motility on biofilm development, highlighting motility and biofilm development as mutually exclusive events. Nevertheless, bacteria may also swim within a mature biofilm<sup>25</sup>.

Motility has also been suggested to influence biofilm maturation and architecture<sup>11,26</sup>, although reports about the impact of cell motility on later stages of biofilm development are scarce. In *Vibrio cholerae*, motility has been proposed to favor the invasion of resident biofilms<sup>27</sup>. Ultimately, the motility effect on biofilm formation significantly changes depending on the environment, including surface properties and hydrodynamics<sup>28</sup>. Therefore, despite its obvious competitive fitness advantage in planktonic life (particularly regarding nutrient pursuit), the question of whether cell motility is a superior trait in surface-colonizing competition remains open.

To address this issue, we examined biofilm formation by motile and nonmotile *E. coli* cells in the controlled geometry of a millifluidic device from a kinetic perspective, covering both the short and long-time scales of the adherent community development. This allowed us to search for mechanistic information that could distinguish the colonizing ability of swimming cells from their nonmotile counterparts. In this study, we take motility to mean flagellar motility apart from surface-associated motions such as swarming or twitching<sup>29</sup>. We thus examined the simple situation of motile vs. nonmotile *E. coli* strains colonizing a bare glass surface, followed by a more complex and more naturally relevant situation involving the same strains in the presence of other species in a co-colonization test. The latter included a 4-species assemblage that we previously showed to form a deterministic community in about 40 hours of growth under continuous nutrient flow in a millifluidic channel<sup>30</sup>. The use of this continuous flow growth mode makes it possible to control the physicochemical properties of the environment throughout the development of the biofilm, and ensures that the biofilms can be thoroughly compared.

Our results reveal a clear-cut effect of motility on surface colonization, which consists in introducing a lag time of several hours to the biofilm development. Meanwhile, the motile and nonmotile cells display a similar biofilm growth rate. We interpret this effect in terms of a spatial exploration discrepancy. Finally, we reveal how the presence of co-colonizers affects

this behavior and discuss the strong dependence of flagellar motility effects on specific environmental conditions.

## Materials and Methods

### Bacterial strains and culture conditions

*E. coli* strains were derived from *E. coli* K-12 classified as MG1655. In addition to the wild type motile strain, we used the nonmotile variant which lacks the insertion sequence *IS1* upstream of the *flhD* promoter. This consequently blocks cell swimming, as shown by flagellar motility tests (Fig. S1). Both strains express the conjugative F-pilus carried by the F-plasmid IncFI, which ensures robust biofilm formation<sup>31</sup>, and the FAST-mCherry fusion protein to provide biofilm-relevant fluorescence labeling<sup>32</sup>. For surface dynamics monitoring experiments, we used variants that constitutively express GFP. The co-colonizers belong to a previously described four-species community<sup>33</sup> consisting of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), a 407 Cry<sup>-</sup> strain, *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*) (WCS365), *Kocuria varians* (*Kv*) (CCL56), and *Rhodocyclus* sp. (*Rh*) (CCL5). For 4S biofilm kinetic monitoring, we used fluorescent *Bt* and *Pf* variants carrying the FAST gene on the chromosome<sup>30</sup> and plasmidic mCherry (pMP7605)<sup>34</sup>, respectively. The strains were routinely cultivated at 30°C on M1 medium. Details about strains and culture media in Supplementary Information.

### Millifluidic device

Millifluidic channels were microfabricated to be 30 mm x 1 mm x 1 mm (length x width x height). A polydimethylsiloxane (PDMS) mixture (RTV615A+B; Momentive Performance Materials) was poured at ambient temperature in a polyvinyl chloride home-micromachined mold and left to cure at least 3 hours in an oven set at 65°C. Next, the recovered templates were drilled for further plugging of adapted connectors and tubing. PDMS templates and glass coverslips were then cleaned using an oxygen plasma cleaner (Harrick) and immediately bound together to seal the channels. The channels are then immediately filled with ultrapure sterile water to avoid prolonged contact with air before injecting the cells within the following 3 to 4 hours. For connections, we used 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). The thin metallic connectors provide a bottleneck in the flow circuit, which prevents upstream colonization. The sterile medium was pushed into the channels at a rate of 1 ml/h with syringe pumps for the 36-40 hours of the experiment. The whole experiment was thermostatically maintained at 30°C.

## Biofilm formation

*Initiation:*  $1.2 \times 10^5$  cells were obtained from exponentially growing cultures. Cell injections were performed directly into the PDMS channels using a syringe equipped with a 22G needle before connecting the tubing. Next, the cells were allowed to settle for 1h30 before starting the medium flow. All times at  $t=0$  referred to the flow triggering time. For biofilm growth, we used MB medium, which is adapted from M1 medium (details provided in Supplementary Information). Overnight cultures in M1 — seeded with a single colony from M1-agar plates — were grown at 30°C under agitation. Exponential phases were obtained from dilutions in M1 of these overnight cultures incubated at 30°C under agitation. The same protocol was applied in the presence of co-colonizers, except that  $1.2 \times 10^5$  cells from exponentially growing cultures of each co-colonizer were injected at the same time as *E. coli* into the channel.

## Microscope imaging

*Microscopy:* We used an inverted NIKON TE300 microscope equipped with motorized x, y, and z displacements and shutters. Images were collected using a 20 × S plan Fluor objective (NA 0.45 WD 8.2-6.9 mm). 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 filter for m-Cherry (Ex 562/40nm DM 593 Em. 641/75). Excitation was performed using an LED box (CoolLed pE-4000). For dynamics measurements, confocal images were collected using a spinning disk Crest X light V2 module (Gataca, France distribution) with an axial resolution of 5.8 μm.

## Image acquisition

A Hamamatsu ORCA-R2 EMCCD camera was used for time-lapse acquisitions of 1344×1024 pixel images with 12-bit grey level depth (4096 grey levels), and to capture an *xy* field of view of 330 μm × 430 μm. Bright-field and fluorescence images were typically collected for 36 hours at a frequency of 6 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 (for GFP and FAST, respectively) and 800 ms for the red emissions.

## Image analysis

*Image intensities:* Time-lapse images were analyzed to derive the kinetics of *E. coli* biomass accumulation in the channel based on FAST fluorescence intensity, as previously detailed<sup>32</sup>. Image intensity per pixel, averaged for the whole image or on defined regions of interest (ROIs), was collected using the NIKON proprietary software NIS. Subsequently, the data sheets edited by NIS were exported to MATLAB for further analysis of biofilm development kinetics. Background was subtracted using the contribution to the fluorescence intensity of a channel containing medium without any bacteria (details in Fig. S2). All curves were averaged over at least three independent positions and two independent replicates.

## Dynamics monitoring

The individual dynamics of *E. coli* cells were tracked in the biofilm surface layer using confocal time-lapse acquisitions performed with a 60x, 1.4NA objective. Series of 50 images were recorded at an acquisition frequency of 90 frames per hour every 2 hours, for 24 h. The image stacks were binarized using the ImageJ IsoData threshold calculation tool, which iteratively takes into account average background and average object intensities. Next, objects comprising between 40-2,000 pixels in area ( $1\text{px}=0.1075\ \mu\text{m}$ ) were tracked in 2D over each temporal series using the ImageJ MTrack2 algorithm. These size limits ensured the tracking of a single cell to clusters of a few (3-4) cells. The minimal trajectory held 2 frames and the maximal accepted displacement between two frames was 60 pixels. Thereafter, the results file containing the sorted coordinates of all the trajectories was exported to MATLAB in order to calculate the trajectory persistence  $P$ . For each time series,  $P$  was obtained by taking the average over all the trajectories  $i$  of the individual persistence  $P_i$ , defined as the ratio of the travelled distance  $d_i$  to the trajectory length  $L_i$ .

## Results

### Motility strongly delays bare surface colonization by *E. coli*

We assessed how fast the bacteria form a biofilm under mild flow depending on their motility by comparing the surface colonization kinetics of the nonmotile cells ( $\text{Mot}^-$ ) with that of their swimming counterparts ( $\text{Mot}^+$ ). Time-lapse images were taken from the very beginning of the process, consisting of a few adhering cells, up to the stage of a dense cell material after 48 hours of growth. The results show very distinct kinetic profiles for motile and nonmotile cells (Fig. 1A). Using a logarithm scale to display the fluorescence intensity as a function of time revealed that this difference mainly consists in a long lag time of about 20 hours, whereas almost no lag time was evident for nonmotile cells (Fig. 1B). In contrast, the colonization rate measured after the lag appears very similar for motile and nonmotile bacteria, indicating that the biofilm initiation phase was essentially altered when cells were motile as opposed to nonmotile. Furthermore, we measured the cell division rates under planktonic growth in MB medium and observed no differences (Fig. S3). To determine the details of this initial phase, we recorded stacks of images at a higher frequency (90 images per hour instead of 6) every two hours, using a higher magnification objective (63x) and confocal acquisitions in order to make observations at the single cell level and evaluate the surface dynamics. Applying a basic 2D tracking routine to this image series, we collected cell trajectories for each time series and derived a persistence index,  $P$ . The mean of all individual trajectory  $P_i$  values was defined as the ratio of the trajectory length  $L_i$  to the traveled distance  $d_i$  as shown in Fig. 2A. This index provides a quantitative evaluation of the cell dynamics on the surface that varies from 0 for a fully steady cell to 1, which corresponds to the highest displacement in a straight line authorized in the analysis, i.e. the strongest dynamics. The analysis concentrates on the initial phase of the colonization where cell population is limited enough to enable single cell delineation, corresponding to the first 6 hours of biofilm formation for nonmotile cells and extending up to 24 hours for motile cells. The results in Fig. 2B show the variation of the dynamic index for motile and nonmotile cells over time. Due to surface access delay, the number of trajectories included in the motile cell analysis within the first 10 hours is low (5 to 10 per time series compared to 50 to 100 for nonmotile cells, see Fig. S4) causing large standard deviations and significant fluctuations of the mean values on this data set which complicated the comparison with the nonmotile cells. However, comparing equivalent colonization degrees as for time  $t=4\text{h}$  (nonmotile) and time  $t=20\text{h}$  (motile) shown in Fig. 2C, very close persistence values were

obtained confirming the similar dynamics on the surface of the two cells type. The small number of cells on the surface also explains the high observed standard deviation of the persistence of motile cells.

The fraction of cells reaching the surface, and not their dynamics on the surface, is therefore more likely to explain the lingering of motile cells during biofilm initiation as compared to Mot<sup>-</sup> cells. To test this idea, we measured the number of motile and nonmotile cells reaching the surface over the first 90 min following the injection in the channel before starting the flow and actually found that there were fewer motile cells (Fig. 3). Then, by making a reasonable hypothesis about biofilm development kinetics following a logistic law that closely fits the data (Supplementary Information, Fig. S5), we found that the motile-nonmotile cell asymmetry in the surface abundance explained the observed significant delay in biofilm growth. Indeed, as flow begins, the non-attached cells are removed from the channel and no longer participate in biofilm formation.

To examine how cell bulk behavior could explain the motile cells colonization deficit. A simple theoretical model was created to evaluate motile versus nonmotile cell behavior.

### **Motile and nonmotile cells characteristic time for cell-surface access**

In our model, we considered a bacterial suspension in a box (defined by volume  $V$  and height  $H$ ) and we wrote equations to describe the variation with time for the number of cells reaching the bottom surface upon settling (nonmotile cells) as well as upon settling and run-and-tumble diffusion (motile cells). As detailed in the Supplementary Information, cell settling occurred according to the unidirectional speed  $V_s$  (Stokes' law) of a particle submitted to gravity in a viscous medium. This therefore provides a number of cells  $N_s^g$  on the surface as a function of time (for  $t < H/V_s$ ):

$$N_s^g(t) = \frac{N_0}{H} V_s t$$

(For  $t > H/V_s$ , all cells have reached the bottom surface and  $N_s^g(t) = N_0$ .)

For diffusing cells, we made numerical simulations to account for both the settling and the diffusion, deriving the number of cells to an absorbing boundary. A number  $N_0$  of cells were randomly distributed along a 1D interval  $[0,H]$ . Every period of time  $dt$  ( $dt=1s$ ), each cell

could jump up or down with equal probability (1/2), by a step  $dz = \sqrt{2D\tau}$  with  $D$ , the cell diffusion coefficient. In addition, all cells were moved down by a distance  $V_s \cdot dt$  to account for the sedimentation. All cells that moved beyond the upper limit ( $z > H$ ) were brought back to  $z = H$ . This reflective boundary condition accounts for the experimental observations which showed no attached cell on the top surface within the first hours following the cell injection in the channel. All cells that moved below the lower limit ( $z < 0$ ) were removed from the simulation (absorbing boundary condition, first passage attachment) and counted as “surface cells”,  $N_s^d(t)$ .

The results displayed in Fig. 4 show the simulation results compared to the experimental counts for both nonmotile (Fig. 4A) and motile cells (Fig. 4B) using a diffusion coefficient of  $200 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Fig. S6) in agreement with previous work<sup>e.g.35</sup>. The model satisfyingly predicts the experimental surface access kinetics of the nonmotile cells, which was confirmed by measurements and calculations performed using a channel with  $250 \mu\text{m}$  of height (Supplementary information, Fig. S7). In contrast, the motile cell behavior was not correctly described by the model which predicts a much faster surface access than the experiments (Fig. 4B). Indeed, the predicted cell number was about five times higher in the simulation than in the experimental counts. This suggests that the hypothesis of attachment at first passage is probably too restrictive and that the swimming cells may experiment several passages before dwelling onto the surface. On the other hand, the motile cell diffusion might be biased due to the topology of the device. Indeed, because of the asymmetry of the PDMS channels, oxygen gradients that would favor bacteria swimming upwards, could have appeared delaying the surface access.

Altogether, these results indicate that surface access is the limiting step of the process. The simple mathematical model we introduce here suggests that under the conditions used in this study, the nonmotile settle and attach whereas the motile cells swim away from the surface beyond the predictions of a random diffusion and first passage attachment hypothesis.

## **The presence of co-colonizers affects the surface colonization process for both motile and nonmotile cells**

In order to evaluate if cell motility brings about a similar lag time in a more complex environment, we monitored how motile and nonmotile *E. coli* cells colonize a bare surface in the presence of co-colonizers. For this, we examined surface colonization by *E. coli* in the



presence of four other strains that we recently showed are able to deterministically form a stable biofilm under flow in about 40 hours<sup>30</sup>.

The four species were introduced in the channel at the same time as the motile or nonmotile *E. coli* cells, following the same procedure used for single species biofilm formation and kinetics monitoring. The results in Fig. 5A show that motile bacteria still display a slight deficit in colonization efficiency, although the difference between motile and nonmotile cells was significantly reduced in the presence of the co-colonizers. Notably, the presence of the co-colonizers altered not only the amplitude but also the kinetic phases of development, as highlighted by the logarithmic display of the curves (Fig. 5B). In the presence of the co-colonizers, we observed the succession of two phases displaying the same timing for motile and nonmotile bacteria. The first phase consisted of an initial limited surface growth that leveled about 6 hours after starting the nutrient flow, with a plateau that extended approximately up to 12 to 15 hours into colonization. Subsequently, a second growth phase started which increased the *E. coli* biomass in the composite biofilm by 2 logs. The curves indicate that the motile cell biofilm entered the second growth phase with a small 2- to 3-hour delay.

We next asked how these kinetics could be related to the development of the biofilm colonizers. To answer this question, we monitored the development of the four-species biofilm injecting the fluorescent variants of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*-FAST) and *Pseudomonas fluorescens* (*Pf*-mCherry), the two main contributors in the four-species community, with *Kocuria varians* and *Rhodocyclus* which were not labelled. Fig. 6A-B specifically shows the kinetics of these two fluorescent species in the four-species biofilm.

The saturation of *E. coli* development in its initial phase coincided with the first climax of *Bt* in the four-species community, whereas the second growth phase of *E. coli* started as *Pf* development reached its first climax. These results indicate that the deterministic biofilm formation program of the co-colonizers dominated the *E. coli* surface colonization process, inducing a kinetic remodeling and almost completely abolishing the difference between motile and nonmotile cells in their colonization efficiency. This indicates that the limiting step of the surface colonization by *E. coli* is shifted by the presence of the co-colonizers, significantly altering the impact of motility in the process.

Finally, we also tested the colonization of the pre-established four-species biofilm by the motile and nonmotile strains of *E. coli* at 8, 20 and 36 hours after inoculation and incubation

of the four species. This demonstrated that the corresponding signals barely emerged from the background for both motile and nonmotile cells 40 hours after their injection (Supplementary Information, Fig. S8), indicating that neither of the two strains were able to colonize the surface in the presence of the pre-established strains.

## Discussion

Bacterial flagellar motility has been investigated for decades now, and significant advances in the understanding of the involved mechanisms have been made. However, many open questions remain about the impact of this function on the ability of bacteria to colonize surfaces. Here, we report a kinetic analysis of *E. coli* surface colonization in a millifluidic channel, with a focus on active vs. non-active flagellar motility. Our results show that motility introduces a significant delay to the colonization of bare surfaces by *E. coli* alone. This is in contrast to the intuitive concept encountered in the literature that the absence of motility reduces the chances of bacterial cells coming into contact with the surface<sup>10,28</sup>. Based on mathematical modeling of the settling and diffusion of the bacteria in the channel, we found that the nonmotile cells landed on surface following a simple settling law. In contrast, random diffusion did not account for motile cell on surface over time. In our experimental configuration, the ‘race’ towards the surface is won by nonmotile cells which is not predicted by the calculations. To explain this discrepancy, we suggest that motile cells may repeatedly bounce on the surface before attaching which would slow down the dwelling kinetic. Besides, taking into account the asymmetry of the experimental channel, we make the hypothesis that chemical gradients may also bias bacteria swimming and delay surface colonization.

The channel geometry that we used is relevant for many natural situations in which bacteria dwell in channels and pores in the millimetric range under continuous or intermittent flow with irregular nutrient spatial distribution and chemical gradients. This highlights the importance of the geometry of the environment, which has generally been overlooked in colonization assays, in the competition between motile and nonmotile cells.

We observed that local dynamics and biomass growth rates were very similar for both motile and nonmotile cells, suggesting that flagellar motility does not alter anchorage or surface persistence once the cells have reached the surface, an issue that has remained controversial to date. As detailed in previous investigations of this question<sup>10</sup>, it is difficult to decipher the

primary factors involved in the initial attachment. A particular challenge is to disentangle the contribution of motility *per se* from the contribution of flagella as a surface appendage and the contingent involvement of other structures such as type I pili. Under the conditions used in this study for bare surface colonization, it is likely that the attachment step is dominated by the overexpression of the F-pilus, which is crucial in promoting the initial adhesion<sup>19,31,36</sup>. In this case, flagellar motility simply reduces surface abundance, which is established during the inoculation period, and does not affect biofilm development. This is an interesting finding to take into account for multispecies colonization processes where surface access kinetics are crucial in the competitive dynamics that shape the attached community<sup>37</sup>.

In the presence of co-colonizers (here, the members of a 4-species community able to build a stable biofilm), we observed that motile and nonmotile *E. coli* cells exhibit very similar colonization profiles that differ from the profiles displayed in the single-species colonization experiments. Specifically, there is a lower surface-bound *E. coli* global biomass, consistent with the intrinsic competition for the surface expected from the presence of other adhesive species<sup>38</sup>. Two striking features stand out here: the emergence of *E. coli* kinetic colonization phases that match the four-species biofilm climaxes; and the reduced lag observed between motile and nonmotile cells in the characteristic time of colonization, primarily due to the receding of the nonmotile cells in comparison to the *E. coli* colonizing ability in the absence of co-colonizers.

In a previous study, the four-species biofilm climaxes were interpreted as species responses to the oxygen depletion induced by biofilm development, suggesting that the reduction in oxygen might also contribute to the diminished colonizing efficiency of *E. coli*<sup>30</sup>. Moreover, knowing that the lack of oxygen strongly affects *E. coli* motility<sup>39</sup> by inducing a motile to nonmotile transition in the bacterial population, we can hypothesize that the environmental oxygen scarcity caused by the co-colonizers accounts for the convergence of the motile and nonmotile cell colonization kinetics in this multispecies context. Nevertheless, the co-colonizers could also induce a shift in the limiting step of the colonizing process by increasing the characteristic time of attachment on the surface, which would result in abolishing the difference between motile and nonmotile cells that ultimately dwell on the surface. These results stress the importance of studying the processes from a kinetic perspective in order to acquire mechanistic information.

Our report establishes that the impact of flagellar motility on surface colonization is not necessarily an intrinsic trait associated with this function; instead, it closely depends on an

environment defined by both topology and population composition. Importantly, we demonstrate that cell swimming can regulate the surface access time. However, a shift in the environmental conditions (such as the presence of co-colonizers) can drastically alter the outcome of this distinctive property and abolish the asymmetry between motile and nonmotile cells. We thus propose here a study with the potential to enlighten the long-standing controversy over the role of cell motility in surface colonization and biofilm formation.

## Acknowledgments:

The authors would like to thank Rapahaël Voituriez and Philippe Thomen for their fruitful discussions, and Carounagarane Doré for technical assistance in developing the devices.

This work was supported by a MESRI fellowship to WBY.

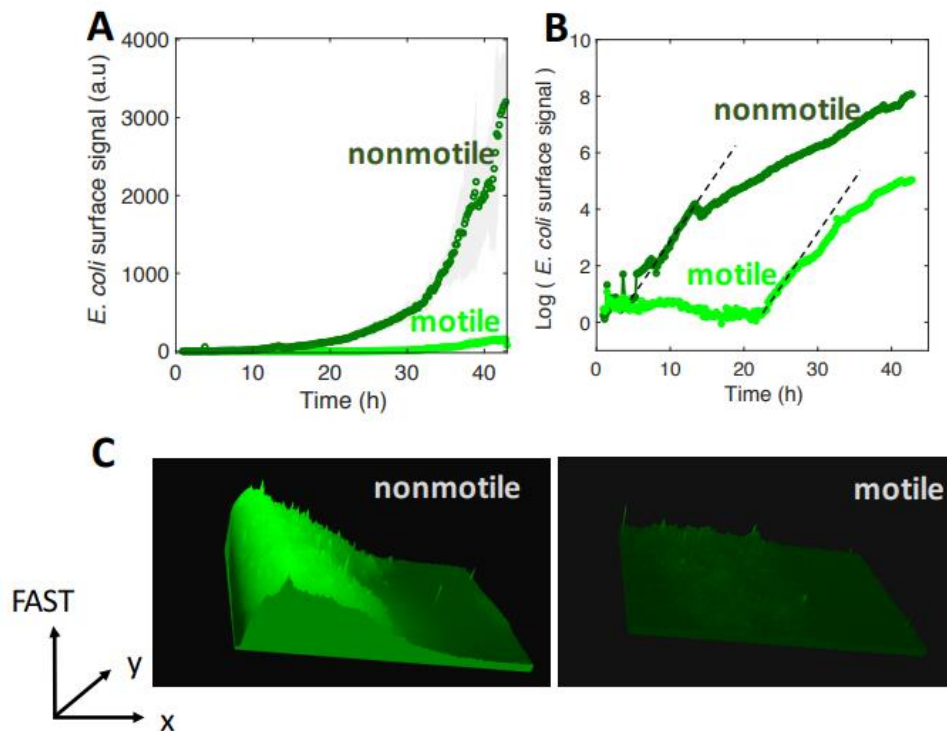
## References

- 1 Flemming, H. C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* **14**, 563-575, doi:10.1038/nrmicro.2016.94 (2016).
- 2 Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**, 95-108, doi:10.1038/nrmicro821 (2004).
- 3 Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H. & Thurnheer, T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol* **28**, 668-681, doi:10.1016/j.tim.2020.03.016 (2020).
- 4 Berg, H. C. & Anderson, R. A. Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature* **245**, 380-382, doi:10.1038/245380a0 (1973).
- 5 Silverman, M. & Simon, M. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* **249**, 73-74, doi:10.1038/249073a0 (1974).
- 6 Nakamura, S. & Minamino, T. Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules* **9**, doi:10.3390/biom9070279 (2019).
- 7 Colin, R., Ni, B., Laganenka, L. & Sourjik, V. Multiple functions of flagellar motility and chemotaxis in bacterial physiology. *FEMS Microbiol Rev*, doi:10.1093/femsre/fuab038 (2021).
- 8 O'Toole, G. A. & Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**, 295-304, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x (1998).
- 9 Lemon, K. P., Higgins, D. E. & Kolter, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Bacteriol* **189**, 4418-4424, doi:10.1128/JB.01967-06 (2007).

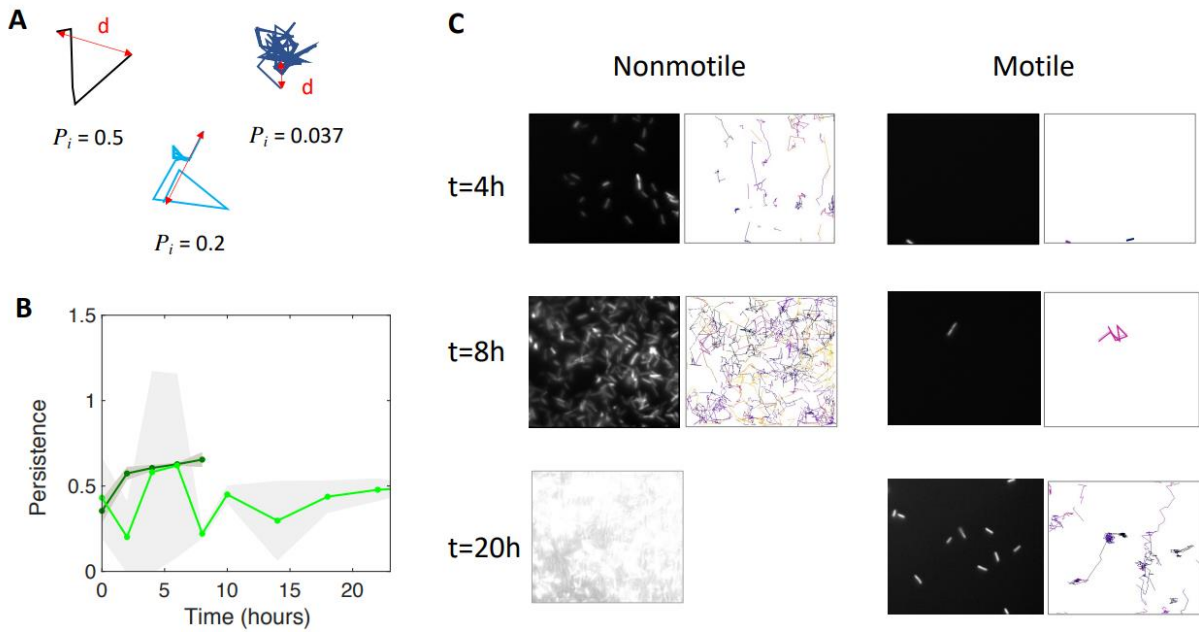
- 10 Pratt, L. A. & Kolter, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285-293, doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01061.x (1998).
- 11 Wood, T. K., Gonzalez Barrios, A. F., Herzberg, M. & Lee, J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 361-367, doi:10.1007/s00253-005-0263-8 (2006).
- 12 Josenhans, C. & Suerbaum, S. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* **291**, 605-614, doi:10.1078/1438-4221-00173 (2002).
- 13 Haiko, J. & Westerlund-Wikstrom, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)* **2**, 1242-1267, doi:10.3390/biology2041242 (2013).
- 14 Suchanek, V. M. *et al.* Chemotaxis and cyclic-di-GMP signalling control surface attachment of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **113**, 728-739, doi:10.1111/mmi.14438 (2020).
- 15 Frymier, P. D., Ford, R. M., Berg, H. C. & Cummings, P. T. Three-dimensional tracking of motile bacteria near a solid planar surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6195-6199, doi:10.1073/pnas.92.13.6195 (1995).
- 16 Giacche, D., Ishikawa, T. & Yamaguchi, T. Hydrodynamic entrapment of bacteria swimming near a solid surface. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **82**, 056309, doi:10.1103/PhysRevE.82.056309 (2010).
- 17 Merritt, P. M., Danhorn, T. & Fuqua, C. Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. *J Bacteriol* **189**, 8005-8014, doi:10.1128/JB.00566-07 (2007).
- 18 Shrout, J. D., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M. & Parsek, M. R. The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. *MRS Bull* **36**, 367-373, doi:10.1557/mrs.2011.67 (2011).
- 19 Reisner, A., Haagenzen, J. A., Schembri, M. A., Zechner, E. L. & Molin, S. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* **48**, 933-946 (2003).
- 20 Prigent-Combaret, C. *et al.* Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**, 450-464 (2000).
- 21 Wong, G. C. L. *et al.* Roadmap on emerging concepts in the physical biology of bacterial biofilms: from surface sensing to community formation. *Phys Biol* **18**, doi:10.1088/1478-3975/abdc0e (2021).
- 22 Laganenka, L., Lopez, M. E., Colin, R. & Sourjik, V. Flagellum-Mediated Mechanosensing and RfIP Control Motility State of Pathogenic *Escherichia coli*. *mBio* **11**, doi:10.1128/mBio.02269-19 (2020).
- 23 Valentini, M. & Filloux, A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J Biol Chem* **291**, 12547-12555, doi:10.1074/jbc.R115.711507 (2016).
- 24 Jenal, U., Reinders, A. & Lori, C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol* **15**, 271-284, doi:10.1038/nrmicro.2016.190 (2017).
- 25 Houry, A. *et al.* Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13088-13093, doi:10.1073/pnas.1200791109 (2012).

- 26 Barken, K. B. *et al.* Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol* **10**, 2331-2343, doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01658.x (2008).
- 27 Nadell, C. D., Drescher, K., Wingreen, N. S. & Bassler, B. L. Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms. *ISME J* **9**, 1700-1709, doi:10.1038/ismej.2014.246 (2015).
- 28 Zheng, S. *et al.* Implication of Surface Properties, Bacterial Motility, and Hydrodynamic Conditions on Bacterial Surface Sensing and Their Initial Adhesion. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, 643722, doi:10.3389/fbioe.2021.643722 (2021).
- 29 Wadhwa, N. & Berg, H. C. Bacterial motility: machinery and mechanisms. *Nat Rev Microbiol*, doi:10.1038/s41579-021-00626-4 (2021).
- 30 Monmeyran, A. *et al.* Four species of bacteria deterministically assemble to form a stable biofilm in a millifluidic channel. *NPJ Biofilms Microbiomes* **7**, 64, doi:10.1038/s41522-021-00233-4 (2021).
- 31 Ghigo, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442-445 (2001).
- 32 Monmeyran, A. *et al.* The inducible chemical-genetic fluorescent marker FAST outperforms classical fluorescent proteins in the quantitative reporting of bacterial biofilm dynamics. *Sci Rep* **8**, 10336, doi:10.1038/s41598-018-28643-z (2018).
- 33 Sheppard, A. E., Poehlein, A., Rosenstiel, P., Liesegang, H. & Schulenburg, H. Complete Genome Sequence of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 Cry. *Genome Announc* **1**, doi:10.1128/genomeA.00158-12 (2013).
- 34 Legendijk, E. L., Validov, S., Lamers, G. E., de Weert, S. & Bloemberg, G. V. Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 81-90, doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01916.x (2010).
- 35 Wu, M., Roberts, J. W., Kim, S., Koch, D. L. & DeLisa, M. P. Collective bacterial dynamics revealed using a three-dimensional population-scale defocused particle tracking technique. *Appl Environ Microbiol* **72**, 4987-4994, doi:10.1128/AEM.00158-06 (2006).
- 36 Beloin, C., Houry, A., Froment, M., Ghigo, J. M. & Henry, N. A short-time scale colloidal system reveals early bacterial adhesion dynamics. *PLoS biology* **6**, e167 (2008).
- 37 Eigentler, L. *et al.* Founder cell configuration drives competitive outcome within colony biofilms. *ISME J*, doi:10.1038/s41396-022-01198-8 (2022).
- 38 Lloyd, D. P. & Allen, R. J. Competition for space during bacterial colonization of a surface. *J R Soc Interface* **12**, 0608, doi:10.1098/rsif.2015.0608 (2015).
- 39 Douarache, C., Buguin, A., Salman, H. & Libchaber, A. E. Coli and oxygen: a motility transition. *Phys Rev Lett* **102**, 198101 (2009).

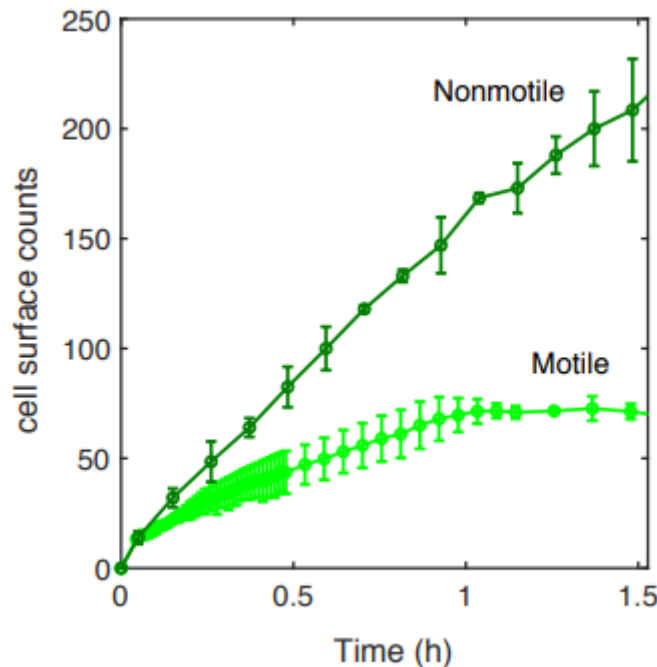
## Figure Legends



**Figure 1: Motility delays biofilm formation.** (A) *E. coli* FAST fluorescence intensity as a function of flow time for a biofilm grown by motile (bright green) and nonmotile (dark green) cells in a microfluidic channel; bold curves are from the average intensity of 3 distinct positions in 2 or 3 different channels with the shaded area representing the standard deviation (B) Same data as in A except the logarithm of the average fluorescent intensity is plotted. The biofilm was grown at a rate of 1 ml/h medium flow, at 30°C. Dashed lines highlight the exponential part of the growth and display the same slope for both motile and nonmotile cells. (C) Fluorescence intensity surface plots from biofilm images recorded at time t=30h. Biofilm from nonmotile cells on the left panel and from motile on the right panel.

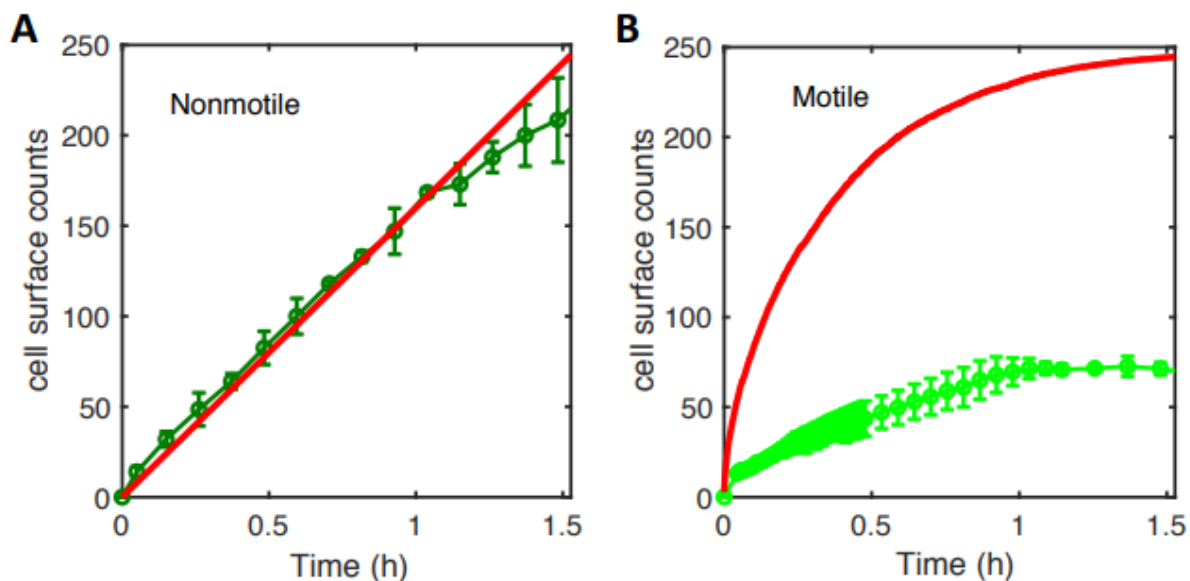


**Figure 2: Motile and nonmotile cells display similar surface persistence in the biofilm initiation phase.** (A) Typical trajectories with their respective persistence index values. (B) Persistence values over time for motile (light green) and nonmotile (dark green) cells on the surface. The curves represent the average, with the shaded area representing the standard deviation. (C) Snapshots of the biofilm development together with detected trajectories for nonmotile (left columns) and motile cells (right columns). At t=20h, the surface of nonmotile cells was overcrowded, which excludes the ability to track single cells.

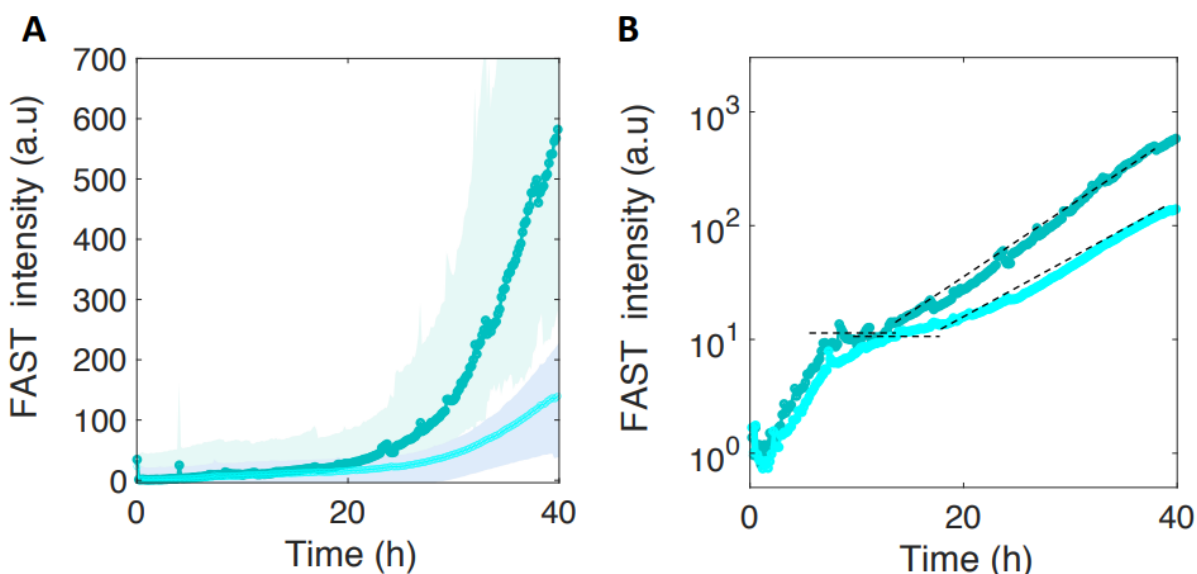


**Figure 3: Surface access experimental kinetics of nonmotile and motile cells.** The number of cells reaching the surface over the incubation time (90 min) has been determined experimentally for motile (light green curve) and nonmotile (dark green curve).  $1.6 \times 10^6$  cells/ml were injected in MB medium at time t=0. The surface was regularly imaged to count the settled cells. Errors bars are standard deviation over 3 different positions.

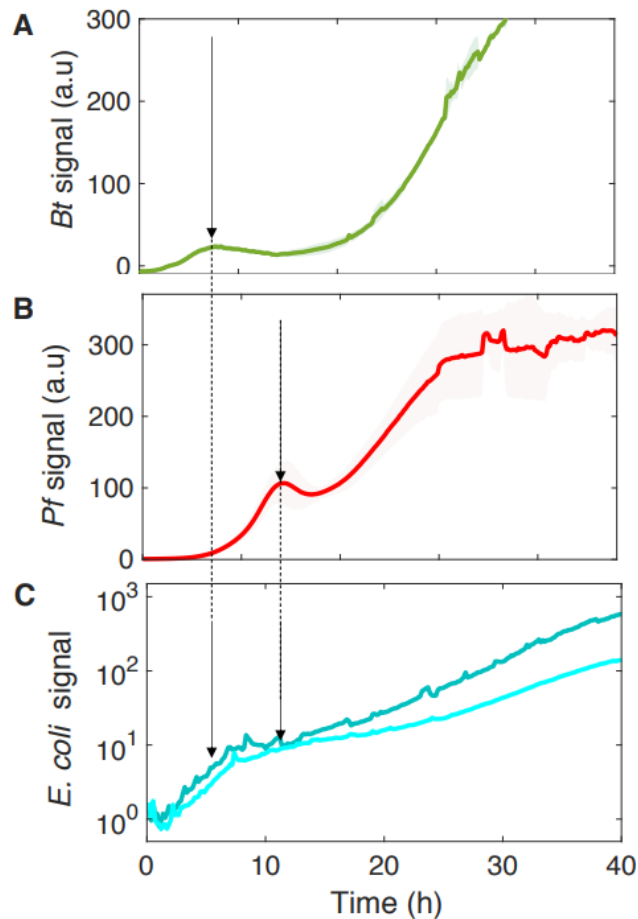




**Figure 4: Simulated kinetics of settling and diffusion towards the surface.** (A) The number of nonmotile cells reaching the surface as a function of time in a 1-mm high channel was calculated according to settling using the diffusion coefficient  $D=200 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ; cell size  $a=1 \mu\text{m}$ ;  $g=10 \text{ m/s}^2$ ; and cell-medium mass density contrast  $\Delta\rho = 80 \text{ kg/m}^3$  (red line) and compared to the experimental counts (same as in Fig. 3). (B) Numerical simulation of surface access kinetics of motile cells (red line) represented with the corresponding experimental counts (as in Fig. 3).



**Figure 5: Motile and nonmotile *E. coli* surface colonization in the presence of co-colonizers.** Motile (in light cyan) and nonmotile (in dark cyan) *E. coli* surface fluorescence (A) in the biofilm formed in the presence of the four co-colonizers *Bt*, *Pf*, *Kv* and *Rh*. The logarithmic display (B) highlights two distinct phases in *E. coli* development in the composite multispecies biofilm. The dashed lines indicate the level of the first phase plateau and the second phase growth rate. Curves are from the average intensity of 3 distinct positions from 2 different channels (2 biological replicates) with the shaded area representing the standard deviation.



**Figure 6: The kinetics of motile and nonmotile *E. coli* surface colonization follows the community development timing of the four species.** *Bt* (A) and *Pf* (B) surface development kinetics in the four-species community. In parallel, the logarithmic display of the *E. coli* signal on the surface is shown in the presence of the co-colonizers (C). The arrows point to the *Bt* (A) and *Pf* (B) initial climaxes, and the *E. coli* development phases (C). Curves are from the average intensity of 2 distinct positions in 3 different channels (3 biological replicates) with the shaded area representing the standard deviation.

## Supplementary information

### I. Materials and methods

- Media composition

Composition	M1 (g/L)	MB (g/L)
Yeast Nitrogen Base*	1.7	1.7
Ammonium sulfate	5	5
Glucose	10	0.4
Casamino-acids	5	1

\*from DIFCO BD

- Strains and plasmids

strains		Plasmids and reporters	References
1	<i>E. coli</i> MG1655 F motile	F plasmid, IncF from TG1 (Tet <sup>R</sup> )	Ghigo (2001) <sup>1</sup>
2	<i>E. coli</i> MG1655 nonmotile (IS1)	F plasmid <sup>a</sup> (Tet <sup>R</sup> )	Ghigo (2001) <sup>1</sup>
5	<i>E. coli</i> MG1655 F motile – FAST-mCherry	F plasmid <sup>a</sup> (Tet <sup>R</sup> ) pAG101d <sup>b</sup> (Kan <sup>R</sup> )	Ghigo (2001) <sup>1</sup> Plamont et al. (2016) <sup>2</sup>
6	<i>E. coli</i> MG1655 F nonmotile – FAST-mCherry (IS1)	F plasmid <sup>a</sup> pAG101d <sup>b</sup> (Kan <sup>R</sup> )	Ghigo (2001) <sup>1</sup> Plamont et al. (2016) <sup>2</sup>
	<i>E. coli</i> MG1655 F motile - GFP	F plasmid <sup>a</sup> λatt::gfp-mut3 lambda pR (Amp <sup>R</sup> )	Ghigo (2001) <sup>1</sup>
	<i>E. coli</i> MG1655 F nonmotile (IS1)- GFP	F plasmid <sup>a</sup> λatt::gfp-mut3 (Amp <sup>R</sup> )	Ghigo (2001) <sup>1</sup>
5	<i>P. fluorescens</i> WCS365 m-Cherry	pMP7605	Lagendijk et al. (2010) <sup>3</sup>
4	<i>B.thuringiensis</i> FAST	PsarA-yfast (erythromycin <sup>R</sup> ) <sup>c</sup>	A gift from A. Baliarda

<sup>a</sup>as in strain #1 :IncF from TG1

<sup>b</sup>derived from pAG101 by replacing T7 promoter by Lambda pR

<sup>c</sup>yfast sequence from pAG86 inserted on the chromosome.

Strains references:

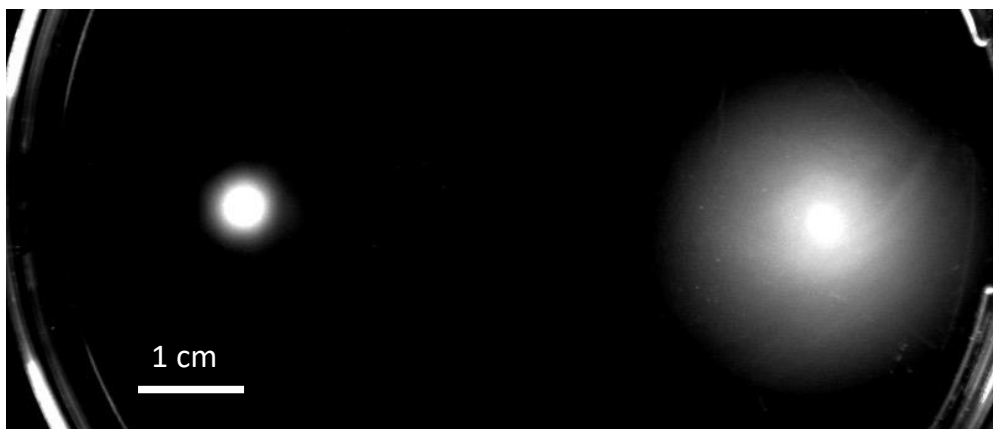
1 Ghigo, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442-445 (2001).

2 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).

3 Lagendijk, E. L., Validov, S., Lamers, G. E., de Weert, S. & Bloemberg, G. V. Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 81-90, (2010).

- **Motility assay**

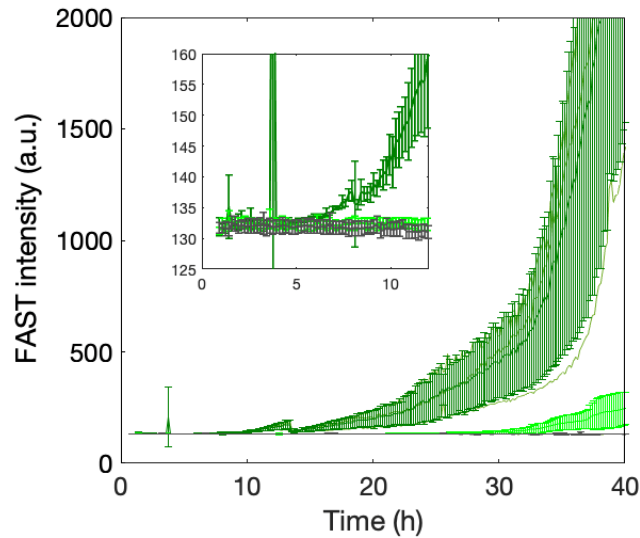
Motile and nonmotile strains swimming motility was tested according to an adaptation of the protocol of Barker and collaborators <sup>4</sup>. Aliquots of the same concentration ( $10^6$  cells/ml) of motile and nonmotile *E. coli* cells from overnight cultures were inoculated into a soft agar (LB semi-solidified with 1.25% wt/vol agar enabling flagellar motility <sup>4</sup>. The plates were incubated at 30°C during 24h and imaged. The results are shown in Fig. S1. The diffuse spreading of the motile cells can be easily recognized by eye in comparison with the small nonmotile cells colony where no outgrowth occurred.



**Figure S1: Motility assay.** Image of nonmotile (on the left) and motile (on the right) cells inoculated in 1.25% wt/vol agar after 24 hours growth in MB medium.

- **Background versus signal amplitude**

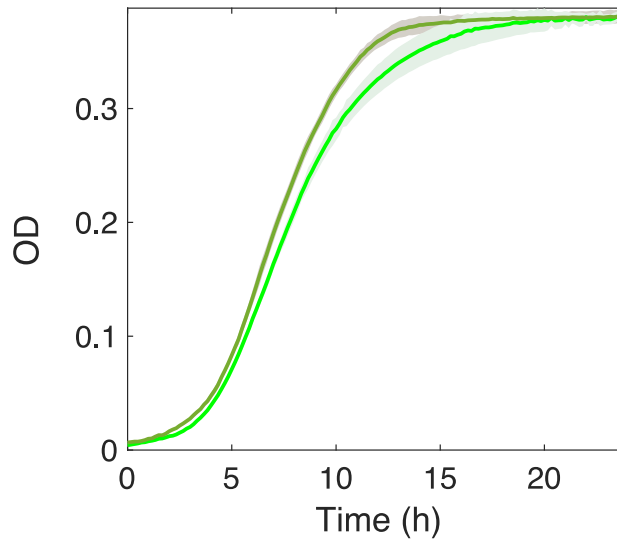
*E. coli* signal on the surface is obtained by averaging FAST intensity over the whole image (1344x1024 pixels) and subtracting the background (a control channel without cells under the same conditions). We show below in Fig. S2 the raw data without background subtraction together with the background signal. The mean background of the image is equal to  $132 \pm 2$  (a.u.). A single cell image at the 20x magnification objective covers approx. 25px and has a maximum intensity of about  $220 \pm 20$ , which means that about 2000 cells are needed in an image to reasonably emerge from the background. This cell number per image requires cell division (3 to 4 generations). Indeed, taking into account the total number of injected cells ( $3 \times 10^4$  cells per channel), no more than 150 cells can reach the surface in the area captured by one image ( $\approx 0.15 \text{ mm}^2$ ) at time  $t=0$ .



**Figure S2: Background level** : Fluorescence intensity of the background taken in the absence of cells (grey curves) is compared with sample signal, nonmotile cells injected at time  $t=0$  (dark green) and motile cells (light green) without correction. Each averaged over 6 different positions from 2 channels. Error bars are standard deviations.

- **Motile and nonmotile cells exhibit similar growth rates**

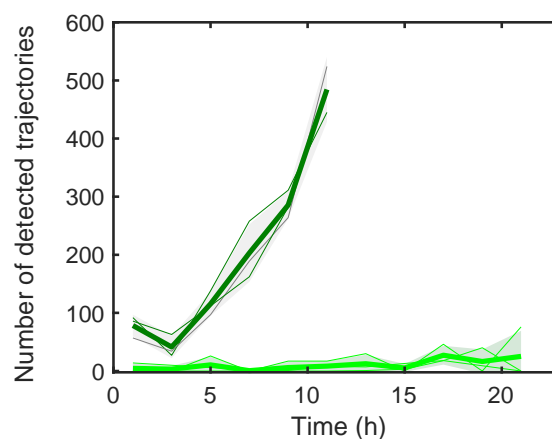
In order to detect potential difference in the division rates of motile and nonmotile cells, we measured both strains optical densities over time in MB medium at 30°C using a microplate reader (Tecan TECAN Infinite M200 pro equipped with UV Xenon flashlamp light source).  $10^6$  cells ( $10^6$  cells/ml exponentially growing) were seeded in each well in triplicate and left to grow over night, taking one measurement every 10 min. The curves displayed in Fig. S3 show no significant difference between motile and nonmotile growth.



**Figure S3: Motile and nonmotile cells have similar division rates under planktonic growth.** Nonmotile cells (dark green) and motile cells (light green).  $10^6$  cells/ml were seeded in MB medium. Measurements performed in the triplicates in 48-wells plates. Curves represent the triplicate average shaded with the standard deviation of the data set.

- **Cell counts in the initial state**

The number of trajectories detected in the initial stage of biofilm formation when single cells can be delineated as explained in the text of our article is a proxy for the cell count of the surface. Fig. S4 shows its evolution over time for motile and nonmotile cells confirming the large discrepancy between the two.



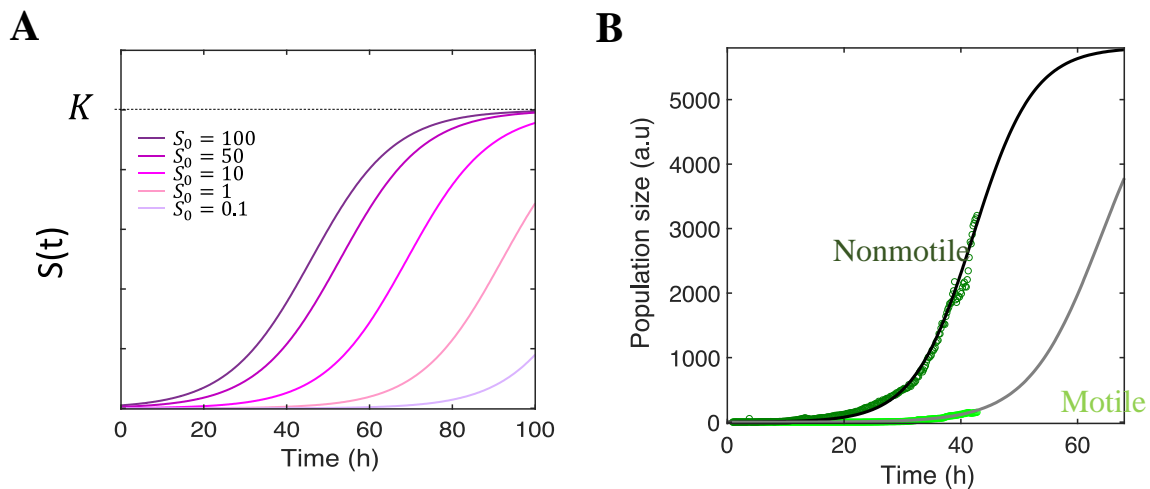
**Figure S4: Cell counts on the surface :** The number of cell trajectories detected over time for nonmotile (light green curve) and nonmotile (dark green curve) as explained in article ‘Materials and Methods’ section. Detection is performed on a  $440 \times 336 \mu\text{m}^2$  image. Values are averaged over 3 positions. Error bars are standard deviations.

## II. Biofilm development kinetic described as a logistic growth

In order to formalize the hypothesis of the inoculated population abundance on the biofilm development kinetic, we made the hypothesis that the biofilm under flow could be reasonably described using a logistic equation as follows :

$$S(t) = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - S_0}{S_0}\right) \exp(-bt)}$$

The equation captures the exponential growth of the dividing population size,  $S(t)$  and the saturation imposed by environmental factors such as nutrient limitation, toxic metabolites buildup or steric constrains<sup>5</sup>.  $b$  is the growth rate,  $K$ , the environmental carrying capacity, i.e. the maximal size the population can be reached, and  $S_0$ , the size of the initial population. Fig. S5A shows a series of curves  $S(t)$  generated using same arbitrary values of  $K$  and  $b$  and different values of  $S_0$ , from 0.1 to 100, which illustrates how initial abundance decrease delays biofilm development.



**Figure S5: Biofilm development phenomenologically fits logistic growth hypothesis.** (A) Typical logistic growth profiles within a three orders of magnitude range of initial population size  $S_0$  (B) Adjustment of the experimental data with a logistic growth hypothesis<sup>5</sup> ; nonmotile cells biofilm data (dark green dot) are adjusted to a logistic profile with  $K=5800$  a.u.;  $b=0.19 \text{ h}^{-1}$  (black line); motile cells data (light green dots) are adjusted using  $K=5800$ ;  $b=0.17 \text{ h}^{-1}$ .

To further investigate, the predictive quantitative power of our model, we tested the hypothesis of the logistic growth to account for our experimental data as a phenomenological guideline to score motile and nonmotile biofilms growth. Several parameter sets provided equally good quality adjustments with R-squared value  $>0.99$ . In particular, the parameter K accepted a whole range of values due the absence of description of the fully saturated level in the experiments. Nevertheless, assuming the same carrying capacity ( $5.8 \times 10^3$  in arbitrary units related to *E. coli* biofilm fluorescence signal) and similar growth rates ( $0.19 \text{ h}^{-1}$  and  $0.17 \text{ h}^{-1}$  for nonmotile and motile biofilms, respectively), we obtained the adjustments displayed in Fig. S1B which provided an initial population sizes ratio (nonmotile to motile) of 12.

This ratio is approximately twice the ratio predicted by our sedimentation/diffusion model which suggests that the calculation slightly overestimates the number of cells that actually reach the surface by diffusion before flow starts. This might be due to the hypothesis of an adhesive first passage adhesion as explained above. Nevertheless, the whole picture strongly supports the hypothesis of development kinetic predominantly controlled by the initial abundance of the cells on the surface.

### **III. Settling model description**

We aim to predict the bacteria settling kinetics to the bottom side of a chamber for a suspension of nonmotile bacteria. The chamber volume is  $V$  (height  $H$  and bottom surface  $S$ ,  $V=SH$ ). We assume:

Adhesion to the bottom surface is immediate at first contact.

No hydrodynamic effect when a cell approaches the bottom surface (no trapping, no bouncing).

Initially, the spatial distribution of bacteria across the chamber is uniform.

For the sake of simplicity, the problem is restricted to 1D.



Stokes' law gives the terminal settling speed of a round particle in a viscous fluid:

$$V_s = \frac{2 a^2 g \Delta \rho}{9 \eta}$$

with  $a$  the particle radius,  $g$  is the gravitational acceleration,  $\Delta \rho$  is the difference of density between particle and fluid, and  $\eta$  is the fluid viscosity. For a bacterial cell in water,  $a=1\mu\text{m}$ ,  $g=9.8\text{m/s}^2$ ,  $\Delta \rho=80\text{ kg/m}^3$ , and  $\eta=10^{-3}\text{ Ns/m}^2$ . This yields to  $V_s=0.18\text{ }\mu\text{m/s}$ .

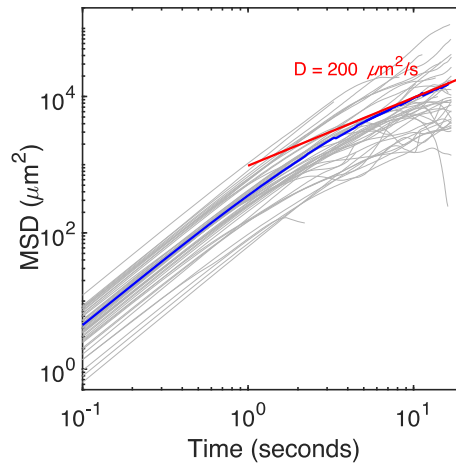
At each time period  $dt$ , there are  $n\delta V$  cells reaching the bottom surface, with  $n = N_0/(SH)$  the cell density, and  $\delta V = V_s S dt$  the size of the micro-volume. This directly gives

$$N_s^g(t) = \frac{N_0}{H} V_s t$$

This is valid until the last cell reaches the surface (at time  $t = H/V_s$ ). For  $t > H/V_s$ ,  $N_s^g(t)$  is constant and equal to  $N_0$ .

The Brownian motion of the nonmotile cells has been neglected. Indeed, expecting a diffusion coefficient of approx.  $0.27\text{ }\mu\text{m}^2/\text{s}$ , a characteristic time to travel the 1mm of channel height,  $t = \frac{l^2}{D} > 1000\text{h}$  is obtained to be compared with the 56min of the settling at a velocity  $V_s$  equal to  $18\mu\text{m/s}$ .

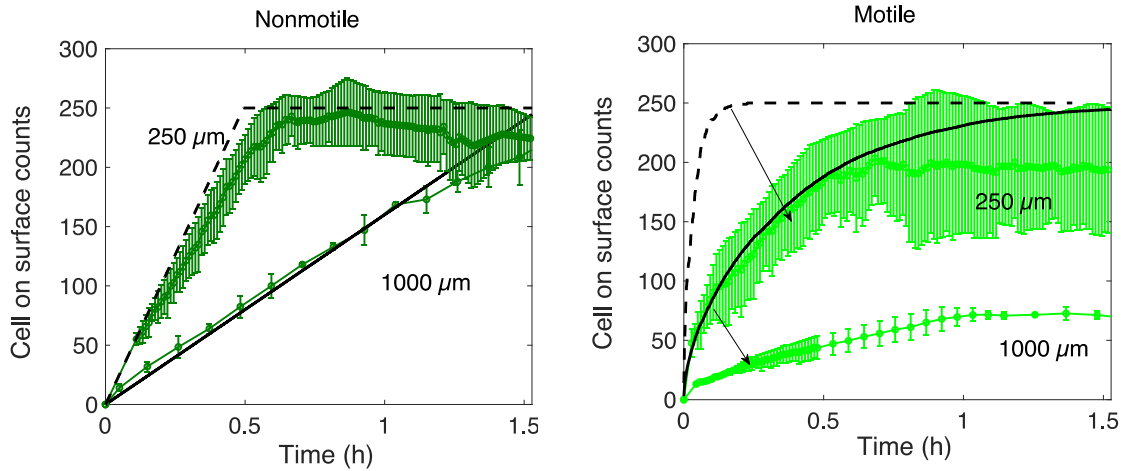
#### IV. Motile cell coefficient of diffusion



**Figure S6:** A small volume of exponentially growing *E. coli* cells were diluted in MB medium at  $1.5 \times 10^6$  cells/ml and deposited in a small covered glass well for microscopy observations. Focus was made far enough from the surfaces and short high frequency ( $10 \text{ s}^{-1}$ ) sequences of high frequency images ( $10 \text{ s}^{-1}$ ) were recorded. 45 cells were tracked for 17 seconds. MSD (Mean squared displacement) are calculated on each trajectory (grey curves). All curves are averaged to obtain the mean MSD (blue curve). The late part of the mean MSD (between  $t=5\text{s}$  and  $t=17\text{s}$ ) is fitted to a line of slope 1 to extract the diffusion coefficient  $D=200 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

#### V. Experimental geometric changes ( $H=250 \mu\text{m}$ and $1000 \mu\text{m}$ )

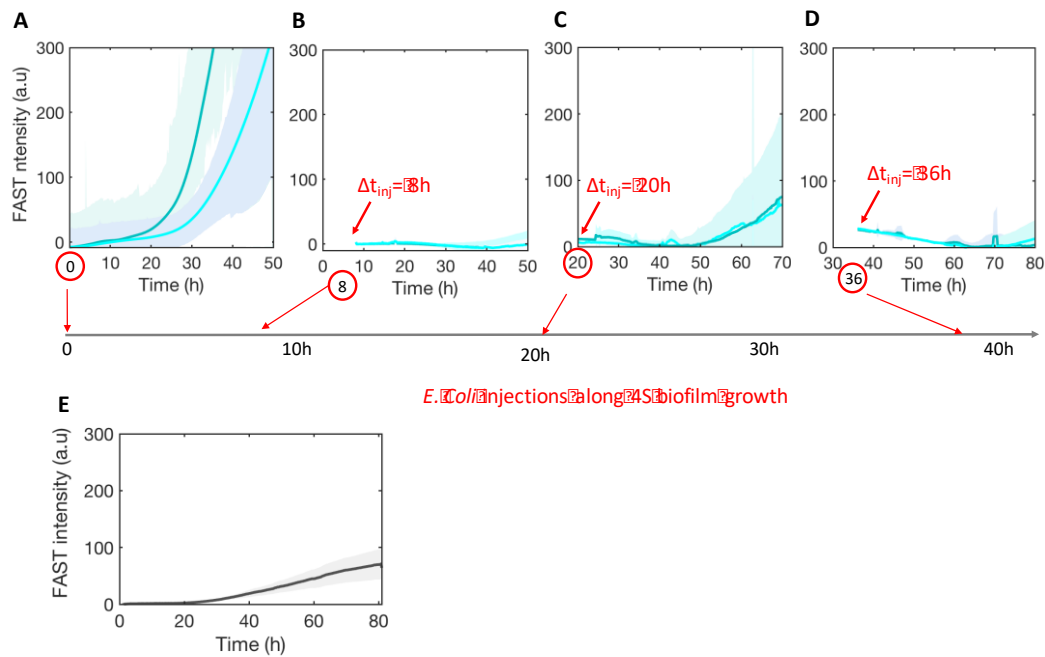
To test the settling hypothesis, we microfabricated smaller channels with  $250 \mu\text{m}$  of height and examined the surface population over the first 90 min following the injection of the cells in the channel. We observed that the nonmotile cells followed a simple settling law both in the  $1000 \mu\text{m}$ - and in the  $250 \mu\text{m}$ -height channels. The height effect was also observed with the motile cells but the surface access kinetics were not reported by a random diffusion model taking sedimentation into account.



**Figure S7: Channel height effect on settling and diffusion kinetics.** Nonmotile (left panel) and Motile (right panel) cells are injected in channels of 250  $\mu\text{m}$  or 1000 $\mu\text{m}$  height as indicated on the graphs at time  $t=0$ . Cell counts are performed over time on microscope images and plotted (green dots and lines) together with the calculated curves (in black lines). We used  $H=250\mu\text{m}$  ( - - ) or  $1000\mu\text{m}$  ( — );  $D=200 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ; total cell number=250 (expected from the cell suspension initial concentration equal to  $1.6 \times 10^6$  cells/ml and consistent with the nonmotile cell counts at the end of the incubation).

## VI. Colonization of the pre-established four-species biofilm

We also examined the impact of an already established community on motile and nonmotile *E. coli* ability to colonize the surface. To this purpose, we initiated the 4-species biofilm formation in the channel at time  $t=0$  and performed *E. coli* injection after 8, 20 and 36 hours which corresponded to 4-species community first climax, beginning of the second growth phase and established dynamical equilibrium, respectively. We observed that *E. coli* installation under these conditions was negligible in any of these conditions, never overpassing the level of the fluorescence background produced by the pre-settled community. In each case, we measured FAST fluorescence 40 hours after *E. coli* injection in the pre-colonized channel and observed no difference between motile and nonmotile cell samples. We concluded that the initial surface coverage with a biofilm prevented *E. coli* installation regardless its motility.



**Figure S8: *E. coli* fails to colonize surface with a pre-establish multispecies biofilm.** FAST fluorescence intensity on the channel surface — which report *E. coli* biofilm formation — is shown after the injection of *E. coli* in the channel where a 4S community has established for 0h (A), 8h (B), 20h (C) and 36h (D) for motile (light cyan) and nonmotile (cyan) cells. The time scale refers to 4S development with  $t=0$  corresponding to 4S biofilm initiation. *E. coli* injections are mentioned with red arrows on the graphs. The 4S community FAST background (E) coming from its autofluorescence has been subtracted from all the signals. Only the co-colonizing situation corresponding to injection at time  $t=0$  displays significant *E. coli* colonization. Curves are from the average intensity of 2 distinct positions in 3 different channels (3 biological replicates) with the shaded area representing the standard deviation.

### Supplementary data references

- 1 Ghigo, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442-445 (2001).
- 2 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, doi:1513094113 (2016).
- 3 Legendijk, E. L., Validov, S., Lamers, G. E., de Weert, S. & Bloemberg, G. V. Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 81-90, doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01916.x (2010).
- 4 Barker, C. S., Pruss, B. M. & Matsumura, P. Increased motility of Escherichia coli by insertion sequence element integration into the regulatory region of the flhD operon. *J Bacteriol* **186**, 7529-7537, doi:10.1128/JB.186.22.7529-7537.2004 (2004).
- 5 Allen, R. J. & Waclaw, B. Bacterial growth: a statistical physicist's guide. *Rep Prog Phys* **82**, 016601, doi:10.1088/1361-6633/aae546 (2019).

## Conclusion générale et perspectives

Le moteur de ce projet est l'étude des processus de formation des communautés adhérentes composites dites biofilms sur la base d'un modèle expérimental simplifié issu d'un environnement naturel.

Une vue globale de ces communautés requiert de déterminer les cartographies des gradients physiques et chimiques hétérogènes qui vont influencer l'activité des cellules<sup>124</sup>. L'importance de ces gradients et des signaux environnementaux par rapport aux contrôles génétiques émerge progressivement bien qu'encore secondairement étudiés.

Durant ce travail de thèse, nous avons développé une méthode *in situ* non invasive avec une résolution spatiale en (x, y) à l'échelle du pixel, d'une dizaine de micromètres en z et avec une résolution temporelle de quelques minutes qui pourraient être aisément raccourcie au besoin. Cette méthode nous a permis d'étudier et caractérisé l'évolution de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> en 3D dans un biofilm multi-espèces en croissance sous flux constant de milieu nutritif et aussi de son environnement. Nous avons pu ainsi décrire l'émergence des gradients d'O<sub>2</sub>. La confrontation de ces gradients aux événements majeurs de l'installation du biofilm démontre une relation causale. Une forme d'aérotaxie du biofilm est instaurée. L'équilibre de l'oxygène apparaît ici comme un facteur majeur de la structuration de la communauté multi-espèce. Cet équilibre est surtout dominé par l'espèce *Pseudomonas fluorescens*. Cette bactérie a une réponse spécifique à l'anoxie, observable dans le biofilm, et qui consiste à se détacher de la surface dans la quête des zones plus aérées. Ce qui montre que l'O<sub>2</sub> peut être un facteur d'activation et de régulation de voies biologiques.

Nous arrivons à la conclusion que les propriétés de l'environnement (exemple ici de la distribution de l'O<sub>2</sub>) impactent fortement les mécanismes de formation des biofilms composites multi-espèces.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié une perturbation sociale sur le biofilm 4S, en introduisant une cinquième espèce, *E. coli* motile et non motile (à t=0h, t=8h, t=20h et t=36h). Nous avons caractérisé l'installation de cette espèce en l'introduisant dans un canal vierge en absence de toute autre puis simultanément avec les 4 autres espèces et dans des conditions de biofilm 4 espèces pré-établi. Les résultats montrent que la présence de co-colonisateurs réduit significativement la différence entre la souche motile et non motile observé

en biofilm mono-espèce. Nous avons formulé, l'hypothèse d'un effet de la déplétion en oxygène qu'il faudra vérifier en pratiquant l'invasion dans des conditions d'O<sub>2</sub> contrôlé.

Les résultats de ce travail confirment et renforcent le rôle moteur de l'altération des conditions physico-chimiques sur le fonctionnement biologique des biofilms bactériens. Les études cinétiques sont cruciales pour déterminer les relations causales. Dans ces systèmes l'oxygène joue un rôle central et l'obtention des distribution spatio-temporelles dans des conditions expérimentales bien définies permettra de mieux comprendre les mécanismes qui produisent les propriétés biologiques si particulières de ces communautés.

Pour affiner notre compréhension de ces systèmes, nous devons étudier plus finement les seuils d'O<sub>2</sub> qui déclenchent les réponses biologiques en fonction des espèces. On pourra ainsi mieux comprendre comment la sensibilité des différentes espèces à la déplétion de l'O<sub>2</sub> peut être un facteur d'interaction ou de synchronisation.

Cette relation liant la vitesse de croissance et le taux d'O<sub>2</sub> ambiant dépend beaucoup des espèces<sup>83</sup>. Nous avons initié de premières expériences pour étudier cette relation chez *P. fluorescens* en biofilm. Et nous avons observé que le premier niveau de réponse de cette bactérie à une réduction du niveau d'O<sub>2</sub> consistait à induire son propre détachement, limitant ensuite sa croissance. Une étude plus élaborée doit donc être entamée pour ce fonctionnement. En effet nous avons maintenant les moyens de quantifier exactement la concentration locale d'O<sub>2</sub> qui déclenche le détachement, ainsi que les vitesses de croissance associées.

## Bibliographie

1. Schopf, J. W. Fossil evidence of Archaean life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **361**, 869–885 (2006).
2. Canfield, D. E. THE EARLY HISTORY OF ATMOSPHERIC OXYGEN: Homage to Robert M. Garrels. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **33**, 1–36 (2005).
3. Flemming, H.-C. & Wurtz, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **17**, 247–260 (2019).
4. Mettler, E. & Carpentier, B. Location, enumeration and identification of the microbial contamination after cleaning of EPDM gaskets introduced into a milk pasteurization line. *Le Lait* **77**, 489–503 (1997).
5. Baliarda, A., Winkler, M., Tournier, L., Tinsley, C. & Aymerich, S. Dynamic interspecies interactions and robustness in a four-species model biofilm. *MicrobiologyOpen* **10**, (2021).
6. Monmeyran, A. *et al.* Four species of bacteria deterministically assemble to form a stable biofilm in a millifluidic channel. *NPJ Biofilms Microbiomes* **7**, 64 (2021).
7. Monmeyran, A. & Henry, N. Experimental study of a multispecies bacterial biofilm model in video-microscopy : kinetics of formation and interactions between species, Étude expérimentale d'un modèle de biofilm bactérien multi-espèces en vidéomicroscopie : cinétique de formation et interactions entre espèces. (Sorbonne Université, 2019).
8. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187–209 (2002).
9. Lebeaux, D. & Ghigo, J.-M. [Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles?]. *Med Sci (Paris)* **28**, 727–739 (2012).
10. Müller, S. & Nebe-von-Caron, G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 554–587 (2010).
11. Whitman, W. B., Coleman, D. C. & Wiebe, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6578–6583 (1998).
12. Pasteur, L. Mémoire sur la fermentation acétique. *Annales Scientifiques De L École Normale Supérieure* **1**, 113–158.
13. Zobell, C. E. & Allen, E. C. The Significance of Marine Bacteria in the Fouling of Submerged Surfaces. *J Bacteriol* **29**, 239–251 (1935).
14. Bixler, G. D. & Bhushan, B. Biofouling: lessons from nature. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* **370**, 2381–2417 (2012).
15. Henrici, A. T. Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique. *J Bacteriol* **25**, 277–287 (1933).
16. Høiby, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS* **125**, 272–275 (2017).
17. Bjarnsholt, T. *et al.* Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* **44**, 547–558 (2009).
18. Lam, J., Chan, R., Lam, K. & Costerton, J. W. Production of mucoid microcolonies by Pseudomonas aeruginosa within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun* **28**, 546–556 (1980).
19. Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B. & Costerton, J. W. Tobramycin resistance of Pseudomonas aeruginosa cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* **27**, 619–624 (1985).

20. Crapart, S. *et al.* Exiguobacterium profundum sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 287–292 (2007).
21. Goffredi, S. K., Warén, A., Orphan, V. J., Van Dover, C. L. & Vrijenhoek, R. C. Novel forms of structural integration between microbes and a hydrothermal vent gastropod from the Indian Ocean. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3082–3090 (2004).
22. Hügler, M., Wirsén, C. O., Fuchs, G., Taylor, C. D. & Sievert, S. M. Evidence for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the epsilon subdivision of proteobacteria. *J Bacteriol* **187**, 3020–3027 (2005).
23. Boetius, A. *et al.* A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**, 623–626 (2000).
24. Beatty, J. T. *et al.* An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9306–9310 (2005).
25. Du, R. *et al.* Evidence for a missing source of efficient ice nuclei. *Sci Rep* **7**, 39673 (2017).
26. Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W. & Bais, H. P. Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology* **148**, 1547–1556 (2008).
27. Lebeis, S. L. Greater than the sum of their parts: characterizing plant microbiomes at the community-level. *Curr Opin Plant Biol* **24**, 82–86 (2015).
28. Barthole, G. [Never alone. Microorganism, ecology, evolution]. *Med Sci (Paris)* **34**, 604–607 (2018).
29. Tremblay, Y. D. N., Hathroubi, S. & Jacques, M. [Bacterial biofilms: their importance in animal health and public health]. *Can J Vet Res* **78**, 110–116 (2014).
30. Marrie, T. J., Nelligan, J. & Costerton, J. W. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* **66**, 1339–1341 (1982).
31. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**, 95–108 (2004).
32. Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318–1322 (1999).
33. Madsen, J. S., Sorensen, S. J. & Burmolle, M. Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties. *Curr Opin Microbiol* **42**, 104–109 (2018).
34. Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L. M., Briandet, R. & Cotter, P. D. Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities. *Annu Rev Food Sci Technol* **10**, 173–195 (2019).
35. Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. & Dubois-Brissonnet, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* **27**, 1017–1032 (2011).
36. Melchior, M. B., Vaarkamp, H. & Fink-Gremmels, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infections? *Vet J* **171**, 398–407 (2006).
37. Donlan, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**, 881–890 (2002).
38. Strieth, D., Ulber, R. & Muffler, K. Application of phototrophic biofilms: from fundamentals to processes. *Bioprocess Biosyst Eng* **41**, 295–312 (2018).
39. Salvin, P. Étude des biofilms électroactifs issus des milieux humides de la Guyane Française : application aux piles à combustible microbiennes. in (2012).
40. Delille, A. & Humbert, F. In situ monitoring of the first steps of a Pseudomonas fluorescens biofilm formation by ATR-FTIR spectroscopy : Response of the biofilm to variations in the dissolved organic carbon level : Application to early warning changes of microbiological quality of a drinking water, Étude in situ, par spectroscopie infrarouge en mode ATR, des premières étapes de la formation d'un biofilm de Pseudomonas fluorescens et de sa réponse aux variations de la quantité de carbone organique dissous :



- application à la détection précoce du changement de la qualité microbiologique d'une eau de distribution. (Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007).
41. Filloux, A. & Vallet, I. [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci (Paris)* **19**, 77–83 (2003).
  42. O'Toole, G. A. & Wong, G. C. Sensational biofilms: surface sensing in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **30**, 139–146 (2016).
  43. Ha, D.-G. & O'Toole, G. A. c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a Pseudomonas Aeruginosa Review. *Microbiol Spectr* **3**, MB-0003-2014 (2015).
  44. Valentini, M. & Filloux, A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from Pseudomonas aeruginosa and Other Bacteria. *J Biol Chem* **291**, 12547–12555 (2016).
  45. Reisner, A., Haagensen, J. A. J., Schembri, M. A., Zechner, E. L. & Molin, S. Development and maturation of Escherichia coli K-12 biofilms. *Mol Microbiol* **48**, 933–946 (2003).
  46. Belas, R. Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol* **22**, 517–527 (2014).
  47. Sprecher, K. S. *et al.* Cohesive Properties of the Caulobacter crescentus Holdfast Adhesin Are Regulated by a Novel c-di-GMP Effector Protein. *mBio* **8**, (2017).
  48. Wong, G. C. L. *et al.* Roadmap on emerging concepts in the physical biology of bacterial biofilms: from surface sensing to community formation. *Phys Biol* **18**, (2021).
  49. Laganenka, L., López, M. E., Colin, R. & Sourjik, V. Flagellum-Mediated Mechanosensing and RfIP Control Motility State of Pathogenic Escherichia coli. *mBio* **11**, (2020).
  50. Pratt, L. A. & Kolter, R. Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**, 285–293 (1998).
  51. Prigent-Combaret, C. *et al.* Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing Escherichia coli strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**, 450–464 (2000).
  52. McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 39–50 (2012).
  53. Roder, H. L. *et al.* Enhanced bacterial mutualism through an evolved biofilm phenotype. *ISME J* **12**, 2608–2618 (2018).
  54. Olsen, N. M. C. *et al.* Priority of Early Colonizers but No Effect on Cohabitants in a Synergistic Biofilm Community. *Front Microbiol* **10**, 1949 (2019).
  55. Roder, H. L., Liu, W., Sorensen, S. J., Madsen, J. S. & Burmolle, M. Interspecies interactions reduce selection for a biofilm-optimized variant in a four-species biofilm model. *Environ Microbiol Rep* **11**, 835–839 (2019).
  56. O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49–79 (2000).
  57. Davies, D. G. *et al.* The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**, 295–298 (1998).
  58. Kaplan, J. B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* **89**, 205–218 (2010).
  59. Flemming, H.-C., Neu, T. R. & Wozniak, D. J. The EPS matrix: the 'house of biofilm cells'. *J Bacteriol* **189**, 7945–7947 (2007).
  60. Seviour, T. *et al.* The biofilm matrix scaffold of Pseudomonas aeruginosa contains G-quadruplex extracellular DNA structures. *NPJ Biofilms Microbiomes* **7**, 27 (2021).

61. Stewart, P. S. & Franklin, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **6**, 199–210 (2008).
62. Allegrucci, M. & Sauer, K. Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* **189**, 2030–2038 (2007).
63. Roder, H. L., Olsen, N. M. C., Whiteley, M. & Burmolle, M. Unravelling interspecies interactions across heterogeneities in complex biofilm communities. *Environ Microbiol* **22**, 5–16 (2020).
64. Burmolle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T. & Sorensen, S. J. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol* **22**, 84–91 (2014).
65. Lee, K. W. K. *et al.* Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm. *ISME J* **8**, 894–907 (2014).
66. Burmolle, M. *et al.* Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**, 324–336 (2010).
67. Pastar, I. *et al.* Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS One* **8**, e56846 (2013).
68. Liu, W. *et al.* Deciphering links between bacterial interactions and spatial organization in multispecies biofilms. *ISME J* **13**, 3054–3066 (2019).
69. Fazli, M. *et al.* Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *J Clin Microbiol* **47**, 4084–4089 (2009).
70. Ghigo, J. M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442–445 (2001).
71. Røder, H. L., Hansen, L. H., Sørensen, S. J. & Burmølle, M. The impact of the conjugative IncP-1 plasmid pKJK5 on multispecies biofilm formation is dependent on the plasmid host. *FEMS Microbiol Lett* **344**, 186–192 (2013).
72. Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 27–33 (2005).
73. Riedel, K. *et al.* N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology (Reading)* **147**, 3249–3262 (2001).
74. Nadell, C. D., Xavier, J. B. & Foster, K. R. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 206–224 (2009).
75. Xavier, J. B. & Foster, K. R. Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 876–881 (2007).
76. Sharma, A., Inagaki, S., Sigurdson, W. & Kuramitsu, H. K. Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* **20**, 39–42 (2005).
77. Hansen, S. K., Rainey, P. B., Haagenen, J. A. J. & Molin, S. Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* **445**, 533–536 (2007).
78. Morris, R. L. & Schmidt, T. M. Shallow breathing: bacterial life at low O<sub>2</sub>. *Nat Rev Microbiol* **11**, 205–212 (2013).
79. Stolper, D. A., Revsbech, N. P. & Canfield, D. E. Aerobic growth at nanomolar oxygen concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18755–18760 (2010).
80. Fenchel, T. & Finlay, B. Oxygen and the spatial structure of microbial communities. *Biol Rev Camb Philos Soc* **83**, 553–569 (2008).
81. Engelmann, Th. W. Zur Biologie der Schizomyceten. *Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **26**, 537–545 (1881).
82. Douarhe, C., Buguin, A., Salman, H. & Libchaber, A. E. *Coli* and oxygen: a motility transition. *Phys Rev Lett* **102**, 198101 (2009).

83. Couvert, O., Divanac'h, M.-L., Lochardet, A., Thuault, D. & Huchet, V. Modelling the effect of oxygen concentration on bacterial growth rates. *Food Microbiol* **77**, 21–25 (2019).
84. Thar, R. & Kühl, M. Conspicuous veils formed by vibrioid bacteria on sulfidic marine sediment. *Appl Environ Microbiol* **68**, 6310–6320 (2002).
85. Walters, M. C. 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 317–323 (2003).
86. Wessel, A. K. *et al.* Oxygen limitation within a bacterial aggregate. *mBio* **5**, e00992 (2014).
87. Crofts, A. A. *et al.* Enterotoxigenic *E. coli* virulence gene regulation in human infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E8968–E8976 (2018).
88. Kolpen, M. *et al.* Reinforcement of the bactericidal effect of ciprofloxacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by hyperbaric oxygen treatment. *Int J Antimicrob Agents* **47**, 163–167 (2016).
89. Jensen, P. Ø. *et al.* Improving antibiotic treatment of bacterial biofilm by hyperbaric oxygen therapy: Not just hot air. *Biofilm* **1**, 100008 (2019).
90. Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C.-T. & McFeters, G. A. Spatial Physiological Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Is Determined by Oxygen Availability. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4035–4039 (1998).
91. Stewart, P. S. Mini-review: Convection around biofilms. *null* **28**, 187–198 (2012).
92. Dietrich, L. E. P. *et al.* Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. *J Bacteriol* **195**, 1371–1380 (2013).
93. Staal, M., Borisov, S. M., Rickelt, L. F., Klimant, I. & Kühl, M. Ultrabright planar optodes for luminescence life-time based microscopic imaging of O<sub>2</sub> dynamics in biofilms. *Journal of Microbiological Methods* **85**, 67–74 (2011).
94. Moya, A. *et al.* Profiling of oxygen in biofilms using individually addressable disk microelectrodes on a microfabricated needle. *Microchimica Acta* **182**, 985–993 (2015).
95. Klementiev, A. D., Jin, Z. & Whiteley, M. Micron Scale Spatial Measurement of the O<sub>2</sub> Gradient Surrounding a Bacterial Biofilm in Real Time. *mBio* **11**, (2020).
96. Kühl, M., Rickelt, L. F. & Thar, R. Combined imaging of bacteria and oxygen in biofilms. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6289–6295 (2007).
97. Klimant, I., Meyer, V. & Kühl, M. Fiber-Optic Oxygen Microsensors, a New Tool in Aquatic Biology. *LIMNOLOGY AND OCEANOGRAPHY* **40**, 1159–1165 (1995).
98. König, B., Kohls, O., Holst, G. A., Glud, R. N. & Kühl, M. Fabrication and test of sol-gel based planar oxygen optodes for use in aquatic sediments. *Marine Chemistry* **97**, 262–276 (2005).
99. Glud, R. N., Ramsing, N. B., Gundersen, J. K. & Klimant, I. Planar optodes: a new tool for fine scale measurements of two-dimensional O<sub>2</sub> distribution in benthic communities. *Marine Ecology Progress Series* **140**, 217–226 (1996).
100. Datta, R., Heaster, T. M., Sharick, J. T., Gillette, A. A. & Skala, M. C. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *J Biomed Opt* **25**, 1–43 (2020).
101. Wallrabe, H. & Periasamy, A. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 19–27 (2005).
102. Sharick, J. T. *et al.* Metabolic Heterogeneity in Patient Tumor-Derived Organoids by Primary Site and Drug Treatment. *Front Oncol* **10**, 553 (2020).

103. Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P. & Hall-Stoodley, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol* **15**, 740–755 (2017).
104. Monmeyran, A. *et al.* The inducible chemical-genetic fluorescent marker FAST outperforms classical fluorescent proteins in the quantitative reporting of bacterial biofilm dynamics. *Sci Rep* **8**, 10336 (2018).
105. Shen, X., Hu, H., Peng, H., Wang, W. & Zhang, X. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics* **14**, 271 (2013).
106. Elzer, P. H. *et al.* In vivo and in vitro stability of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS in six *Brucella* species. *Plasmid* **33**, 51–57 (1995).
107. Bel, Y., Ferré, J. & Hernández-Martínez, P. *Bacillus thuringiensis* Toxins: Functional Characterization and Mechanism of Action. *Toxins (Basel)* **12**, (2020).
108. Pardo-López, L., Soberón, M. & Bravo, A. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 3–22 (2013).
109. Yun, J.-H. *et al.* *Kocuria salsicia* sp. nov., isolated from salt-fermented seafood. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 286–289 (2011).
110. Lagendijk, E. L., Validov, S., Lamers, G. E. M., de Weert, S. & Bloemberg, G. V. Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol Lett* **305**, 81–90 (2010).
111. Piruska, A. *et al.* The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation. *Lab Chip* **5**, 1348–1354 (2005).
112. Sun, Y. Determination of fluorescence lifetime of sodium fluorescein. *CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY* **28**, 1415–1416 (2000).
113. Panier, T. & Debrégeas, G. Imaging the neuronal activity from the whole brain of a zebrafish using selective plane illumination microscopy, Imagerie par nappe laser de l'activité neuronale dans l'ensemble du cerveau d'un poisson-zèbre. (Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014).
114. Lakowicz, J. R. & Weber, G. Quenching of fluorescence by oxygen. A probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry* **12**, 4161–4170 (1973).
115. Markov, D. A., Lillie, E. M., Garbett, S. P. & McCawley, L. J. Variation in diffusion of gases through PDMS due to plasma surface treatment and storage conditions. *Biomed Microdevices* **16**, 91–96 (2014).
116. Miranda, I. *et al.* Properties and Applications of PDMS for Biomedical Engineering: A Review. *Journal of Functional Biomaterials* **13**, (2022).
117. Shakeri, A., Khan, S. & Didar, T. F. Conventional and emerging strategies for the fabrication and functionalization of PDMS-based microfluidic devices. *Lab Chip* **21**, 3053–3075 (2021).
118. Borriello, G. *et al.* Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2659–2664 (2004).
119. Gambino, M. & Cappitelli, F. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling* **32**, 167–178 (2016).
120. Cao, B., Coelho, S., Li, J., Wang, G. & Pertsinidis, A. Volumetric interferometric lattice light-sheet imaging. *Nat Biotechnol* **39**, 1385–1393 (2021).
121. Thomen, P. *et al.* Bacterial biofilm under flow: First a physical struggle to stay, then a matter of breathing. *PLoS One* **12**, e0175197 (2017).
122. Figueroa-Morales, N. *et al.* Living on the edge: transfer and traffic of *E. coli* in a confined flow. *Soft Matter* **11**, 6284–6293 (2015).

123. Youssef, W. B., Deforet, M., Monmeyran, A. & HENRY, N. FLAGELLAR MOTILITY DURING E. COLI BIOFILM FORMATION PROVIDES A COMPETITIVE DISADVANTAGE WHICH RECEDES IN THE PRESENCE OF CO-COLONIZERS. *bioRxiv* (2022) doi:10.1101/2022.04.05.487170.
124. Jo, J., Price-Whelan, A. & Dietrich, L. E. P. Gradients and consequences of heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* (2022) doi:10.1038/s41579-022-00692-2.
125. Tsien, R. Y. The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509–544 (1998).
126. 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).
127. 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).
128. Streett, H. E., Kalis, K. M. & Papoutsakis, E. T. A Strongly Fluorescing Anaerobic Reporter and Protein-Tagging System for Clostridium Organisms Based on the Fluorescence-Activating and Absorption-Shifting Tag Protein (FAST). *Appl Environ Microbiol* **85**, (2019).
129. Tebo, A. G. *et al.* Orthogonal fluorescent chemogenetic reporters for multicolor imaging. *Nat Chem Biol* **17**, 30–38 (2021).
130. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* **6**, 343–345 (2009).
131. Gibson, D. G. *et al.* Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**, 52–56 (2010).
132. Zhou, Z. *et al.* Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6117–E6125 (2016).
133. Zhang, G. *et al.* A mimicking-of-DNA-methylation-patterns pipeline for overcoming the restriction barrier of bacteria. *PLoS Genet* **8**, e1002987 (2012).

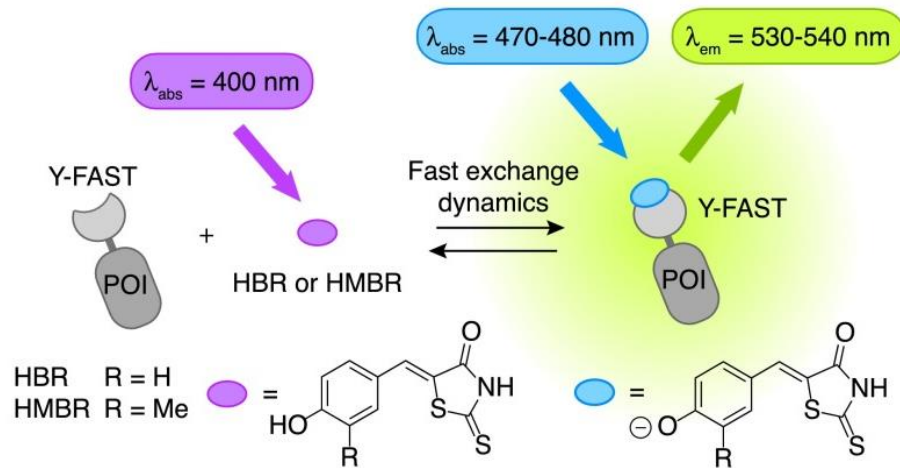
## Annexes

### Annexe A : Fluorescence dans les biofilms et construction de souches 'FAST'

#### 1. Le problème de la fluorescence dans les biofilms

Cette partie consistera à décrire brièvement nos tentatives pour établir une série de souches exprimant différentes versions de la protéine FAST de façon à dégager des outils de suivi quantitatifs du développement des biofilms in situ sur la base de marqueurs codés génétiquement. Lorsque notre équipe a commencé à travailler sur le projet « biofilm multi-espèces » est apparue la nécessité de suivre les cinétiques individuelles des espèces au sein du biofilm et donc le besoin de sondes spécifiques codées génétiquement. Ainsi la bactérie *Bacillus thuringiensis* a été marquée très classiquement par la protéine GFP. Notre équipe a alors observé qu'à partir d'un stade avancé de développement de biofilm, la fluorescence produite par les cellules ne variait plus linéairement avec la biomasse correspondante. L'analyse détaillée du processus a permis de montrer que cette perte de linéarité était liée à l'abaissement du niveau d'oxygène dans le biofilm<sup>104</sup>. En effet, il est connu que pour la famille des protéines fluorescentes GFP, une étape d'oxydation est essentielle pour l'acquisition de la fluorescence. Cette étape nécessite une concentration minimale d'oxygène présente dans le milieu<sup>125 126 104</sup>. Lorsque le seuil d'O<sub>2</sub> ambiant devient inférieur à cette concentration seuil, la protéine est produite, mais elle est non fluorescente.

Pour pouvoir assurer un suivi quantitatif du développement des espèces au sein du biofilm composite, nous avons avec Arnaud Gautier, essayé de développer une alternative en utilisant la protéine FAST. C'est un rapporteur génétique fluorescent indépendant de l'oxygène, car sa fluorescence nécessite la présence d'un chromophore fluorogénique, lui-même non fluorescent sous sa forme libre<sup>127</sup>. Cette protéine permet donc d'étudier des systèmes anaérobies<sup>128 104</sup>. D'autre part, en parallèle de cette thèse, le groupe du Prof. Gautier a mis au point une série de protéines de type 'FAST' porteuses de caractéristiques fluorescentes orthogonales permettant d'obtenir couples protéine/fluorogène qui ne se recouvre pas<sup>129</sup>.



**Figure 60:**FAST Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag<sup>127</sup>

Nous avons donc tenté durant cette thèse d'établir une série de souches aux propriétés de fluorescence orthogonales. Ce travail est à l'heure actuelle toujours en cours. En effet, le système des protéines FAST initialement développé pour le marquage des cellules eucaryotes s'est avéré plus complexe qu'attendu chez les procaryotes.

## 2. Transformations chez *E. coli*

Sur la base de deux plasmides originaux conçus par Arnaud Gautier et utilisés chez la souche d'*E. coli* Rosetta dans un but de surproduction de protéine FAST, nous avons mis en œuvre plusieurs stratégies pour exprimer cette protéine dans nos souches.

### 2.1.Stratégie 1 : Remplacement du promoteur t7 par le promoteur Lambda PR dans le plasmide d'origine

Les plasmides originaux, pAG87 et pAG101 (voir cartes des plasmides), portent respectivement le gène FAST et le gène de la protéine de fusion FAST-mCherry sous le contrôle du promoteur T7 avec une résistance à la kanamycine<sup>127</sup>. Pour pouvoir les utiliser dans nos souches d'*E. coli*, nous avons remplacé le promoteur T7 par le promoteur lambda pR en digérant les vecteurs plasmidiques avec BglII et XbaI (enzymes Fast Digest, Fermentas) et en les purifiant sur gel d'agarose. La séquence du promoteur pR a été obtenue par hybridation de deux séquences d'oligonucléotides d'ADN (Eurofins) suivants :

GATCGACTATTTTACCTCTGGCGGTGATAATGGTTGCATGTACTAAGGAGGTTG

et

CTAGCAACCTCCTTAGTACATGCAACCATTATCACCGCCAGGTAAAATAGTC

Les plasmides digérés et purifiés ont été mélangés aux oligonucléotides hybridés et ligaturés à l'aide d'un kit de ligature d'ADN (Thermo Fisher). Nous obtenons les plasmides pAG87pR et pAG101pR. La souche DH5 $\alpha$  d'*Escherichia coli* a été préparée pour être transformée par choc thermique avec le produit de ligature, puis étalée sur des plaques sélectives à la kanamycine. Après une nuit de croissance, nous ajoutons le HBR-2,5 DM (fluorogène) sur les plaques. Les colonies ont été ensuite criblées en observant la fluorescence du complexe FAST-HBR2.5DM (en vert) au microscope. Les clones fluorescents ont été récupérés. La séquence de chaque clone a été vérifiée par séquençage de l'ADN avant l'extraction du plasmide.

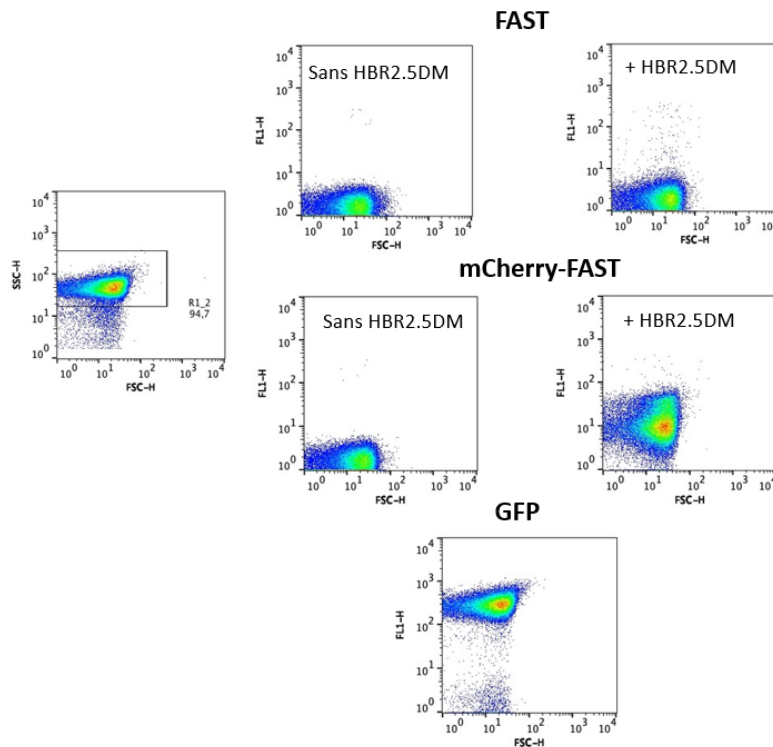
Deux souches MG1655 portant toutes les deux le plasmide F<sup>70</sup> dont une mutante de la motilité flagellaire (non motile) (voir Chap.2.I.1.souches) sont préparées pour être transformées par choc thermique avec pAG101pR et pAG87pR.

## Résultats

Nous avons ensuite testé la fluorescence des clones issus de la transformation par les deux plasmides pAG101pR (mCherry-FAST) et le pAG87pR (FAST) par cyrtométrie en flux. Nous ajoutant du fluorogène HBR2.5DM pour visualiser la fluorescence de la protéine FAST en FL1.

Les clones qui expriment FAST seule expriment une faible fluorescence qui ne se distingue pas du bruit de fond (2,2u.a) (Fig.61). Cependant ceux exprimant la fusion FAST-mCherry présentent une fluorescence non négligeable dont la moyenne est de l'ordre de 37u.a. Cette fluorescence reste moyennement faible comparée à celle de GFP (270u.a) (Fig.61).





**Figure 61: Analyse des niveaux de fluorescence des clones *E. coli* par cytométrie en flux.** La première ligne *E. coli* exprimant la protéine FAST. Deuxième ligne *E. coli* exprimant la fusion m-Cherry-FAST. Et dernière ligne *E. coli* exprimant GFP. La fluorescence est enregistrée en FL1 et les mêmes paramètres (nombres d'évènements, etc.) sont appliqués pour les trois mesures.

Hypothèse 1 : la protéine FAST est toxique pour les souches utilisées ce qui fait qu'elle développe des stratégies (voies) permettant de bloquer l'expression de la protéine.

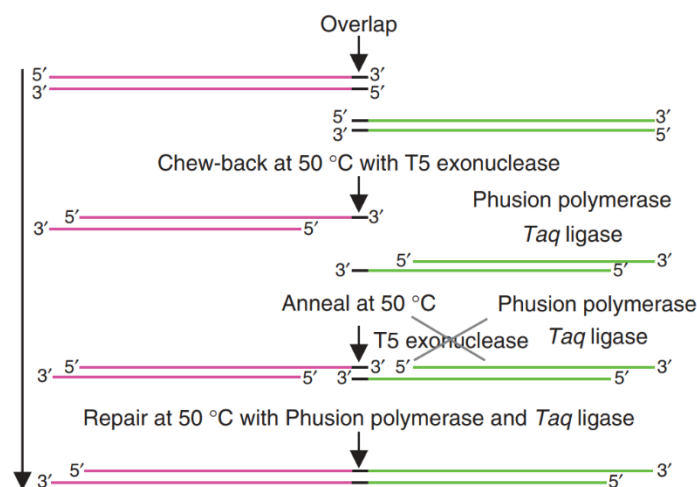
Hypothèse 2 : Le plasmide utilisé, obtenu suit à la stratégie de cette construction n'est pas adaptés pour *E. coli*.

Les résultats de ce test ont suggéré une nouvelle tentative avec une stratégie de construction de plasmide différente.

## 2.1.Strategie2 : GIBSON ASSEMBLY

Cette deuxième stratégie consiste à partir d'une base fonctionnelle, c'est-à-dire d'utiliser un plasmide connu et efficace pY-2P-IntC, récupéré de l'institut Cochin, déjà utilisé dans *E.coli* pour l'expression de la protéine fluorescente YFP sous le promoteur P2. Nous remplaçons la séquence YFP par celle de FAST en utilisant la méthode de Gibson (NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix, BioLabs). Cette méthode est bien décrite par Daniel G. Gibson<sup>130</sup>, elle

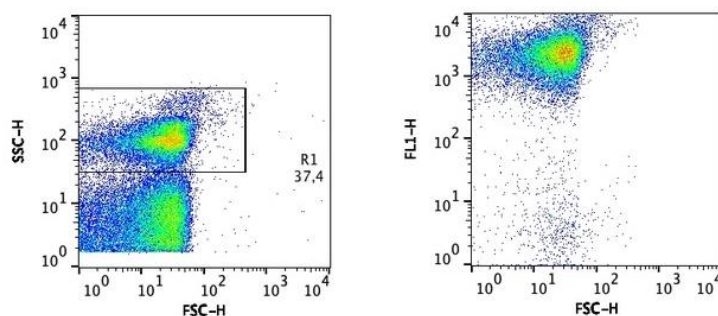
est une méthode robuste à réaction unique permettant l'assemblage enzymatique de plusieurs séquences d'ADN de grande taille allant jusqu'à plusieurs centaines de kb. C'est une méthode rapide et fiable effectuée dans des conditions isothermes. Elle consiste à assembler d'une manière covalente plusieurs séquences d'ADN chevauchantes par les activités enzymatiques de 5' exonucléase, l'ADN polymérase et l'ADN ligase (Fig62). Cette méthode a été largement adoptée et constitue l'une des principales méthodes pour construction des gènes synthétiques, naturels et même des génomes entiers. Elle est très utile dans l'ingénierie moléculaire. En appliquant cette méthodologie, le génome mitochondrial de la souris de 16,3 kb a été assemblé<sup>130 131</sup>.



**Figure 62: La méthode GIBSON ASSEMBLY.** Recombinaison isotherme in vitro en une étape. Deux fragments d'ADN adjacents (magenta et vert) partageant des chevauchements de séquence terminale (noir) ont été joints en une molécule scellée de manière covalente dans une réaction isotherme en une étape. L'exonucléase T5 a éliminé les nucléotides des extrémités 5' des molécules d'ADN double brin, les 'overhangs' d'ADN simple brin complémentaires se sont hybridés, l'ADN polymérase « Phusion » a rempli les espaces et l'ADN ligase Taq a scellé les entailles. L'exonucléase T5 est thermolabile et est inactivée pendant l'incubation à 50 °C.

Nous récupérons un plasmide « pWBY1 » contenant la séquence FAST sous le promoteur P2, que nous validons par séquençage. Nous utilisons ensuite ce plasmide pour la transformation des cellules *E. coli* par la méthode de choc thermique. Cette partie du travail a été effectuée à l'INRAE au sein de l'équipe du professeur Sauveplane Vincent que nous tenons à remercier de son aide.

Comme avec la première stratégie, nous testons les niveaux de fluorescence des clones transformés par cyrtométrie en flux en FL1 après l'ajout du HBR2.5DM. Contrairement aux résultats précédents, ces clones expriment une 'super' fluorescence qui dépasse même la GFP avec une fluorescence moyenne de l'ordre de 2304u.a (Fig.63).

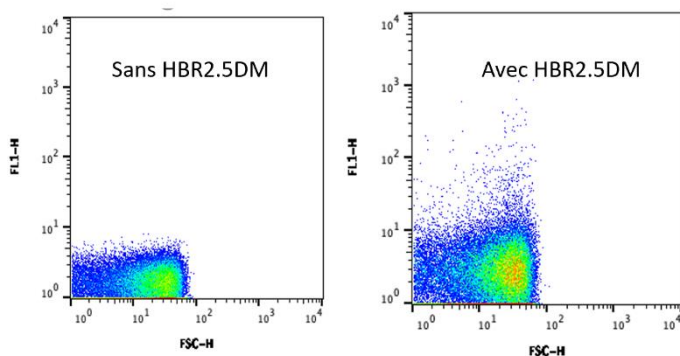


**Figure 63: Analyse de fluorescence par cytométrie en flux.** Étude de la fluorescence du clone transformé par le plasmide contenant FAST issu de la construction par GIBSON Assembly. Les résultats présentés sont observés en FL1 (figure de droite) avec l'ajout du colorant.

Nous observons une fluorescence homogène et intense en FL1.

Nous avons effectué des glycérol stocks de ce clone que nous avons gardé à -80°C. À partir de ce glycérol stock nous avons ensuite étalé sur boîte de M1 Agar et incubé pendant 60-64h. Nous sélectionnons une colonie pour effectuer une culture OVN qu'on diluera pour obtenir une culture exponentielle. A notre surprise notre culture n'était pas fluorescente quand étudié par microscopie et comparé à un contrôle fluorescent. Nous avons donc reproduit la même procédure de culture et cette fois nous avons retesté plusieurs cultures (OVN EXPO) au cytométrie en flux.

Nous avons observé que le niveau global de fluorescence après ces étapes de repiquage est beaucoup moins élevé que celui enregistré directement après la transformation (Fig.64). En effet la fluorescence ne se distingue pas de brut de fond avec quelques cellules fluorescentes dispersées. Le plasmide de l'une de ces cultures dont la fluorescence a été dégradée a été séquencé. Le résultat du séquençage a montré que la séquence FAST est bien présente.



**Figure 64: Niveau de fluorescence détectée par cytométrie en flux du clone *E. coli* FAST transformée selon la méthode de GIBSON Assembly après quelques repiquages.**

D'après les résultats de la première stratégie dont seuls les clones mCherry-FAST sont fluorescents et stables et ces résultats, nous concluons l'instabilité de la protéine FAST quand exprimée toute seule contrairement à la fusion m-Cherry-FAST qui reste stable malgré le niveau de fluorescence moyen. Ceci nous met devant l'hypothèse :

-Le promoteur utilisé, P2 est un promoteur constitutif fort ce qui a provoqué une toxicité aux cellules suite à la surproduction de la protéine, ce qui a incité la cellule à développer des mécanismes de désactivation. Et dans ce cas il faut essayer un promoteur inductible. Cependant garantir une concentration homogène de l'inducteur sera un problème dans le cas de notre application vu la complexité et l'hétérogénéité de notre milieu biofilm.

### 2.2.Stratégie 3

Nous avons dernièrement obtenu du groupe Ghigo à Pasteur, un plasmide dont les codons d'usage ont été optimisés avec le gène FAST sous le contrôle du promoteur Lambda Pr thermo-inductible (détails du plasmide dans l'annexe C). En effet, des biais d'usage de codon ont été mis en évidence dans de nombreux organismes et pourraient jouer un rôle important sur les niveaux d'expression des protéines<sup>132</sup>. Ce plasmide présente une stabilité confirmée dans les souches d'*E. coli* utilisés à Pasteur. Les essais pour transformer nos souches *E.coli* avec ce plasmide sont en cours.

### 3. Fluorescence chez *P. fluorescens*

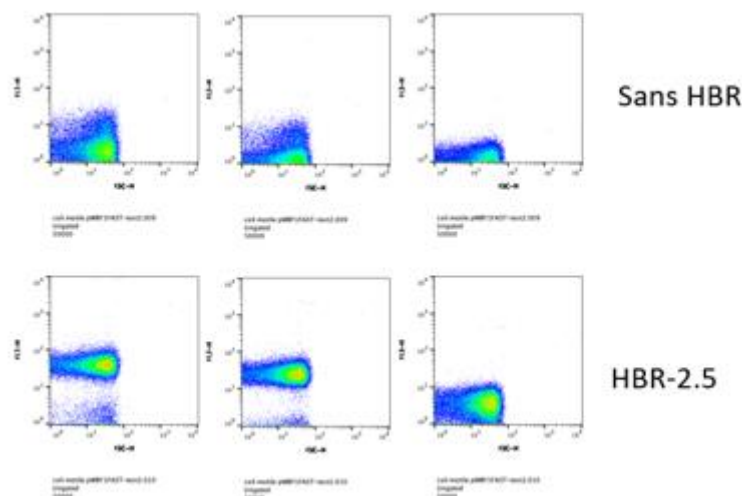
Nous avons également essayé de construire une souche *P.Fluorescens*-FAST sur la base de la souche WSC365. Les transformations ont été réalisées avec l'aide d'Aurélié Baliarda

(INRA - MICALIS). On a considéré une stratégie très proche de celle de Langendijk et collaborateurs<sup>110</sup> quand ils ont développé le *P.fluorescens*-mCherry . le clonage s'est fait dans pBBR1-MCS5 (pWYE561<sup>133</sup>) avec l'utilisation des enzymes BamHI et XhoI. On a amplifié par PCR la séquence FarRed (DNA-sequence-Far-red-optimized) et RedFast (pAG308-pET28a-His-TEV-redFAST) (DNA-sequence-red-FAST), ensuite sous-cloné le produit PCR dans pGEM-T easy. Nous digérons ces régions d'intérêt avec BamI et XhoI et les intégrons dans pWYE561 préalablement ouvert par les mêmes enzymes<sup>133</sup>.

Un premier clonage a été effectué dans *E. coli* suivi d'une vérification des constructions avant la transformation finale dans *Pf*. Le promoteur utilisé lors de ces constructions est pTac. Voici les amorces utilisées pour amplifier les régions d'intérêt (RedFast et Far Red).

Nom	Séquence (5' vers 3')
BamFastdir	AAAAGGATCCGGGGAATTCTTGACAATTAATCATCGGCTCGT ATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTTCACACAGG AAACAGCTAAATGGAGCATGTTGCCTTTG
XhoFastrev	CCGCTCGAGCTATTACACCCGTTTCACA

Nous avons récupéré de chez nos collaborateurs, la souche transformée sous forme d'une culture en stab. D'abord une étape d'étalement sur boîte de M1 Agar a été effectuée. Nous avons ensuite dilué une colonie dans du M1 et lancé une culture OVN. Un glycérol stock de cette culture a été conservé à -80°C. Et la fluorescence de cette culture a été testée en cytométrie en flux (Fig.65).



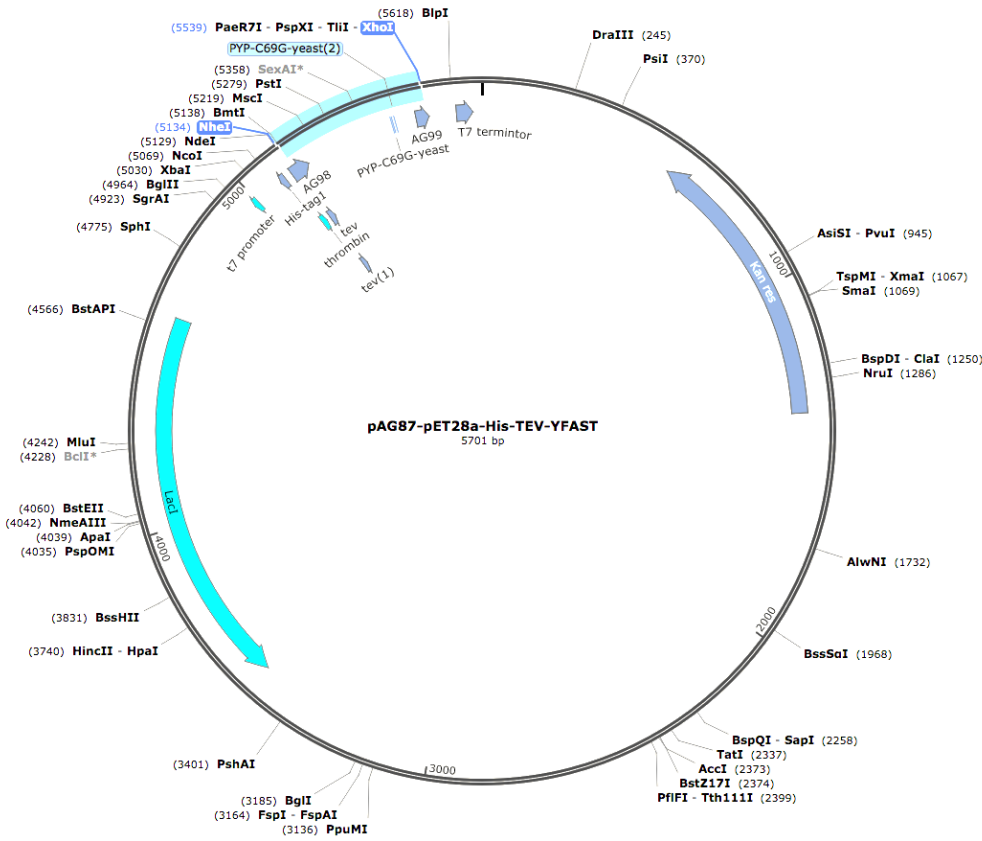
**Figure 65: Étude de la fluorescence de *P.fluorescens* Far-Red par cytométrie en flux.** Fluorescence en FL1 (1<sup>ère</sup> colonne), FL2 (2<sup>ème</sup> colonne) et FL3 (3<sup>ème</sup> colonne) respectivement.

Les souches obtenues expriment un niveau de fluorescence non négligeable. Cependant, seul ce repiquage a été possible suite à la transformation. Nous n'avons ensuite pas été capables d'effectuer des cultures OVN, car aucune colonie ne pousse plus sur les boîtes de M1 Agar. Ces observations confirment nos hypothèses à propos de la toxicité de la protéine déjà vue sur *E. coli*.

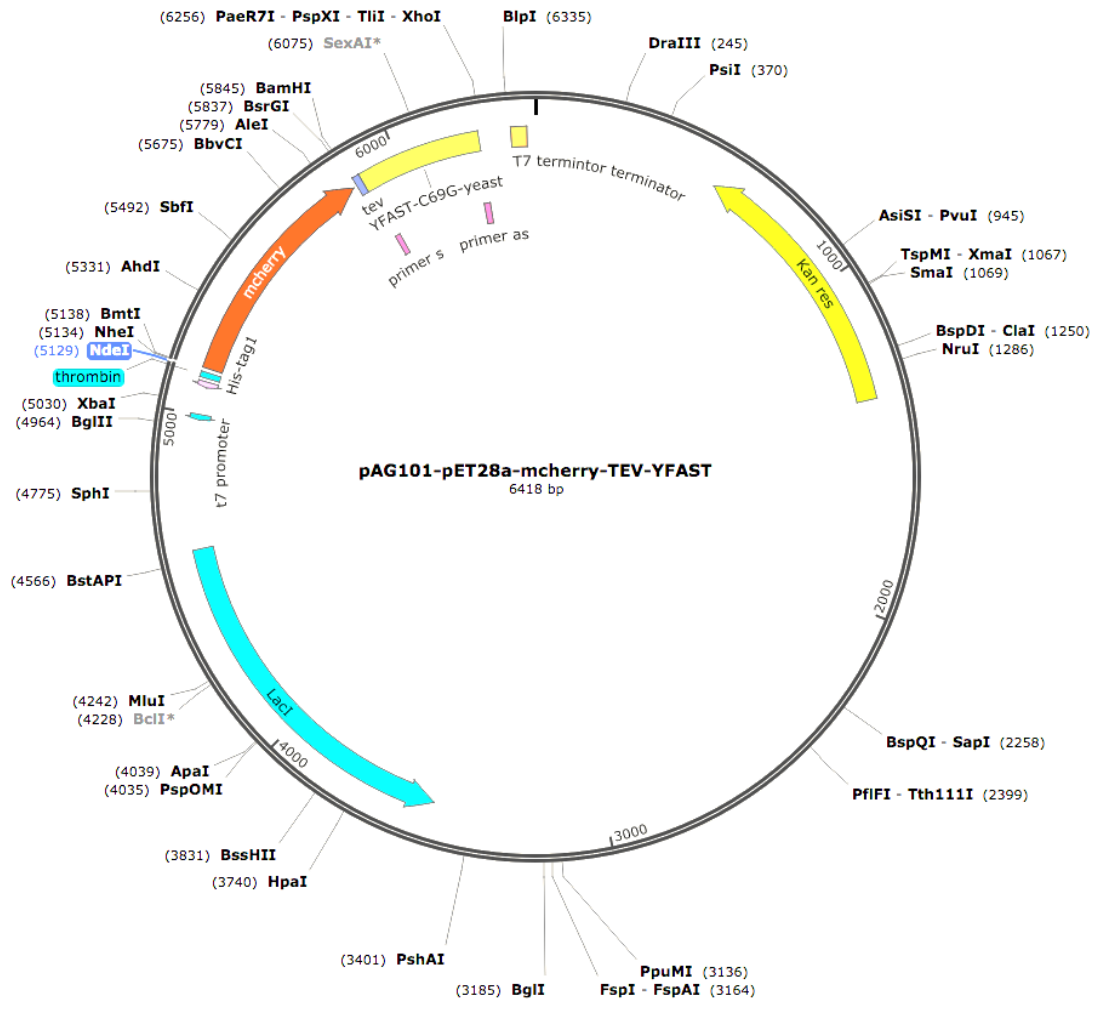
Nos résultats suite à ces tentatives de transformation chez *E. coli* et *P.fluorescens* sont confus. La stabilité de la protéine FAST peut être un sujet d'étude. L'effet de cette protéine sur les procaryotes semble dépendre de l'espèce, des niveaux d'expression (promoteur) et de la méthode de clonage (plasmide, chromosome). En effet, chez *Bacillus thuringiensis* nous avons observé que la fluorescence de FAST inséré dans un plasmide est hétérogène. Suite à la transformation, deux sous-populations ont été détectées au sein du même clone. Certaines cellules sont super-fluorescentes et d'autres beaucoup moins fluorescentes. Dans le cas de *B.thuringiensis*, la stabilité de la protéine est réglée quand la FAST a été insérée sur le chromosome. C'est là où nous avons eu une souche ayant une fluorescence moyenne, mais homogène et c'est la souche *B. thuringiensis* FAST que nous utilisons dans le biofilm 4S.

# Cartes des plasmides

- pAG87

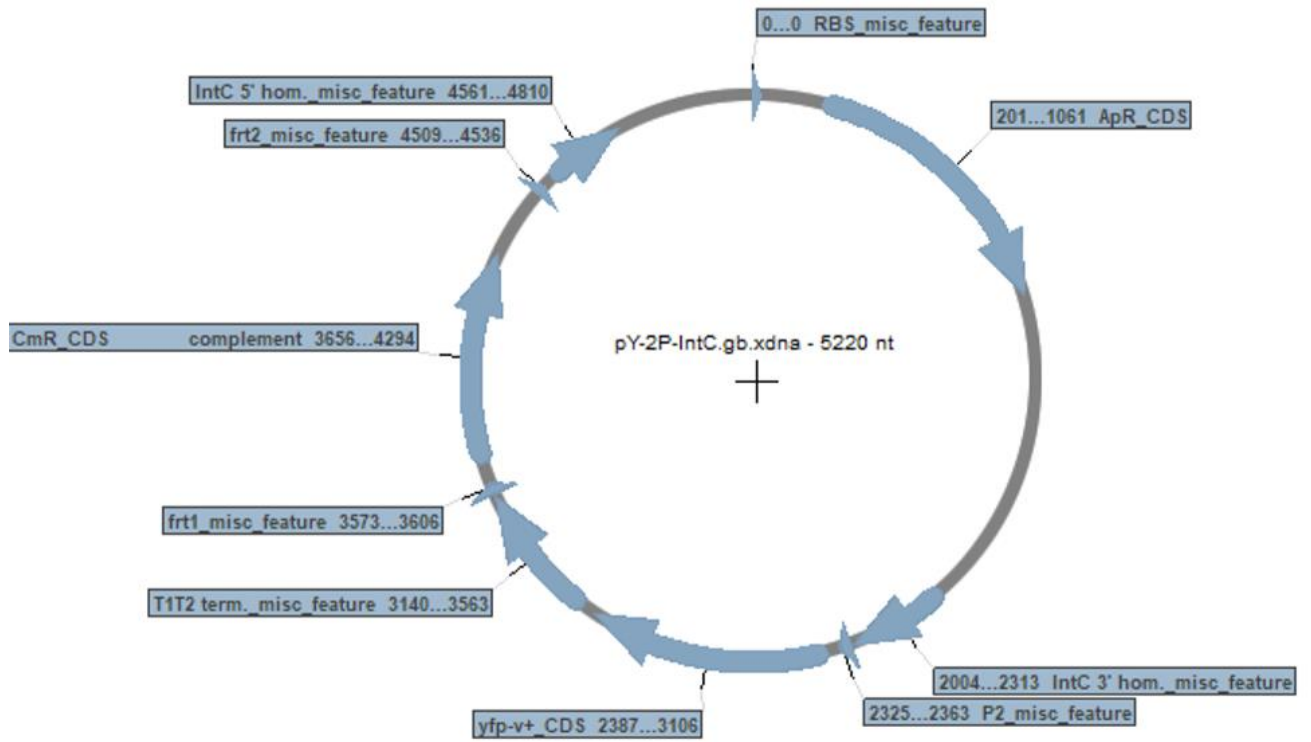


- **pAG101**

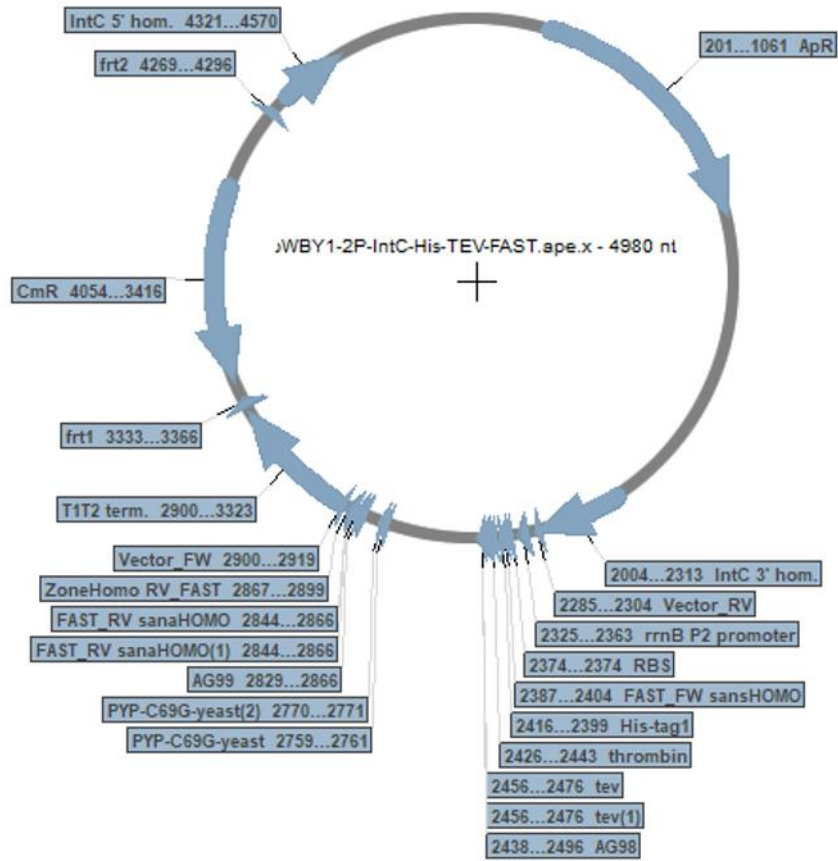




- pY-2P



- pWBY1-2P



## Annexe B : composition des milieux M1, MB, et M1 Agar

<i>Composition</i>	<b>M1 (g/L)</b>	<b>MB (g/L)</b>	<b>M1 Agar (%)</b>
Yeast Nitrogen Base from DIFCO BD	1.7	1.7	Base10X* 10%
Ammonium sulfate	5	5	
Glucose	10	0.4	5%
Casamino-acids	5	1	5%
Agar	-	-	80%

\*Base 10X est le mélange de Yeast Nitrogen Base (1,7g/L) and the ammonium sulfate (5g.L).

## Annexe C : Configuration du laser et des filtres du FACS Calibur

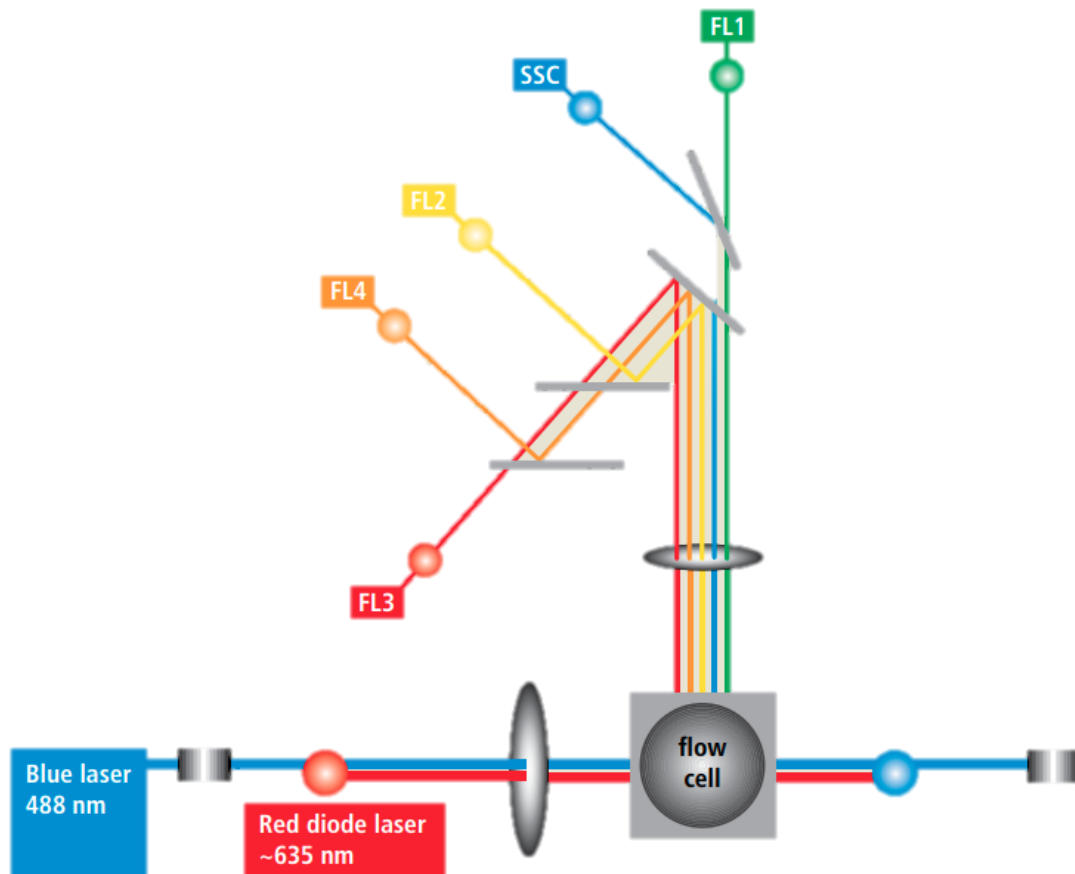


Schéma de la configuration du laser et des filtres du FACS Calibur de BDscientifics, fournit par le constructeur.

## Annexe D : Routine MATLAB

Automatisation des acquisitions de temps de vie de fluorescence en fonction de temps à différentes positions en z (automatisation de déplacements) et avec des injections séquentielles de MB et MiRu (automatisation des injections)

```
%%Connecting MATLAB to LIFLIM%disp("");
disp('Connecting to LI-FLIM');
liflim = actxserver('LIFLIM.App');
disp('Creating a timer with a start delay of min 50 seconds');
tm = timer('TimerFcn', @eventTimer, 'StartDelay', 50);

%%
%Acquire Reference data and create an object liflim
disp('Registering the Lifetime event using the timer as extra parameter');
liflim.registerevent({'Lifetime', @(ObjectName, EventID, EventStruct,
EventName)eventLifetime(ObjectName, EventID, EventStruct, EventName, tm)});
disp('Start the timer');
start(tm);
liflim.Reference();
wait(tm);

%% Start pumps
[sp1,sp2] = start_syringepumps('COM13','COM14');

%% Ask for infusion rates
rate1 = infusion_rate(sp1);
rate2 = infusion_rate(sp2);
rate1
rate2

%% Acquisition essentials
N=25; %N:Acquisitions Number
z0=2.8933 %z reference position: focus on lamella

%define filename, ex filename='4S BIOFILM-Oct6'
filename='211126BtMiRu';
mkdir(filename)

% define the five z positions to explore: 3µm, 15µm,...,740µm from the bottom
zpos=[0.003 0.015 0.03 0.06 0.1 0.3 0.5 0.73 0.75];

%% Pumping cycle with Lifetime acquisition

tr = timer; %Chnl Fulling
```

```

tr.StartDelay = 180; %3min for Mi-Ru on flow
tr.TimerFcn = @(myTimerObj, thisEvent)disp('tr second has elapsed');

tmb = timer; %MB
tmb.StartDelay = 7200; %2h for MB on flow
tmb.TimerFcn = @(myTimerObj, thisEvent)disp('tmb second has elapsed');

for i=1:N
    i
    stop_syringepump(sp1)
    start(tr)
    run_syringepump(sp2)
    wait(tr)
    stop_syringepump(sp2)
    %% Acquisition LifeTime
    for iz=1:size(zpos,2)
        z=z0+zpos(iz);
        Axis_Z.MOV(axisname,z);
        disp(['z=' num2str(z)])

    %% Acquire sample data at the defined iz
    start(tm);
    disp('Record a sample');
    liflim.Sample();
    disp('Wait for the timer to stop: either a timeout occurred or a new lifetime image is ready');
    disp('...');
    wait(tm);
    disp('Retrieving lifetime data');
    % Get dimensions of camera data
    %sz = liflim.GetLifetimeDataDims();
    %Design sz to get a final 4D array
    sz=[4 1024 1024 1];
    % Get the lifetime data itself (time frame 0)
    data = liflim.GetLifetimeData(0);
    % Reshape and permute the data accordingly to
    %Generate im, a 4D array (X,Y,z,data type), data type means lifetime images
    %from phase(1), Modulation(2), Intensity image(3), Delta Mod-Ph(4)
    im = permute(reshape(data, sz), [2, 3, 4, 1]);
    % Subtract channel 1 from 2 (Matlab arrays are one-based)
    delta = double(im(:, :, 1, 2, 1, 1, 1)) - double(im(:, :, 1, 1, 1, 1, 1));

    %%
    % Plot the results last recorded images only
    disp('Displaying the images');
    % Display the images
    figure(gcf);
    subplot(2, 2, 1);
    image(im(:, :, 1, 1), 'CDataMapping', 'direct'); %derniere dim d dplc
    title('Lifetime from Phase');

```

```

colorbar
subplot(2, 2, 2);
image(im(:, :, 1, 2), 'CDataMapping', 'direct');
title('Lifetime from Modulation');
colorbar
subplot(2, 2, 3);
image(im(:, :, 1, 3), 'CDataMapping', 'direct');
title('DC Intensity');
colorbar
subplot(2, 2, 4);
image(delta, 'CDataMapping', 'direct');
title('(Lifetime from Modulation) - (Lifetime from Phase)');
colorbar
colormap('jet');

%increment the zstack
imz(:,:,iz,:)=im;

disp('stop');
end

z=z0;
Axis_Z.MOV(axisname,z);

run_syringepump(sp1)

start(tmb)

%save the 4D array imz in a directory (ex: Oct6) in a file named Oct600t
save(fullfile(filename,[filename,sprintf("%03d",i)]),'imz');

wait(tmb)

end

%% terminate 1
terminate_syringepump(sp1)
clear('sp1')

%% terminate 2
terminate_syringepump(sp2)
clear sp2

```

## Table des illustrations

<b>Figure 1 : Image de microscopie électronique à balayage d'un biofilm marin.</b> D'après S. Chimileski & R. Kolter .....	11
<b>Figure 2: Distribution et habitats des micro-organismes sur Terre.</b> D'après Flemming HC et al. <sup>3</sup> .....	12
<b>Figure 3: Site de source chaude 'grand prismatic spring', au parc National de Yellowstone (USA).</b> Biofilm <i>extrêmophile</i> . .....	13
<b>Figure 4: Exemples de bio-encrassement marin<sup>14</sup>.</b> Zones typiquement sensibles à l'encrassement biologique sur un navire. ....	14
<b>Figure 5: Biofilm de <i>Bacillus subtilis</i> à la surface des racines d'<i>Arabidopsis thaliana</i><sup>26</sup>.</b> En haut à droite une plante malade infectée par un pathogène (feuilles jaunissent) dont les racines ne présentent aucun biofilm. En bas à droite une plante traitée par <i>Bacillus subtilis</i> installée à la surface des racines. ....	17
<b>Figure 6: Image en microscopie électronique d'une contamination sur une surface d'implant médical par un biofilm.</b> Ici, une prothèse cardiaque. D'après Dr L. Bénard, Laboratoire GRAM EA 2656. ....	18
<b>Figure 7: Image en microscopie électronique à balayage d'une contamination d'un circuit agroalimentaire par un biofilm.</b> Un système d'eau industriel contaminé par un biofilm qui s'est développé sur une surface en acier sur une période de 8 semaines. <sup>37</sup> .....	20
<b>Figure 8: Système de traitement d'eaux usées.</b> Biofilm Carrier Lotus TM AquaCELL TM, un réacteur à biofilms lit mobile (MBBR). ....	20
<b>Figure 9: Cycle de vie des biofilms.</b> 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. ( <a href="http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html">Http://www.biofilm.montana.edu/biofilm-basics/what_are_biofilms.html</a> )....	21
<b>Figure 10: Hétérogénéité chimique dans le biofilm.</b> A, B, C : Trois modèles qualitativement distincts d'hétérogénéité chimique apparaissent dans les biofilms. (A) : Profil de la concentration d'un substrat consommé dans le biofilm et qui diminue avec la profondeur. (B) : Profil de la concentration d'un produit métabolique qui est plus concentré à l'intérieur du biofilm. (C) : Profil de la concentration d'un intermédiaire métabolique qui est à la fois consommé et produit dans le biofilm. D : différence entre le mode biofilm et le mode planctonique. D-a : Biofilm précoce mince (disponibilité de substrat et d'O <sub>2</sub> ) et D-b,c,d : Biofilm mature (b : disponibilité de substrat et de l'O <sub>2</sub> . c : disponibilité du substrat, mais pas d'O <sub>2</sub> . d : ni substrat ni O <sub>2</sub> ). D-e : Culture en phase exponentielle (disponibilité du substrat et d'O <sub>2</sub> ). D-f : Culture en phase stationnaire (le substrat peut être épuisé, mais l'O <sub>2</sub> présent). <sup>61</sup> . 26	
<b>Figure 11: Résumé graphique des propriétés liées au mode de vie biofilm<sup>63</sup>.</b> Elles façonnent les hétérogénéités dans les biofilms multi-espèces. L'écologie des communautés de biofilms composées de quelques à de nombreuses espèces est complexe et les diverses activités et processus sont souvent liés, s'affectant mutuellement à travers l'espace et les générations. Des hétérogénéités sont créées et influencées par le développement de la communauté. Des niches et des distributions spatiales distinctes de cellules se développent et sont soutenues par des gradients et la formation de matrice. La façon dont les membres de la communauté interagissent dépend donc largement de la localisation spatiale dans la structure du biofilm. La figure met en évidence l'hétérogénéité des biofilms multi-espèces et une	



sélection des multiples facteurs qui peuvent compliquer l'analyse des communautés de biofilms..... 28

**Figure 12: Illustration des interactions interspécifiques dans les biofilms multi-espèces<sup>64</sup>.**

En haut à gauche : co-métabolisme ou génération de niche où une espèce bactérienne (cellules bleues) produit ou élimine des substrats (zone bleue) permettant la croissance d'une autre espèce (cellules rouges). En bas à gauche : co-agrégation où une fixation spécifique entre cellules d'espèces différentes (cellules bleues et rouges) se produit par le biais de composants spécifiques associés à la surface (jaunes et roses). En haut à droite : transfert horizontal de gènes (HGT ; conjugaison) où l'ADN plasmidique (cercles blancs) est transféré d'une espèce (cellules rouges) à une autre (cellules bleues) via les pili conjugatifs (lignes rouges reliant les cellules bleues et rouges). En bas à droite : détection de molécules du quorum sensing par communication intraspécifique [cellules rouges, composés oranges de N-acyl homosérine lactone (AHL)] et interspécifique (cellules bleues et vertes, composés cyanosyl borate diester) via des composés diffusibles. Les signaux de communication intraspécifiques (cellules rouges, composés orange) peuvent également atteindre et affecter les cellules d'autres espèces (bleues). Les cellules jaunes, cyan et violettes ne sont pas affectées par les interactions..... 30

**Figure 13: Diagramme de Jablonski simplifié..... 35**

**Figure 14: Présentation FLIM des organoïdes tumoraux en 3D<sup>100</sup>.**

A : Un contrôle présentant des cellules tumorales non traitées par chimiothérapie (à gauche) ainsi que le temps de vie de fluorescence du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate NAD(P)H (à droite). B : cellules tumorales traitées par chimiothérapie (à gauche). Le temps de vie ( $\tau$ ) (à droite) du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate NAD(P)H endogène est sensible à la réponse métabolique à la chimiothérapie dans les organoïdes de cancer du pancréas.  $\tau$  est calculé à partir de deux déclin exponentiels des durées de vie des protéines de NAD(P)H. Barre d'échelle =  $50\mu\text{m}$ <sup>102</sup>.  $\tau$  est présenté avec un code couleur allant du bleu (0,7ns) au rouge(1,3ns)..... 37

**Figure 15: Image de microscopie électronique à balayage du biofilm à quatre espèces à t égale 72 h<sup>5</sup>.**

Les quatre espèces sont indiquées par des flèches dans la figure. (1) *Rhodocyclus sp.*, (2) *Pseudomonas fluorescens*, (3) *Kocuria varians*, (4) *Bacillus Cereus*. L'échelle est indiquée en bas. .... 38

**Figure 16: Transition spatiale dans le biofilm.**

A et B : Figures de demi-canaux dans le sens de la largeur après une croissance de 4h (A) et 37h (B). .... 39

**Figure 17: Image de microscopie confocale des 4 espèces du biofilm.**

En fluorescence, (A) : *Bacillus thuringiensis* exprimant FAST et (B) : *Pseudomonas fluorescens* exprimant m-Cherry. En lumière transmise, (C) : *Kocuria Salsicia* et (D) : *Rhodocyclus sp.* Grossissement 100x..... 44

**Figure 18: Test de motilité.**

La souche non motile (à gauche) et la motile (à droite). Les cellules ont été inoculées dans un Agar semi-solide 1.25% wt/vol après 24h de croissance en milieu MB à une concentration de  $4 \times 10^8$  cellule/ml. .... 46

**Figure 19: microfabrication et Dimensions d'un canal millifluidique. .... 49**

**Figure 20: Etapes de préparation des canaux millifluidiques en PDMS. .... 50**

**Figure 21: Représentation schématique du principe des techniques de mesure de la**

**fluorescence résolue dans le temps.** En haut : Une impulsion d'excitation appliquée à un échantillon fluorescent (cylindre bleu) et cet échantillon émet une fluorescence avec une décroissance temporelle exponentielle  $I(t)$ . En bas : On applique une excitation à modulation sinusoïdale et on mesure l'émission sinusoïdale résultante. .... 51

**Figure 22: Illustration de la modulation et du déphasage dans la mesure fréquentielle.**

La ligne bleue représente la forme d'onde d'excitation avec une intensité moyenne du signal A et une amplitude B. La ligne rouge représente la forme d'onde de l'émission. En raison de la durée de vie finie de l'état excité, la forme d'onde d'émission est déphasée ( $\varphi$ ) et démodulée,

c'est-à-dire que l'amplitude de la forme d'onde d'émission ( $\beta$ ) divisée par le signal moyen ( $\alpha$ ) est réduite par rapport à la modulation de l'excitation (B/A). .....	52
<b>Figure 23: Dispositif expérimental.</b> A : Excitation (a : Filtre spatial), B : Échantillon et visualisation, C : Contrôle de température et d'O <sub>2</sub> , D : Partie électronique. ....	54
<b>Figure 24: Compartiment électronique du dispositif.</b> Connexions électroniques permettant la modulation des signaux et l'acquisition de la mesure FLIM. ....	56
<b>Figure 25: Avantage de l'utilisation d'une nappe laser</b> : illumination d'un plan d'intérêt <sup>113</sup> . .....	58
<b>Figure 26: Montage optique.</b> Nappe Laser passant par un barreau d'uranyle (désignée par une flèche orange trait discontinu) obtenue par le passage du laser à travers d'un filtre spatial (encadré sur la figure) ensuite une lentille cylindrique fixée dans un tube optique (désignée sur la figure par une flèche orange, trait continu). ....	59
<b>Figure 27: Illumination par nappe laser.</b> Le canal millifluidique en PDMS est illuminé par le côté. ....	59
<b>Figure 28: Méthode de la Largeur à mi-hauteur.</b> Exemples de profil d'intensité de deux billes en fonction de la position de la nappe en z à leurs positions (x, y). Les données expérimentales sont présentées par des points - - et -x- bleus. Les ajustements sont présentés par le trait continu rose. La largeur à mi-hauteur est présentée par la double flèche orange... 60	60
<b>Figure 29: Calibration.</b> Ajustement des données $1/\tau$ en fonction de [O <sub>2</sub> ] selon un modèle linéaire (trait noir). Les points de la droite sont des données expérimentales obtenues sur différents jours d'expériences. ....	63
<b>Figure 30: Dispositif expérimental pour l'étude des échanges d'O<sub>2</sub> entre la solution dans une cuve ouverte et l'atmosphère ambiante.</b> .....	67
<b>Figure 31: Cinétique de variation descendante d'O<sub>2</sub>.</b> La concentration d'oxygène en fonction de temps mesurée dans l'enceinte par le capteur (trait discontinu) et dans la solution par l'acquisition des images de temps de vie de fluorescence des MiRu (trait continu). .....	68
Figure 32: Exemple d'ajustement des données selon les modèles cinétiques présentés ci-dessus. Variation de 21% (C <sub>0</sub> ) à 10% (C <sub>1</sub> ). Données expérimentales d'oxygène environnemental dans l'enceinte réduite données par le détecteur (en points) ainsi que celles d'oxygène dans la solution, rapportées par les micelles de ruthénium (en symbole x). Les ajustements correspondants selon le modèle cinétique de premier ordre sont présentés par un trait continu violet. ....	69
<b>Figure 33: Cinétique d'établissement de l'oxygène dans une configuration simple (cuve ouverte) à deux hauteurs de mesure différentes L1 et L2.</b> .....	72
<b>Figure 34: Détermination des constantes de dissolution de l'oxygène k<sub>on</sub> (7%-21%) dans la solution de MiRu dans les deux cas de mesure L1 et L2.</b> Les données expérimentales sont ajustées selon les modèles cinétiques de premier ordre (encart3). Elles sont présentées par des points - - pour les mesures en L1 et des carreaux - - pour L2. Le temps d'équilibration estimé est désigné par le trait discontinu. Les ajustements sont présentés par le trait continu violet. ....	73
<b>Figure 35: Cinétique de variation de l'O<sub>2</sub> dans un canal millifluidique en PDMS.</b> A : Variation ascendante de 1% à 21%. B : Variation descendante de 10% à 3% .....	75
<b>Figure 36: Échange d'oxygène à travers le PDMS</b> .....	76
<b>Figure 37: Effet du flux sur la concentration d'O<sub>2</sub> dans le canal.</b> Les courbes montrent deux environnements contrôlés en oxygène à 10% (—■—) et à 3% (—•—). Le flux est lancé à t=0, la ligne tiretée indique le moment de l'arrêt du flux (t=18 min). Toutes les autres conditions sont identiques à la figure35. ....	77
<b>Figure 38: Échanges d'O<sub>2</sub>.</b> Ce schéma décrit l'arrangement des différentes enceintes avec les échanges gazeux possibles. Les échanges ont lieu suivant le gradient d'O <sub>2</sub> entre le canal et le patch de PDMS (flèches 1 et 2) et entre le patch de PDMS et l'air ambiant (flèches 3 et 4). Le	

symbole (•—•) indique l'absence d'échange entre l'enceinte thermique et l'enceinte régulée en O<sub>2</sub>. La concentration en O<sub>2</sub> est représentée par un code couleur du bleu au rouge 0%-21%. La situation représentée est celle d'une enceinte réduite régulée à 3% au moment où un flux de milieu, en principe à 21%, est introduit dans le canal. Les échanges actifs seront ici les flux sortants (2) et (3). Nos résultats montrent que les échanges 3 et 4 sont les plus lents. .... 79

**Figure 39: Exemple d'une cartographie d'O<sub>2</sub> au sein du biofilm 4S dans un canal millifluidique de 1mm de largeur et 30mm de longueur.** Les concentrations en O<sub>2</sub> dans cette figure sont codées suivant l'échelle de couleurs figurant à droite. Chaque pixel est une concentration locale en O<sub>2</sub>. (La taille de notre image est de 1.6mm x 1.6mm). On distingue nettement l'empreinte du canal de 1mm de large. La longueur imagée est de 1.6mm. Cette image correspond à un temps de croissance  $\Delta t = 19h$  et un plan  $z = 4\mu m$ . .... 81

**Figure 40: Timeline du déroulement de l'expérience.** ..... 82

**Figure 41: Représentation 3D de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> au sein du biofilm 4S.** La concentration en O<sub>2</sub> est représentée par un code couleur allant du bleu vers le rouge figurant sur le côté à droite. .... 83

**Figure 42: Distribution spatiale latérale de l'O<sub>2</sub> en absence de biofilm.** Concentration d'O<sub>2</sub> en fonction de la largeur du canal  $x$ , en absence de biofilm à 3h (image du gauche) et 21h (image de droite). Chaque courbe représente un  $z$  différent dans la hauteur du canal.  $z$  varie de 0 (lamelle de verre) à 1mm (haut du canal) ; les hauteurs sont données par le code couleur figurant sur les barres de droite. Pour chaque  $x$ , on moyenne la valeur sur les 200 pixels centraux en  $y$ . Les mesures sont faites avec MiRu seule selon la même alternance de MiRu et de MB qu'en présence de biofilm, chaque deux heures et pendant 24h. .... 84

**Figure 43: Distribution spatiale latérale de l'O<sub>2</sub> en présence du biofilm 4S.** Concentration de l'O<sub>2</sub> en fonction de la largeur du canal  $x$  à différents stades de développement du biofilm, 3h, 17h 27h et 47h. autres conditions identiques à Fig.42. .... 85

**Figure 44: Amplitude du gradient latéral d'O<sub>2</sub> ( $\Delta[O_2]_x = R1 - R2$ ) en fonction du temps de croissance du biofilm 4S.** Les courbes correspondent à 10 positions en  $z$  selon le code couleur indiqué par la barre latérale. .... 86

**Figure 45: Concentration moyenne en O<sub>2</sub> sur tout le canal.** La concentration en O<sub>2</sub> est moyennée sur tous les  $z$  (10 $z$ ), tous les  $x$  (1024 pixels) et les 200 pixels du centre en  $y$ . .... 86

**Figure 46: Profondeur relative du gradient d'O<sub>2</sub> ( $\Delta[O_2]_{xr} = R1 - R2R1$ ) en fonction du temps de croissance du biofilm 4S.** Autres informations telles qu'en Fig. 44. .... 87

**Figure 47: Coïncidence temporelle du pic de la croissance moyenne du biofilm (à la base du canal) et la diminution du niveau d'O<sub>2</sub> dans le canal en fonction du temps.** (A) Cinétique de croissance moyenne du biofilm dans le canal en fonction du temps de la croissance du biofilm, reportée par  $\mu OD$  calculée sur la base des images du biofilm en lumière transmise (B) Courbe dérivée de croissance du biofilm montrée dans le panneau A. (C) Image de distribution de l'O<sub>2</sub> au sein du biofilm dans le canal, montrant un volume de mesure ( $x, y, z$ ). (D) Cinétique de variation de l'O<sub>2</sub> au sein du biofilm dans le canal présenté par le volume montré dans le panneau C. Les flèches rouges montrent la coïncidence entre la phase de croissance rapide du biofilm donné par la courbe dérivée et le point de début de diminution du niveau d'O<sub>2</sub> en  $h$ . .... 88

**Figure 48: Coïncidence temporelle du pic de détachement de *Pf* et de l'amplitude maximale du gradient d'O<sub>2</sub> en  $x$ .** (A) Images de microscopie de fluorescence (m-Cherry Exc 555 DM Em) dans la phase de croissance optimale où les *Pf* forment des microcolonies attachées à la surface (image du haut, numérotée 1) et en fin de détachement (image du bas numérotée 2) ; objectif 20x ; Dimensions de l'image 40 $\mu m$ x40 $\mu m$ . (B) Courbe de croissance de *Pf* dans le biofilm 4S obtenue sur la base de la fluorescence de m-Cherry. Les numéros 1 et 2 montrent les temps d'enregistrement des images du panneau A. (C) donne l'amplitude du gradient d'O<sub>2</sub> soit en fonction du temps et (D) est la courbe dérivée de la courbe de croissance

montrée panneau C. Les flèches rouges montrent la coïncidence entre le point de gradient d'O <sub>2</sub> en x maximum et le maximum du détachement de Pf à t=17h.....	89
<b>Figure 49 : Transition spatiale du Biofilm</b> présentée par des images du biofilm en lumière transmise à 10h, 25h,30h, 35h et 40h de sa croissance. ....	90
<b>Figure 50 : Asymétrie verticale de la distribution de l'O<sub>2</sub> qui varie dans le temps montrant une relocalisation verticale du biofilm.</b> (A) Concentration d'O <sub>2</sub> en fonction de la hauteur dans le canal z pour chaque temps rouge $\Delta t=3h$ , rose $\Delta t=15h$ et violet $\Delta t=47h$ . (B) le niveau moyen d'O <sub>2</sub> dans la couche supérieure (présenté en orange) (à partir de 650 $\mu m$ de la lamelle) et de la couche basse (200 $\mu m$ près de la lamelle) (présentée en bleu) en fonction du temps. ....	91
<b>Figure 51: Amplitude du gradient d'O<sub>2</sub> en x en fonction de z.</b> (A) : tous les temps de la croissance du biofilm $\Delta t$ 1h jusqu'à $\Delta t$ 49h, $t_n=(2n-1)$ heures. Les amplitudes en x en fonction de z ont été regroupées en 3 groupes de temps selon leur similarité. (B) : L'amplitude en x en fonction de z à $\Delta t=1h$ jusqu'à 9h. (C) : L'amplitude en x en fonction de z à $\Delta t=13h$ jusqu'à 29h. (D) : L'amplitude en x en fonction de z à $\Delta t=31h$ jusqu'à 49h.....	92
<b>Figure 52: Description qualitative du principe</b> de la combinaison des processus de consommation, diffusion advection dans le canal en présence du biofilm. (A) Consommation faible de l'O <sub>2</sub> par les bactéries à l'initiation du biofilm. O <sub>2</sub> (rouge foncé) homogène dans le canal. (B) Des gradients d'O <sub>2</sub> significatifs apparaissent après ~12h de croissance de biofilm. (C)En fin de croissance, environnement anoxique et le nombre de Pf attendus peut consommer la totalité de l'O <sub>2</sub> dans le canal. ....	94
<b>Figure 53: Moyenne de la consommation individuelle d'O<sub>2</sub> de chaque espèce des bactéries.</b> Bactéries en suspension en MB à 30°. Expériences en collaboration avec Carine Douarche .....	95
<b>Figure 54: Représentation 3D de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub></b> dans le canal en présence d'un biofilm mono-espèce de <i>Bt</i> (A) et en présence des micelles de ruthénium seules dans le canal (B) Les distributions présentées sur les deux panneaux A et B sont aux mêmes temps : $\Delta t$ 3h, $\Delta t$ 19h et $\Delta t$ 49h. Chaque couche est une pile en z présentée selon x et correspondant à un temps t, un jeu de couleur précisant les concentrations en O <sub>2</sub> allant du bleu (0%) au rouge (25%). ....	96
<b>Figure 55: Représentation 3D de la distribution spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> dans au sein d'un biofilm mono espèce</b> de <i>pf</i> à $\Delta t$ 3h $\Delta t$ 19h $\Delta t$ 49h (A) VS celle déterminée au sein du biofilm 4S (B), aux mêmes temps t et avec les mêmes échelles et conditions. Chaque couche est une pile de cartographie en z selon x à un temps t. les couleurs représentent les valeurs des concentrations en O <sub>2</sub> allant du bleu (0%) jusqu'au rouge (25%). ....	97
<b>Figure 56 : Schéma simplifié des invasions du biofilm à différents stades de son développement.</b> .....	101
<b>Figure 57: La motilité retarde la formation du biofilm.</b> A) Cinétiques de croissance d' <i>E. coli</i> en mono-biofilm rapportées par la fluorescence (Mot+ en vert clair et Mot- en vert foncé). B) Logarithme de l'intensité de la fluorescence d' <i>E. coli</i> dans le canal millifluidique pour Mot <sup>+</sup> (vert clair) et Mot <sup>-</sup> (vert foncé) en fonction du temps. Le logarithme est calculé à partir de l'intensité moyenne de 3 positions distinctes dans au moins 2 canaux différents. Le biofilm se développe sous un flux de 1ml/h de milieu, à 30°C. Les lignes pointillées soulignent la partie linéaire de la croissance. ....	102
<b>Figure 58: Colonisation de surface d'<i>E. coli</i> motile et non motile en présence de co-colonisateurs.</b> Fluorescence des <i>E. coli</i> motiles (en cyan clair) et non motiles (en cyan foncé) (A) dans le biofilm formé en présence des quatre co-colonisateurs <i>Bt</i> , <i>Pf</i> , <i>Ks</i> et <i>Rh</i> . L'affichage logarithmique (B) met en évidence deux phases distinctes dans le développement d' <i>E. coli</i> dans le biofilm composite multi-espèces. Les lignes pointillées soulignent le niveau du plateau de la première phase et le taux de croissance de la deuxième phase. ....	103

<b>Figure 59: <i>E. coli</i> ne parvient pas à coloniser la surface avec un biofilm multi-espèces préétabli.</b> L'intensité de la fluorescence FAST - qui signale la formation du biofilm d' <i>E. coli</i> - est montrée sur les 40 heures d'injection d' <i>E. coli</i> dans le canal où une communauté 4S s'est établie pour 0h, 8h, 20h et 35h du bas (0h) au haut (35h) du panneau A pour les cellules motiles et du panneau B pour les cellules non motiles. La flèche verticale en pointillés indique le moment de l'injection et la flèche rouge indique le moment t=40h après l'injection. Seule la situation de co-colonisation correspondant à l'injection au temps t=0 présente une colonisation détectable par <i>E. coli</i> . .....	104
<b>Figure 60: FAST</b> Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag <sup>127</sup> .....	148
<b>Figure 61: Analyse des niveaux de fluorescence des clones <i>E. coli</i> par cytométrie en flux.</b> La première ligne <i>E. coli</i> exprimant la protéine FAST. Deuxième ligne <i>E. coli</i> exprimant la fusion m-Cherry-FAST. Et dernière ligne <i>E. coli</i> exprimant GFP. La fluorescence est enregistrée en FL1 et les mêmes paramètres (nombres d'évènements, etc.) sont appliqués pour les trois mesures. ....	150
<b>Figure 62: La méthode GIBSON ASSEMBLY.</b> Recombinaison isotherme in vitro en une étape. Deux fragments d'ADN adjacents (magenta et vert) partageant des chevauchements de séquence terminale (noir) ont été joints en une molécule scellée de manière covalente dans une réaction isotherme en une étape. L'exonucléase T5 a éliminé les nucléotides des extrémités 5' des molécules d'ADN double brin, les 'overhangs' d'ADN simple brin complémentaires se sont hybridés, l'ADN polymérase « Phusion » a rempli les espaces et l'ADN ligase Taq a scellé les entailles. L'exonucléase T5 est thermolabile et est inactivée pendant l'incubation à 50 °C. ....	151
<b>Figure 63: Analyse de fluorescence par cytométrie en flux.</b> Étude de la fluorescence du clone transformé par le plasmide contenant FAST issu de la construction par GIBSON Assembly. Les résultats présentés sont observés en FL1 (figure de droite) avec l'ajout du colorant. ....	152
<b>Figure 64: Niveau de fluorescence détectée par cytométrie en flux du clone <i>E. coli</i> FAST transformée selon la méthode de GIBSON Assembly après quelques repiquages.</b> .....	153
<b>Figure 65: Étude de la fluorescence de <i>P.fluorescens</i> Far-Red par cytométrie en flux.</b> Fluorescence en FL1 (1 <sup>ère</sup> colonne), FL2 (2 <sup>ème</sup> colonne) et FL3 (3 <sup>ème</sup> colonne) respectivement. ....	154

## Table des tableaux

<b>Tableau 1: Tableau récapitulatif de la taxonomie et caractéristiques des espèces utilisées dans ce travail. (<i>Escherichia coli</i> et de la communauté multi-espèces 4S).....</b>	<b>43</b>
<b>Tableau 2:Tableau récapitulatif des souches d'<i>Escherichia coli</i> et des espèces constituant la communauté 4S. Les souches originelles, les plasmides et les protéines d'intérêt qui leur sont associées. *<sup>1</sup> : Insertion chromosomique via le plasmide Prn5101-Psar-Yfast. *<sup>2</sup> : Insertion chromosomique (Lambda pR-mut3). .....</b>	<b>45</b>
<b>Tableau 3:Tableau récapitulatif des antibiotiques correspondants aux espèces utilisées</b>	<b>47</b>
<b>Tableau 4:Constantes d'extraction « <math>k_{off}</math> » et de dissolution « <math>k_{on}</math> » de l'oxygène dans l'enceinte et dans la solution en cuve ouverte. Les valeurs entre parenthèses donnent l'intervalle de confiance sur k. ....</b>	<b>71</b>
<b>Tableau 5:Temps de diffusion et de mise à l'équilibre de l'oxygène dans la solution à deux hauteurs de mesure par rapport à l'interface air-liquide L1 et L2.....</b>	<b>74</b>
<b>Tableau 6: Paramètres clés de la modélisation.....</b>	<b>94</b>

## **Résumé :**

### **Distribution spatio-temporelle de l'oxygène en biofilm bactérien multi-espèces**

Invisibles à l'œil nu, mais très présents, les micro-organismes font partie de tous les écosystèmes. Ces micro-organismes sont pour la plupart organisés en communautés multi-espèces complexes dites « biofilms ». Dans le cadre d'une Recherche visant à comprendre le processus de formation de ces communautés composites afin de dégager des lois générales de leur fonctionnement, mon travail de thèse est dédié à un modèle de biofilm multi-espèces simplifié (à 4 espèces), issu d'un biofilm naturel (industrie laitière). La caractérisation du développement de cette communauté adhérente menée dans un travail précédent au laboratoire a pu mettre en évidence la pertinence du modèle expérimental pour étudier un certain niveau de complexité dans des conditions bien contrôlées avec un développement du biofilm non monotone révélant l'existence de niches de population distinctes ainsi qu'une transition spatiale caractéristique. Ces éléments nous ont orientés vers la question de la dynamique de l'O<sub>2</sub> dans ce système qui occupe la place centrale de mon travail de thèse. J'ai également étudié une perturbation spatiale de ce modèle par l'introduction d'une cinquième espèce.

Pendant mon travail de thèse, j'ai entrepris d'établir la cartographie spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub> au sein du biofilm à 4 espèces en développement dans un canal microfabriqué dans du PDMS. J'ai donc mis au point une expérience originale pour cartographier *in situ* et en temps réel l'évolution du niveau d'oxygène en utilisant une sonde fluorescente constituée d'un complexe de Ruthénium encapsulé dans des micelles lipidiques. Afin d'assurer une résolution spatiale suffisante dans un mode non invasif, j'ai installé une excitation à nappe laser sur un microscope permettant l'acquisition d'images de temps de vie mesurés en modulation (détaillé dans le chapitre 2).

Armée de cette technique, j'ai d'abord caractérisé la dynamique de l'O<sub>2</sub> dans les canaux millifluidiques sous flux en absence du biofilm afin de dégager les temps de réponse caractéristiques de la circulation de l'oxygène dans le dispositif (Chapitre 3). J'ai ensuite déterminé la cartographie spatio-temporelle 3D de l'O<sub>2</sub> lors du développement du biofilm. J'ai pu ainsi démontrer l'émergence des gradients d'O<sub>2</sub> que j'ai mis en relation avec les événements clés du développement phénotypique du biofilm, pour conclure sur le rôle crucial de l'O<sub>2</sub> dans le développement de ce modèle. (Chapitre 4). L'équilibre de l'oxygène est apparu ici comme un facteur majeur de la structuration de la communauté multi-espèce dans une boucle de

rétroaction où le développement de la communauté altère la distribution de l'O<sub>2</sub> qui altère le développement de la communauté.

J'ai aussi étudié la capacité d'une cinquième espèce à coloniser le biofilm 4-espèces à différents stades de son développement. J'ai trouvé que l'installation de la cinquième espèce est très limitée lorsque le biofilm 4S préexiste dans le canal et qu'il détermine le schéma d'installation de la cinquième espèce en mode de co-colonisation lorsque toutes les espèces sont injectées en même temps. Ces résultats dont le détail figure dans un article scientifique ajouté au chapitre 5 seront discutés à la lumière des résultats de la cartographie spatio-temporelle de l'O<sub>2</sub>.

Enfin, je conclurai sur l'importance majeure des propriétés de l'environnement et de l'équilibre de l'O<sub>2</sub> dans les mécanismes de formation des biofilms et donnerai des perspectives pour en approfondir la compréhension et le lien aux propriétés biologiques.

Mots clés : [Oxygène, biofilm bactérien, multi-espèces, micelles de ruthénium, distribution spatiale 3D]



## **Spatiotemporal distribution of oxygen in a multispecies bacterial biofilm**

### **Abstract:**

Invisible to the naked eye but very present, microorganisms are part of all ecosystems. These microorganisms are mostly organized in complex multispecies communities called "biofilms". Within the framework of a research aiming at understanding the formation process of these composite communities in order to derive general laws of their functioning, my thesis work is dedicated to a simplified multispecies biofilm model (4 species), resulting from a natural biofilm (dairy industry). The characterization of the development of this adherent community carried out in a previous work in the laboratory was able to highlight the relevance of the experimental model to study a certain level of complexity under well-controlled conditions with a non-monotonic development of the biofilm revealing the existence of distinct population niches as well as a characteristic spatial transition. These elements directed us towards the question of O<sub>2</sub> dynamics in this system which is the focus of my thesis work. I also studied a spatial perturbation of this model by the introduction of a fifth species.

During my thesis work, I set out to establish the spatiotemporal mapping of O<sub>2</sub> within the developing 4-species biofilm in a microfabricated channel in PDMS. I therefore developed an original experiment to map in situ and in real time the evolution of the oxygen level using a fluorescent probe consisting of a Ruthenium complex encapsulated in lipid micelles. In order to ensure a sufficient spatial resolution in a non-invasive mode, I installed a laser sheet excitation on a microscope allowing the acquisition of images of lifetimes measured in modulation (detailed in chapter 2).

Armed with this technique, I first characterized the O<sub>2</sub> dynamics in the milli-fluidic channels under flow in the absence of the biofilm in order to derive characteristic response times of oxygen flow in the device (Chapter 3). I then determined the 3D spatiotemporal mapping of O<sub>2</sub> during biofilm development. I was able to demonstrate the emergence of O<sub>2</sub> gradients that I related to key events in the phenotypic development of the biofilm, to conclude on the crucial role of O<sub>2</sub> in the development of this model. (Chapter 4). Oxygen balance emerged here as a major factor in multispecies community structuring in a feedback loop where community development alters O<sub>2</sub> distribution which alters community development.

I also studied the ability of a fifth species to colonize the 4-species biofilm at different stages of development. I found that the installation of the fifth species is very limited when the

4S biofilm pre-exists in the channel and that it determines the installation pattern of the fifth species in co-colonization mode when all species are injected at the same time. These results, which are detailed in a scientific paper added to Chapter 5, will be discussed in light of the spatiotemporal O<sub>2</sub> mapping results.

Finally, I will conclude on the major importance of environmental properties and O<sub>2</sub> balance in the mechanisms of biofilm formation and give perspectives for further understanding and linkage to biological properties.

Keywords: [Oxygen, bacterial biofilm, multispecies, ruthenium micelles, 3D spatial distribution]