

de Toulouse

THÈSE

### En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées Discipline ou spécialité : Génie des Procédés et de l'Environnement

> Présentée et soutenue par Sandra BEAUFORT Le 24 juin 2010

**Titre :** Développement d'outils et de méthodologies pour l'étude de l'organisation et de la localisation *in vivo* de micro-organismes dans des structures biologiques complexes

### JURY

 BLOCK Jean-Claude, Professeur, Nancy Université, Directeur LCPME (Rapporteur) CARRERE Hélène, Directeur de Recherche, LBE-INRA, Narbonne (Rapporteur) ROLS Jean-Luc, Professeur, Université Paul Sabatier (Membre)
 BOUCHEZ Théodore, Ingénieur de Recherche, Cemagref, Antony (Membre) ALFENORE Sandrine, Maître de Conférences, INSA Toulouse (Membre) LAFFORGUE Christine, Maître de Conférences, INSA Toulouse (Membre)
 JAUNEAU Alain, Ingénieur de Recherche, IFR40, Auzeville-Tolosane (Membre invité)
 LEFLAIVE Joséphine, Maître de Conférences, Université Paul Sabatier, Toulouse (Membre invitée)

Ecole doctorale : Mécanique, Energétique, Génie civil, Procédés Unité de recherche : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés Directeur(s) de Thèse : Sandrine ALFENORE et Christine LAFFORGUE Rapporteurs : Jean-Claude BLOCK et Hélène CARRERE



Remerciements :

Quelques lignes pour résumer les remerciements de trois années de thèse...

L'exercice n'est pas simple mais il est nécessaire pour exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont pu participer de près ou de loin à ce travail

Je tiens tout d'abord à remercier Nick LINDLEY de m'avoir accueillie au sein du laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, qui à mon arrivée et avant une fusion, était constitué de deux laboratoires, le laboratoire de Biotechnologie-Bioprocédés et le laboratoire d'Ingénierie des Procédés de l'Environnement.

Je tiens également à remercier Hélène CARRERE et Jean-Claude BLOCK d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire, et pour la discussion riche et intéressante lors de la soutenance. Je n'oublie pas les efforts fournis par l'une, pour lire et rapporter sur ce travail en un temps record, et pour l'autre avoir dû retraverser la France en voiture de nuit après la soutenance un jour de grève...

Je remercie également tous les autres membres du jury, Théodore BOUCHEZ, Martine MIETTON-PEUCHOT, Joséphine LEFLAIVE, Alain JAUNEAU, ainsi que Jean-Luc ROLLS, président de jury, pour avoir contribué à une discussion riche et passionnante sur des aspects scientifiques, pluridisciplinaires et sur les perspectives de mon travail.

Ce travail n'aurait bien sûr pas pu aboutir sans la présence de mes deux directrices de thèse, Sandrine ALFENORE et Christine LAFFORGUE, pour lesquelles ces quelques lignes ne suffiront pas pour exprimer mes remerciements, aussi bien sur l'aspect scientifique que sur l'aspect humain... Merci pour le soutien que vous m'avez pu m'apporter sur ces années de thèse, me permettant de continuer à aller de l'avant.

Je tiens également à remercier les différentes personnes avec qui j'ai pu travailler ou échanger au laboratoire.

Tout d'abord Nathalie pour ton aide précieuse et rigoureuse dans mes préparations de solutions diverses et variées... mes microorganismes inclinent leurs flagelles devant toi (pour ceux qui en ont...). Au-delà de l'aspect technique, un grand merci pour ton soutien et ton amitié...

Je tiens également à remercier Christophe sans qui ma petite cellule de filtration n'aurait pas résisté, ou tout du moins n'aurait pas pu être réparée si vite...

Merci aussi à Sébastien et Christian, pour leurs conseils à une novice complète en biologie moléculaire. Merci à Myriam pour son accompagnement à la mise au point de nouvelle méthodologie, qui nous a valu un petit séjour Cémagrefien en région parisienne... Merci également aux personnes de l'IFR40 de l'INRA, notamment Alain JAUNEAU et Cécile POUZET, responsables des microscopes confocaux, pour leur disponibilité lors de mes nombreux séjours parmi eux...

Merci enfin à toutes les personnes des différentes équipes de recherche auxquelles j'ai appartenu pour leur accueil et leurs conseils scientifiques, qu'elles soient permanentes ou de passage, les anciens doctorants/post-doctorants comme les plus nouveaux...

Un clin d'œil particulier à mes deux colocs' Jan et Romain, pour l'année de collocation, riche en journées, week-end et soirées, bref, une année riche en souvenirs : aaahhhhh LA COLOC !!... bon d'accord je ne dis rien ici... Merci aussi à Julien, colocataire par intérim, avec son humour si... particulier...

Un merci également à Laurent, qui a su me supporter (dans tout les sens du terme) pendant les différentes périodes de la thèse ...

Je termine cette page par un remerciement à ma famille, tout particulièrement à mes parents, à qui je dédie cette thèse. Merci pour votre soutien, pour la confiance que vous m'avez accordée dans la vie de tous les jours comme dans mon parcours étudiant, qui m'a fait visiter de nombreuses régions : Bourgogne, Lorraine, Nord-Pas-De Calais (avec un séjour de quelques mois en Belgique), et enfin Midi-Pyrénées...



## Sommaire

Sommaire	i
Liste des figures	vi
Liste des tableaux :	xi
Liste des abréviations	xiii
Introduction générale	1
Revue bibliographique	7
I - Caractérisation d'agrégats biologiques microbiens	9
1. Généralités	9
2. Structure globale : surface, épaisseur, porosité	
2.1. Etude de la surface	
2.2. Etude de l'épaisseur et de la porosité	14
2.3. Microscopies de fluorescence	
3. Structure locale : identification des souches présentes dans l'agrégat	
3.1. Méthodes classiques : culture sur milieu spécifique, galerie API, colorations	
3.2. Méthodes d'immunofluorescence	
3.3. Méthodes de chimiotaxonomie	
5.4. Empreintes moleculaires el sonaes moleculaires	
II - Micro-organismes autofluorescents	
1. Origine et propriétés des protéines fluorescentes.	
1.1. La protéine Gfp	
1.2. La protéine Rfp	
2. Intérêt et applications des protéines fluorescentes	44
2.1. Etude dynamique de l'expression des gènes en temps réel	44
2.2. Suivi dynamique du développement d'un biofilm mixte	45
3. Techniques dérivées de l'utilisation des protéines fluorescentes	
4. Limites/Contraintes des protéines fluorescentes	
4.1. Recouvrement des spectres	
4.2. Oligomérisation	
4.3. Rôle de l' $O_2$	47
5. Conclusion	
III-Données métaboliques et génétiques sur les micro-organismes hôtes modèles : <i>Escheric</i>	<i>hia coli</i> et
Saccharomyces cerevisiae pour l'expression des protéines fluorescentes	
1 Escheviatia coli	40
<u>1. Escherichiu Coll</u> 1.1. Généralités	<u></u>
1.2. Souches de E. coli recombinants	
2 Sacahanampiana canapinian	50
2. Saccharomyces cerevisiae 2.1. Généralités	<u></u>
2.2. Souches de S. cerevisiae recombinantes	
W 6 1 1 1 W 1 1 W 1	
IV - Conclusion de l'etude bibliographie	
Matériel et méthodes	59
I - Souches et méthodes de construction des micro-organismes autofluorescents	61
5	

1. Souches mises en œuvre	61
2. Construction de souches procaryotes Escherichia coli autofluorescentes	61
3. Construction d'une souche eucaryote Saccharomyces cerevisiae autofluorescente	62
II –Milieux de culture, suivi des cultures	62
1. Milieux de cultures	62
1.1. Saccharomyces cerevisiae	62
1.2. Escherichia coli	66
2. Mode de conduite des cultures	69
2.1. Cultures discontinues en fioles d'Erlenmeyer	69
2.2. Cultures discontinues en bioreacteurs instrumentes	69
3. Méthodes analytiques : suivis des cultures	71
3.1. Determination de la biomasse (turbidimetrie, masse seche)	/ I 72
3.3. Mesure de l'intensité de fluorescence	73
3.4. Traitement des données issues des cultures cellulaires	74
III - Marquage des cellules par des colorants	75
1. Détermination de l'activité ou de la viabilité cellulaire	75
1.1. Marquage au bleu de méthylène	75
1.2. Marquage à la FDA	76
1.3. Marquage à l'IP	76
2. Marquage global des cellules dans des agrégats à la Rhodamine B	77
IV - Méthodologie d'étude de l'effet de l'oxygène sur la protéine Gfp produite par la levure	
Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A pYGfp	77
1. Protéine Gfp extraite des cellules	77
2. Protéine Gfp intracellulaire	78
V - Dispositifs expérimentaux pour l'étude d'agrégats biologiques	79
1. Dépôts sous contrainte de pression contrôlée	
2 Génération de hiofilms	<u>81</u>
2.1. Dispositif	81
2.2. Analyse des coupons en polyéthylène	83
VI - Acquisition et traitement des images	83
1. Acquisition des images 2D	83
2. Acquisition des images 3D	84
3. Traitement et analyse d'images	84
Résultats Chapitre I : Aspects méthodologiques	87
I - Construction et caractérisation des souches autofluorescentes	89
1 Saccharonneas caravisiae sutofluorescentes	00
1.1. Construction de la souche eucarvote Saccharomyces cerevisiae autofluorescente	90 90
1.2. Cinétique de croissance de la souche Saccharomyces cerevisiae sauvage et de son recombinant	91
1.3. Production spontanée de pigment chez Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A	93
1.4. Etude de la sensibilite de la proteine Gfp a l'oxygene	97 s
cultures discontinues	103
2. Escherichia coli autofluorescentes	110
2.1. Construction des souches procaryotes Escherichia coli autofluorescentes	110

2.2. Cinétique de croissance de la souche Escherichia coli sauvage et de son recombinant 2.3 Caractérisation de l'expression de la protéine DsRed-express par Escherichia coli pDsRed-exp	112 ress
dans des cultures discontinues	115
3. Conclusion et perspectives	120
II - Observations microscopiques des micro-organismes fluorescents construits	122
1. Etude de systèmes modèles complexes en microscopie à épifluorescence 2D	123
1.1. Bloc-filtre FITC	125
1.2. Bloc-filtre Cy3	125
	125
2. Visualisation et distinction des différents micro-organismes fluorescents en microscopie confocale	<u> 127</u> 120
2.1. Systèmes complexes associant aujerentes bacteries	131
3. Couplage des micro-organismes auto-fluorescents avec d'autres marqueurs d'activité	132
3.1. Couplage FDA/micro-organismes fluorescents rouges	133
3.2. Couplage IP /micro-organismes fluorescents verts	134
3.3. Couplage Bleu de méthylène/micro-organismes fluorescents verts	135
4. Taux de marquage des micro-organismes	135
4.1. Escherichia coli	136
4.2. Saccharomyces cerevisiae	130
5. Conclusion	<u> 139</u>
III - Analyse d'images quantitative 2D/3D	140
1. Caractéristiques géométriques de l'agrégat ou du dépôt	141
2. Détermination du volume occupé par un groupe d'objets	142
<ul> <li>2.1. Détermination du ratio de population dans le cas d'un écosystème complexe</li> <li>2.2. Evaluation du taux de vide d'un agrégat</li> </ul>	143 147
3. Discussion sur la quantification d'agrégats biologiques par analyse d'images	148
IV- Contraintes, limites et optimisation	150
1. Limites, contraintes et optimisation liées à l'acquisition	151
1.1. Temps d'acquisition	151
1.2. Réglage du gain et de l'offset	151
2. Limites, contraintes et optimisations liées aux micro-organismes auto-fluorescents	152
2.1. Cas de métabolisme aérobie	152
2.2. Taux marquage levure	153
V – Discussion sur la construction et la caractérisation des souches recombinantes	154
VI- Conclusions et Perspectives	165
Résultats Chapitre II : Etude d'agrégats biologiques de type dépôts	167
I – Contexte, objectifs et conditions expérimentales	169
II - Etuda das caractáristiquas morphologiques at das propriétés das dépâts	170
1 - Etude des caracteristiques mor photogiques et des propriétés des dépois	172
2 Détermination du taux de vide des dénêts par analyse d'image	<u> 172</u> 170
2. Determination du laux de vide des dépois par analyse d'inlage	<u> 1/9</u> 10/
<u> </u>	<u> 104</u>
	193
5. Organisation des micro-organismes au sein de dépôts	197

III - Conclusion	209
Résultats Chapitre III : Etude d'agrégats biologiques de type biofilms	213
I - Contexte de l'étude	215
II - Culture continue	215
1. Première étape : développement du biofilm de levures : Coupons A et B	
2. Deuxième étape : développement du biofilm mixte levures-bactéries : Coupons C et D	223
3. Discussion	
III - Conclusion	235
Conclusion générale	237
Références bibliographiques	245
Annexes	

## Liste des figures

Figure 1 : Mise en œuvre des filtrations frontale et tangentielle (Bessière, 2005)
Figure 2 : Techniques d'observation de dépôts ou biofilms sur des membranes planes. Les
objectifs (Obj) peuvent être situés côté perméat (1), côté rétentat (2) ou sur le côté de la
membrane pour visualiser le profil de l'agrégat (3)
Figure 3 : Images de fibres creuses après 4h de filtration d'une suspension de levures à 0,1
g/L (Chang <i>et al.</i> , 2002)
Figure 4 : Principe de la trigonométrie laser
Figure 5 : Schéma des phénomènes de luminescence (Poujol, 2006)
Figure 6 : Diagramme de Jablonsky (Poujol, 2006)
Figure 7 : Détails d'un bloc-filtre concu par Chroma Technologies pour exciter et détecter la
protéine Gfp (Conchello & Litchman, 2005)
Figure 8 : Distribution spatiale de la fluorescence émise par de la fluorescéine dans un plan x-
z lors de l'excitation laser à 488 nm en microscopie confocale, et lors de l'excitation par des
pulses de lumière à 850 nm en microscopie biphotonique. Les lignes blanches indiquent le
plan focal (Rubart <i>et al.</i> , 2004)
Figure 9 : Stratégies de biologie moléculaire utilisées pour analyser des communautés
microbiennes à l'aide d'empreintes moléculaires (A) ou de sondes moléculaires (B) (Dabert <i>et</i>
$al_{2002}$ 32.
Figure 10 · Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans les techniques
d'empreintes moléculaires (Dabert <i>et al.</i> 2002)
Figure 11 · Etapes de traitement nécessaires pour l'identification et la visualisation de souches
marquées par la méthode FISH 37
Figure 12 · Vue du dessus de la méduse Aequoria victoria éclairée à la lumière du jour (à
gauche) et dans le noir lorsqu'elle exprime la Gfn (à droite) (Shimomura · 2009) 38
Figure 13 · Spectres d'absorption et d'émission des protéines fluorescentes les plus courantes
<u>39</u>
Figure 14 · Mécanisme de formation du chromophore de la protéine Gfp proposé par Cubitt <i>et</i>
<i>al.</i> 1995. (Figure tirée des travaux de Tsien <i>et al.</i> 1998)
Figure 15 : Structure tridimensionnelle d'un biofilm mixte en microscopie confocale. Les
images ci-dessus représentent une projection du biofilm âgé d'un jour (à gauche), de deux
jours (au milieu) et de cing jours (à droite) Tolker-Nielsen <i>et al.</i> , 2000 (a)
Figure 16 : Mécanisme de répression de l'opéron lactose (Borde & Boucher, 2005)
Figure 17 · Mécanisme d'induction de l'opéron lactose (Borde & Boucher 2005) 52
Figure 18 · Métabolismes oxydatif (à gauche) et fermentaire (à droite) rencontrés chez la
levure (Walker & Walker 1998) 53
Figure 19 · Capacité respiratoire limite de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (D'après Sonnleitnert &
Käpneli 1985)
Figure 20 · Schéma de la glycolyse et du cycle de Krebs chez Saccharomyces (Aldiguier
2006) 56
Figure 21 · Dispositif d'étude de l'impact de l'oxygène sur la protéine Gfn en solution 78
Figure 22 : Schéma en coune de la cellule de filtration concue nour l'étude dynamique des
dénôts 70
Figure 23 : Dispositif expérimental pour l'étude de l'impact de la pression sur un dépôt
hiologique
Figure 24 · Dispositif de mise en œuvre des cultures en mode continu 81
Figure 25 : Carte du plasmide nYGfn portant le gène codant pour la protéine fluorescente Gfn
<u>1 gare 25</u> . Carte du plusifilite par orp portant le gene couant pour la protente fluorescente Orp 01

Figure 26 : Courbes de croissance de la souche <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PJ69-4A ( <b>▲</b> ) et de
son recombinant Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A pYGfp (*) et de consommation du
glucose par la souche sauvage ( $\bullet$ ) et la souche recombinante ( $\blacksquare$ )
<u>Figure 27 :</u> Etapes menant à l'accumulation et la maturation du pigment rouge dans la vacuole
(Sharma <i>et al</i> , 2003)
<u>Figure 28 :</u> Images obtenues au microscope à épifluorescence à l'objectif X40, en
fluorescence avec le bloc-filtre Cy3 (a) et en lumière blanche (b), pour les milieux 1, 2 et 3.95
Figure 29 : Intensité de fluorescence spécifique en fonction de la concentration en adénine
dans le milieu. La droite en pointillés correspond au modèle linéaire, la courbe en trait plein
au modèle exponentiel
Figure 30 : Evolution de la pO2 ( ) et de l'intensité de fluorescence spécifique d'un d'extrait
protéique au cours du temps (•) soumis à un flux d'air (0,5 L/min)
Figure 31 : Cinétique d'évolution de la fluorescence dans l'extrait cellulaire
Figure 32 : Evolution de la pO2 ( ) et de l'intensité de fluorescence de levures entières
exprimant la Gfp au cours du temps (•) soumise à un flux d'air (0.5 L/min)
Figure 33 : Culture de la souche <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PJ69-4A pYGfp avec une pO <sub>2</sub>
régulée à 90% Evolutions temporelles des concentrations en biomasse ( $\bullet$ ) en glucose ( $\bullet$ ) en
éthanol ( <b>•</b> ) et de l'intensité de fluorescence ( <b>•</b> )
Figure 34 · Culture de la souche Saccharomyces cerevisiae PI69-4A nYGfn avec une nO
régulée à 1 % Evolutions temporelles des concentrations en biomasse ( $\bullet$ ) en glucose ( $\bullet$ ) en
éthanol ( <b>a</b> ) et de l'intensité de fluorescence ( <b>A</b> )
Figure 35 : Culture de la souche Saccharomycas caravisiaa $PI60-1A$ nVGfn avec une nO
régulée à 1 % puis augmentée à 50 % à 25h de culture (flèche noire). Evolutions temporelles
des concentrations en biomasse (•) en glucose (•) en éthanol (•) et de l'intensité de
flueresconce ( $\blacktriangle$ )
Figure 26 : Culture de la couche Sacchanomica convicia DIGO 4A pVC fo cuce une pO
<u>Figure 30</u> . Culture de la souche saccharomyces cerevisiae FJ09-4A p l'Olp avec une $pO_2$
regulee a 90 %. Evolutions temporenes des concentrations en etnanol ( $\blacksquare$ ) et de l'intensité de
The function of the function of the function $(\bullet)$ , et de l'agitation $(\bullet)$ , et de l'agitation $(\bullet)$ , 10/
<u>Figure 37</u> : Evolution temporelle de la fluorescence specifique Saccharomyces cerevisiae
PJ69-4A pY Grp cultivee avec une $pO_2$ regulee a 90 % ( $\blacktriangle$ ) et avec une $pO_2$ regulee a 1 %
puis 50 % a 25 h (▲)
Figure 38 : Carte du plasmide pDsRed-express, portant le gene codant pour la proteine
fluorescente DsRed-express (Clontech)
<u>Figure 39 :</u> Courbes de croissance de la souche <i>E. coli</i> BL21 (DE3) star ( $\blacktriangle$ ) et de son
recombinant <i>E. coli</i> BL21 (DE3) star pDsRed-express (*) et de consommation du lactose par
la souche sauvage (●) et la souche recombinante (■)
<u>Figure 40 :</u> Courbes de croissance de la souche <i>E. coli</i> BL21 (DE3) star ( $\blacktriangle$ ) et de son
recombinant <i>E. coli</i> BL21 (DE3) star pDsRed-express (*) et de production de pyruvate par la
souche sauvage (•) et la souche recombinante (•)
<u>Figure 41 :</u> Courbes représentant la vitesse de production de biomasse $r_x$ en fonction de la
vitesse de consommation du substrat $r_s$ pour la souche modifiée ( $\blacksquare$ ) et la souche sauvage ( $\bullet$ ).
Figure 42 : Logarithme de X/Xo pour la souche sauvage E. coli BL21 (DE3) star (▲) et pour
ses recombinants <i>E. coli</i> BL21 (DE3) star pDsRed-express (♦), <i>E. coli</i> BL21 (DE3) star
pAmCyan (•) et <i>E. coli</i> BL21 (DE3) star pZsYellow (•)
Figure 43 : Culture sur glucose d'Escherichia coli BL21 DE3 star pDsRed-express :
Evolution temporelle des concentrations en biomasse, (•), en glucose (•) et de l'intensité de
fluorescence ( )

Figure 44 : Culture sur lactose d'Escherichia coli BL21 DE3 star pDsRed-express : Evolution
temporelle des concentrations en biomasse (•), en lactose (•) et de l'intensité de fluorescence
( <b>▲</b> )
Figure 45 : Culture d'Escherichia coli BL21 DE3 star pDsRed-express sur un mélange
lactose/glucose : concentrations en biomasse (•), en glucose (•), en lactose (•), et intensité de
fluorescence ( )
Figure 46 : Evolution de la fluorescence spécifique Escherichia coli BL21 DE3 star pDsRed-
express cultivée sur glucose (■), sur lactose (▲) ou sur un mélange glucose-lactose (●) en
fonction de la consommation du ou des substrats
Figure 47 : Spectres d'excitation (à gauche) et d'émission (à droite) des protéines AmCyan,
YEGfp, ZsYellow et DsRed-express. 122
Figure 48 : Spectres d'excitation (à gauche) et d'émission (à droite) des protéines AmCyan,
Gfp, ZsYellow et DsRed-express et largeur des bandes passantes d'excitation et d'émission
des filtres FITC et Cy3
Figure 49 : Photos prises en lumière blanche (1) avec le bloc-filtre FITC (2a) et le bloc-filtre
Cy3 (2b) au microscope à épifluorescence. Une image composite des images 1, 2a et 2b a été
réalisée grâce au logiciel ImageJ
Figure 50 : Exemple de définition et réglages des paramètres pour l'excitation et l'émission
des fluorochromes sur le microscope confocal LEICA SP2
Figure 51 : Visualisation en microscopie confocale d'un mélange des 3 souches <i>d'Escherichia</i>
<i>coli</i> codant pour les trois protéines de fluorescence, observation à l'objectif X40 avec un
zoom 3X sur un seul plan Z (image 2D) puis à l'objectif X40 avec un zoom 3X sur plusieurs
plans Z cumulés (image 3D) pour l'image de droite
Figure 52 : Dépôt de Saccharomyces cerevisiae exprimant la protéine Gfp avec Escherichia
<i>coli</i> exprimant la protéine AmCyan (à gauche, 1 unité : 37,6 µm) ou avec <i>Escherichia coli</i>
exprimant la protéine DsRed-express (à droite, 1 unité 15,1 µm)
Figure 53 : Visualisation en microscopie confocale d'un dépôt sur membrane de
Saccharomyces cerevisiae PJ69 marquée au FDA: objectif X20 (1 unité=28,9µm). Des zooms
ont été réalisés sur certaines zones du dépôt
Figure 54 : Cellules Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A pYGfp marquées à l'IP
Figure 55 : Cellules de Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A pYGfp marquées au bleu de
méthylène et observées en épifluorescence en fond clair (1) et avec le filtre FITC (2). Une
image composite a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (3)
Figure 56 : Image en épifluorescence, objectif X100, avec le bloc-filtre Cy3 (1) et l'image
composite en fond clair associé (2)
Figure 57 : Image en épifluorescence, objectif X40, avec le bloc-filtre FITC (1) et l'image
composite en fond clair associé (2)
Figure 58 : Images en épifluorescence, objectif X40, avec le bloc-filtre FITC (1), le bloc filtre
$\overline{\text{Cv3}}$ (2) et l'image composite en fond clair associé (3)
Figure 59 : Exemple de recalibration de la taille d'un voxel. A gauche, taille initiale par
défaut, à droite : taille réelle après recalibration
Figure 60 : Reconstruction d'un dépôt en 3 D et mesure de l'épaisseur. 1 unité = 1 côté de
petit carré $\approx 22 \mu$ m
Figure 61 : Dépôt mixte levure exprimant la protéine verte / bactérie exprimant la protéine
rouge. Le côté d'un petit carré correspond à 15.1 um. Surface observée 151 x 151 um 143
Figure 62 : Etapes du traitement de l'image acquise pour un dépôt mixte de levures exprimant
la protéine verte et de bactéries exprimant la protéine rouge. A gauche (Figure 62a): image
d'un plan z donné, au centre : critères d'analyse et choix du seuil permettant de sélectionner
les levures; a droite (Figure 62c):résultat du traitement appliqué

Figure 63 : Différents seuillages appliqués à une même image acquise pour un dépôt mixte de Figure 64 : Etapes du traitement de l'image acquise pour un dépôt mixte de levures exprimant la protéine verte et de bactéries exprimant la protéine rouge. A gauche (Figure 64a)): image d'un plan z donné, au centre : critères d'analyse et choix du seuil permettant de sélectionner Figure 65 : Différentes étapes mises en œuvre pour l'analyse quantitative d'agrégats Figure 66 : Reconstructions en trois dimensions de dépôts de levures (à gauche) et de bactéries (à droite) lors de filtrations réalisées à une pression transmembranaire de 30 mbars Figure 67 : Images de plans focaux observés à l'objectif X40, zoom3, obtenus pour l'expérience C2 tableau 16, dans la partie supérieure du dépôt (1) et inférieure du dépôt, côté Figure 68 : Images de plans focaux observés à l'objectif X40, zoom2, à mi-hauteur pour un dépôt de levures (gauche) et un dépôt de bactéries (droite) obtenus à une pression Figure 69 : Image d'un plan z pris dans la partie supérieure d'un dépôt de levure exprimant la Gfp. Entourées en blanc : zones où différentes tailles de levures sont visibles. Images 187,5 Figure 70 : Répartition du diamètre moyen de levures (mesure réalisée sur un échantillon de Figure 71 : Flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire lors des filtrations d'une suspension de levures (trait plein vert, expérience A1 : masse déposée : 24,96 +/- 0,21 mg); d'une suspension de bactéries (trait plein rouge, expérience B1 : masse déposée: 24,87 mg +/- 0,09 mg) et d'un mélange levures/ bactéries (trait plein rose, expérience C1 : masse totale déposée : 25,12 mg +/- 0,48 mg). Les courbes pointillées correspondent aux résultats Figure 72 : Rapport du flux de perméat pour une suspension de micro-organismes sur le flux pour la membrane propre (J/Jo) en fonction de la pression transmembranaire appliquée et pour Figure 73 : Résistance du dépôt en fonction de la pression transmembranaire appliquée (en pointillés résistance de la membrane) : résistances calculées à partir des résultats expérimentaux (suspensions de levures (), de bactéries (), mélange de levures/bactéries(**•**)) et valeur théorique pour un dépôt mixte levure/bactéries composé de Figure 74 : Résistance spécifique du dépôt en fonction de la pression transmembranaire appliquée calculées à partir des résultats expérimentaux (suspensions de levures (), de Figure 75 : Evolution du coefficient K en fonction de la porosité pour deux valeurs de pression appliquées au dépôt bactérien (correspondant à deux valeurs de résistance spécifique) Figure 76 : Illustration d'arrangements possibles de particules sphériques de tailles différentes dans des dépôts de même épaisseur : les sphères rouges représentent les bactéries et les Figure 77 : Exemples d'empilements de sphères de rayon R, et espaces interstitiels Figure 78 : Illustration d'arrangements de particules sphériques de tailles différentes dans un dépôt mixte : les sphères rouges représentent les bactéries et les sphères vertes les levures. 201

Figure 79 : Image d'un plan focal obervés à l'objectif X40, zoom2, à mi-hauteur d'un dépôt mixte levures (vert) bactéries (rouges) obtenu à une pression transmembranaire de 30 mbars. Figure 80 : Volumes occupés par la levure S. cerevisiae (en vert) et E. coli (en rouge) pour différents plans z du dépôt. Valeurs d'intensité seuils inférieures pour les bactéries: 80, pour Figure 81 : Volume occupé par la levure S. cerevisiae (en vert) et E. coli (en rouge) pour différents plans z du dépôt. Valeurs d'intensité seuils inférieures pour les bactéries: 60, pour Figure 82 : Images en coupe du dépôt mixte (à gauche, 1 unité = 1 côté de petit carré : 18,7 um), et plans z situés en surface de la zone observée (A), au cœur (B) ou en profondeur (C) (à droite, images 187 µm x 187 µm). Reconstruction etanalyse avec le logiciel Volocity®.. 205 Figure 83 : Surface occupée par la levure Saccharomyces cerevisiae (en vert) et Escherichia coli (en rouge) par rapport à la surface totale recouverte pour différents plans z situés à différentes profondeurs (à la surface, au cœur de la zone analysée ou plus proche de la Figure 84 : Courbes de consommation du glucose (•), du lactose (•), et courbe d'évolution de la biomasse totale en suspension dans le fermenteur (•). Les lettres associées aux flèches rouges correspondent aux prélèvements des coupons qui seront observés en microscopie confocale. Les flèches numérotées correspondent au début de la phase de culture continue (1), à l'inoculation du réacteur avec la bactérie (2), à la diminution du taux de dilution de  $0.2 \text{ h}^{-1}$  à Figure 85 : Images obtenue d'après l'observation des coupons A et B et l'acquisition au microscope confocal (objectif X40, zoom 1) (1 unité = 1 coté de petit carré : 37,6 µm)...... 220 Figure 86 : Images obtenues lors de l'observation au microscope confocal des coupons A et B (objectif X40 zoom 1). Les levures exprimant la Gfp développées sur la surface du coupon apparaissent en vert et les cellules marquées à l'IP apparaissent en rouge (1 unité = 1 coté de Figure 87 : Image obtenue d'après l'observation de levures se développant sur les coupons et l'acquisition au microscope confocal (objectif X40, zoom 3). Un grossissement est ensuite Figure 88 : Images obtenues d'après l'observation des coupons C (à gauche) et D (à droite). Les levures apparaissent en vert et les bactéries en rouge. L'acquisition au microscope confocal est réalisée à l'objectif x40, zoom 1 (1 unité = 1 coté de petit carré =  $37.6 \text{ \mu m}$ ). Figure 89 : Photos des micro-organismes en suspension dans le réacteur les jorus 8 et 9, le 

### Liste des tableaux :

Tableau 1 : Techniques d'analyse des dépôts (Chen et al., 2004)	15
Tableau 2 : Résolution radiale et/ou axiale du microscope à épifluorescence (2D) et du	
microscope confocal pour deux objectifs différents à une longueur d'onde excitatrice $\lambda = 5$	00
nm (Stelzer, 2000)	25
Tableau 3 : Comparaison entre la microscopie confocale et la microscopie biphotonique	
(Dufour <i>et al.</i> , 2006)	29
Tableau 4 : Souches et milieux de culture	. 69
Tableau 5 : Récapitulatif des étapes de cultures des différentes souches utilisées.	. 70
Tableau 6 : Temps de rétention des composés quantifiés par HPLC	
Tableau 7 : Conditions retenues pour la mesure la fluorescence émise par les protéines vert	tes
et rouges	74
Tableau 8 · Données de sécurité relatives aux colorants utilisés	75
Tableau 9 · Bloc-filtres disponibles sur le microscope à énifluorescence LEICA DM 4000 ]	R
	83
Tableau 10 · Intensité de fluorescence spécifique en fonction de la concentration en adénin	05
dans le milieu	95
Tableau 11 · Activité spécifique de fluorescence des levures à la fin de l'expérience	109
Tableau 12 : Souches transformées et longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émissi	ion
<u>des différentes protéines exprimées par les plasmides insérés</u>	123
Tableau 13 : Blocs filtres disponibles et gammes de longueurs d'ondes d'excitation et	123
<u>d'émission correspondantes</u>	124
Tablagu 14 : Longuours d'ande antimales neur l'avaitation des différentes protéines	124
<u>Tableau 14</u> . Longueurs a onde optimales pour recentation des arrecentes proteines	ntag
disponibles sur le microscone confecel utilisé (LEICA SP2)	120
Tablaau 15 : Imagag abtanuag anràg l'avaitation das trais aulturas aux différents lagars	120
(Objectife X40 zoom2)	120
Tablaau 16 : Massas da miaro, organismas dánasáas at taux da marguaga au gours das	150
<u>Tableau 10</u> . Masses de fincto-organismes deposées et taux de marquage au cours des différentes expériences réalisées	171
Tableau 17 : Example de réglage des paramètres d'acquisition	1/1
<u>Tableau 17.</u> Exemple de regiage des parametres d'acquisition gein et offect	171
<u>Tableau 18.</u> Valeurs des parametres d'acquisition gain et onset	174
<u>Tableau 19</u> , valeurs à intensité seul minimal des voxels analyses	1/4
<u>Tableau 20</u> . Surfaces recouvertes par les differents signaux de fluorescence en fonction du	175
pian z analyse	1/3
<u>Tableau 21</u> : Evaluation des epaisseurs mesurables pour les trois depois à différentes PTM	a
partir de l'analyse d'images realise à l'aide du logiciel volocity®: levures (A1), bacteries	175
(B1), melange levure/bacteries (C1)	1/3
<u>Tableau 22</u> : Epaisseurs theoriques et mesurees des depots des experiences A1, B1 et C1	1//
<u>Tableau 23 :</u> Exemple de calcul du volume occupe corrige	180
<u>Tableau 24 :</u> Resultats de l'analyse d'image realise à l'aide du logiciel Volocity®	181
<u>Tableau 25</u> : Resistances specifiques obtenues en mode frontal (F) ou tangentiel (T) pour d	les
dépôts de <i>E. coli</i> et de <i>S. cerevisiae</i>	190
<u>Tableau 26 :</u> relations résistance spécifique – pression et compressibilité déterminées par	
ceratins auteurs	195
<u>Tableau 27 :</u> Valeurs des paramètres d'acquisition gain et offset.	203
Tableau 28 :       Valeurs d'intensité seuils inférieures sélectionnées	204
<u>Tableau 29 :</u> Analyse des images obtenues pour les cellules en suspension dans le réacteur.	
	219
<u>Tableau 30 :</u> Volume occupé par les levures exprimant la Gfp et par les cellules marquées à	à
I'IP pour une surface de 0,14 mm <sup>2</sup>	220

Tableau 31 : Analyse des images obtenues pour les cellules en suspension dans le réacteur et
dans le biofilm
Tableau 32 : Volume occupé par les levures exprimant la protéine Gfp, et par les bactéries
exprimant la protéine DsRed-express pour une surface de 0,14 mm2224
Tableau 33 : Rendements expérimentaux de croissance des micro-organismes modèles issus
des expériences menées en culture discontinues aérées, exprimés en « g biomasse/g substrat »
Tableau 34 : Bilans matière globaux, (en g) réalisés sur la coculture continue aux jours 9 et 10
Tableau 35 : Répartition des populations bactérienne et levurienne en suspension dans le
réacteur et adhérées sur les coupons

### Liste des abréviations

ADH	Alcool déshydrogénase
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomal
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ARN	Acide Ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
Bfp	« Blue Fluorescent Protein »
BM	Bleu de méthylène
Cfp	« Cyan Fluorescent Protein »
CSLM	« Confocal scanning light microscopy »
DGGE	« Denaturing Gradient Gel Electrophoresis »
DO	Densité optique
DOTM	« Direct Observation Through Membrane »
DVO	« Direct Visual Observation »
FDA	Fluorescéine di-acétate
FISH	« Fluorescent In-Situ Hybridization »
FRET	« Frequence Resonance Energy Transfert »
Gfp	« Green fluorescent protein »
HPLC	« High Performance Liquide Chromatography »
IP	Iodure de Propidium
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
RISA	« rRNA Intergenic Spacer Analysis »
Rfp	« Red Fluorescent Protein »

SEM	« Simple and Efficient Method »
SSCP	« Single Strand Conformation Polymorphism »
TGGE	« Thermal Gradient Gel Electrophoresis »
T-RFLP	« Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism »
UV	Ultra-Violet
Yfp	« Yellow Fluorescent Protein »
2D/ 3D	2 dimensions / 3 dimensions

### Liste des symboles

D	Taux de dilution hydraulique	h <sup>-1</sup>
J	Densité de flux obtenu en présence des micro-organismes	L/(h.m <sup>2</sup> )
$J_0$	Densité de flux obtenu sur la membrane propre	L/(h.m <sup>2</sup> )
$pO_2$	Pression partielle en oxygène dissous par rapport à la saturation e	n air %
РТМ	Pression transmembranaire	mbars ou Pascal
$r_{\rm X}$	Vitesse de production de la biomasse X	g/(L.h)
rp	Vitesse de production du produit P	g/(L.h)
R <sub>m</sub>	Résistance hydraulique de la membrane	$m^{-1}$
R <sub>d</sub>	Résistance hydraulique du dépôt	m <sup>-1</sup>
$Y_{X\!/S}$	Rendement de biomasse X par rapport au substrat S ou Cm	$g_X/g_S$ tole <sub>X</sub> /Cmole <sub>S</sub>
$Y_{P\!/\!S}$	Rendement du produit P par rapport au substrat S	$g_P/g_S$
VOM	Volume Occupé Mesuré	$\mu m^3$
VOC	Volume Occupé Corrigé	$\mu m^3$
Indices		
S	Relatif au substrat	
Р	Relatif au produit	
Х	Relatif à la biomasse	
m	Relatif à la membrane	
d	Relatif au dépôt	
r	Relatif au ribosome	
Lettres grecqu	ies	
λ	Longueur d'onde	nm
μ	Viscosité du perméat	Pa.s
ρ	Masse volumique	Kg/m <sup>3</sup>

# Introduction générale

Les agrégats biologiques constitués de micro-organismes concentrés peuvent être rencontrés dans de très nombreux procédés industriels ainsi que dans des contextes environnementaux naturels. C'est en particulier le cas des cultures floculantes, des biofilms colonisant les surfaces ainsi que des dépôts obtenus lors de la filtration de suspensions de micro-organismes.

Le développement de ces agrégats peut être recherché, comme dans les bioprocédés d'épuration des eaux usées (où la formation de flocs va permettre une séparation plus aisée des micro-organismes par décantation) ou dans les procédés de production de bière, dans lesquels la fonctionnalité des micro-organismes va être mise en œuvre dans la transformation de molécules ou la maturation du produit.

Par ailleurs, on peut également chercher à éliminer ces structures microbiennes qui peuvent avoir des conséquences néfastes comme c'est le cas dans le domaine médical ou dans l'agro-alimentaire où la formation de biofilms peut être une source de contamination et entraîner par exemple des infections nosocomiales ou des toxi-infections alimentaires. Dans certaines industries, le développement de ces biofilms dans des canalisations peut également être à l'origine de sérieux problèmes de corrosion ou de colmatage des installations.

Dans certains procédés industriels, les dépôts microbiens peuvent résulter des étapes de séparation par filtration de cultures cellulaires, comme c'est le cas dans l'industrie pharmaceutique lorsqu'on souhaite séparer une molécule d'intérêt (vaccin, antibiotique ...) des micro-organismes la produisant.

Dans tous les cas, la formation de ces différents types d'agrégats (flocs, biofilms, dépôts) qu'elle soit souhaitée ou non, a un impact important sur le procédé dans sa globalité et cela à différents niveaux. Les dépôts formés durant des opérations de filtration peuvent colmater les membranes et pénalisent ainsi les performances du procédé. Dans les flocs et les biofilms, la modification de l'état physiologique des micro-organismes au sein de l'agrégat peut engendrer des changements dans l'efficacité globale du procédé. La structure, l'organisation et l'activité des agrégats biologiques sont généralement contrôlées par les conditions environnementales, qu'il s'agisse de conditions biologiques, hydrodynamiques, physiques ou physico-chimiques. Ces structures microbiennes complexes évoluent dans le temps pour des raisons physiques (accumulation de biomasse, filtration) ou biologiques (croissance, activité des micro-organismes). Ces modifications ont pour conséquence des perturbations des phénomènes de transfert (de chaleur ou de masse) au sein même de ces

écosystèmes, qui peuvent influencer en cascade leur activité ou leur structure et donc l'efficacité globale du procédé. Ceci illustre le fragile équilibre présent dans ces écosystèmes, et l'extrême complexité pour contrôler et/ou conduire et optimiser les procédés dans lesquels ils interviennent.

L'amélioration de la compréhension du fonctionnement global de ces agrégats microbiens est donc primordiale pour mieux maîtriser leur développement, leur activité ou leur élimination, et ainsi améliorer les performances des procédés. Pour cela les relations entre la structure, l'organisation et l'activité des micro-organismes les constituant, qu'ils s'agissent de biofilms, de dépôts ou d'agrégats doivent être mieux caractérisées et quantifiées.

Différentes stratégies ont pu être utilisées pour étudier ces agrégats biologiques. Certaines sont des approches globales, qui reposent par exemple sur l'étude de la structure (épaisseur, densité,...) liée ou non aux conditions expérimentales (hydrodynamique locale, ...). D'autres approches s'intéressent à la nature et la quantification des différentes fractions de l'agrégat (eau, molécules extracellulaires, micro-organismes, ...). Enfin, des approches plus locales sont ciblées sur une des fractions de l'agrégat, par exemple la nature des molécules extracellulaires (exopolysaccharides, ...), ou sur l'identification et/ou la localisation des différentes souches présentes ainsi que sur la caractérisation des fonctions biologiques associées.

Il apparaît donc important et nécessaire d'avoir une approche qui prenne en compte à la fois des aspects globaux (structure, épaisseur) et locaux (porosité, identification et localisation des micro-organismes). Notre projet de thèse s'inscrit dans cette logique de compréhension des relations environnement, structure, activité biologique dans des procédés biologiques mettant en œuvre des cellules agrégées afin de mieux appréhender le comportement des micro-organismes dans ces systèmes complexes et ainsi d'améliorer le foncionnement des procédés associés. L'étude proposée ici vise à développer des outils et méthodologies permettant un suivi *in vivo* et/ou *in situ* et en temps réel d'un écosystème complexe évolutif. De nombreuses techniques souvent basées sur la biologie moléculaire sont largement utilisées pour l'étude des agrégats biologiques en écologie microbienne, mais présentent quelques inconvénients, notamment pour l'aspect *in-vivo* et/ou *in-situ*. Le travail de thèse a donc eu pour objectif de développer une nouvelle approche, de la caractériser et de tester sa pertinence dans des bioprocédés en cellules agrégées. La stratégie proposée repose sur l'utilisation de micro-organismes modèles, *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae*,

de tailles, morphologies et propriétés biologiques différentes, modifiés par génie génétique pour qu'ils puissent synthétiser des protéines fluorescentes permettant de les identifier et de les localiser dans des structures biologiques complexes. L'évolution de l'organisation et/ou de l'activité des micro-organismes fluorescents au sein de l'agrégat pourront ainsi être suivies en temps réel, *in-vivo* et /ou *in-situ*, sans déstructurer l'agrégat ni utiliser de traitement chimique pouvant modifier ou altérer les structures.

Dans un premier chapitre, nous présenterons les données bibliographiques en relation avec l'étude réalisée. Les spécificités des différents types de structures microbiennes complexes seront présentées. Les techniques habituellement utilisées pour identifier les différentes souches microbiennes d'un écosystème, ainsi que pour la visualisation de la structure des agrégats seront présentées. Enfin nous décrirons les caractéristiques et propriétés des protéines fluorescentes communément utilisées en biologie et présenterons quelques applications dans des cellules procaryotes ou eucaryotes.

Après la description du matériel et des méthodes utilisées, les résultats seront présentés en deux parties, afin de répondre à deux problématiques scientifiques :

- Quel sera l'impact des conditions environnementales sur l'expression et/ou la maturation des protéines fluorescentes ?
- Quelle sera l'organisation d'agrégats mixtes microbiens dans des environnements maîtrisés de type dépôt ou biofilm ?

Ainsi, le premier chapitre de résultat sera consacré aux aspects méthodologiques liés à la construction et aux caractérisations cinétiques des souches recombinantes, afin d'évaluer la pertinence de leur utilisation comme modèles des souches sauvages. Les méthodes de microscopies et les techniques d'analyses d'images mises en place pour aboutir à une observation et une quantification satisfaisantes des différentes souches construites seront exposées.

Puis nous intéresserons à la caractérisation *in vivo* et dans certains cas *in-situ* de deux types d'agrégats biologiques dans des environnements maîtrisés, obtenus à partir des micro-organismes autofluorescents construits. Le deuxième chapitre sera consacré à l'exemple « type » dépôt, dans lequel les effets biologiques de croissance ou de production seront limités, afin de s'intéresser principalement à l'impact de la morphologie des micro-

organismes non proliférant sur l'organisation de dépôts soumis à des contraintes hydrodynamiques maitrisés.

Puis, dans un troisième chapitre, nous nous intéresserons cette fois à l'aspect biologique, liés aux comportements des micro-organismes proliférant en culture continue et notamment à leurs capacités à se développer en biofilm ou en suspension.

Cette approche permettra de préciser la pertinence de cette stratégie et d'en fixer les limites d'application.

Ce sujet à l'interface de la Microbiologie et du Génie des Procédés s'inscrit dans le cadre d'un partenariat entre les équipes « Transfert Interface Mélange » et « Génie microbiologique : analyse systémique et innovation des procédés » du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés INSA-CNRS-INRA UMR5504 / UMR792 de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Cette thèse a été financée par une bourse MESR de l'Ecole Doctorale MEGeP (Mécanique Energétique Génie civil et Procédés...).

# **Revue bibliographique**

### I - Caractérisation d'agrégats biologiques microbiens

### 1. Généralités

Les agrégats biologiques sont des structures composées d'un ou plusieurs types de micro-organismes qui peuvent être ou non liés à un support et parfois englobés dans une matrice extracellulaire. Selon ces critères nous définirons trois types d'agrégats biologiques différents, que nous nommerons biofilms, dépôts ou flocs, ceux-ci ayant certaines caractéristiques communes et d'autres plus spécifiques.

Nous utiliserons le terme biofilm pour définir un ensemble de micro-organismes, mono ou pluri-espèces, résultant du développement de micro-organismes sur des surfaces humides ou immergées, mobiles ou fixes. Après une étape d'adhésion initiale, ils synthétisent au cours de leur croissance des polymères et forment des structures de quelques micromètres à quelques millimètres d'épaisseur. Les micro-organismes sont ainsi insérés dans une gangue polymérique encapsulatrice (constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques,...) au sein de laquelle ils peuvent proliférer et acquérir des caractéristiques différentes de celles des cellules planctoniques (*i.e.* suspension). Une vie propre peut s'organiser au sein de la matrice, protégée par les polymères extracellulaires avec formation de réseaux de pores et de canaux de circulation : accumulation de nutriments, échanges génétiques, communication (Mudliar *et al.*, 2008). Les biofilms sont ubiquitaires, c'est-à-dire qu'ils peuvent coloniser les sols, les rivières, les végétaux, les organismes supérieurs vivants, en se développant sur de nombreux types de surface, organiques ou inorganiques. Le développement d'un biofilm mature peut prendre de quelques heures à plusieurs semaines, selon le système étudié (Mittelman, 1985).

Bien que les biofilms bactériens aient été les plus étudiés, d'autres micro-organismes comme les levures peuvent former des biofilms : leur composition et leur mode de développement sont similaires aux biofilms bactériens (Mukherjee & Chandra, 2004). Les biofilms présentent en général la consistance d'un gel, à cause notamment d'une forte teneur en eau de la matrice dans laquelle les micro-organismes sont immobilisés. Les composants principaux de la matrice sont de l'eau (50 à 90% du poids total), des polymères extracellulaires excrétés par les micro-organismes (75 à 95% du poids sec), des micro-organismes (5 à 25 % du poids sec), des particules emprisonnées et des substances dissoutes (Flemming *et al.*, 1992). Le consortium microbien formé est souvent très stable, adapté et

résistant à des stress extérieurs (ex : résistance aux antibiotiques) (Sedlacek & Walker, 2007 ; Maillard, 2007).

Certains biofilms ont des fonctions physiologiques primordiales qui sont mises à profit dans de nombreux procédés, comme les procédés de biolixiviation ou de traitement des effluents aqueux (Weber, 2007 ; Tomaszek & Grabas, 2007), ou comme dans de nombreux procédés alimentaires exploitant les fonctions de certains micro-organismes (Daufin *et al.*, 1998 ; Lodolo *et al.*, 2008). Néanmoins, les biofilms sont souvent impliqués dans de lourds problèmes industriels et sociétaux : accélération des phénomènes de corrosion (Tanji *et al.*, 1999), contamination des équipements des industries agro-alimentaires, des réseaux d'eau potable (Totowa *et al.*, 1993 ; Gagnon & Slawson, 1999), des réseaux de conditionnement d'air (Mouchtouri *et al.*, 2009), bio salissures des coques de navires (Compere *et al.*, 2001), ou contaminations en milieu hospitalier, entraînant le développement de maladies nosocomiales (Tapia & Yee, 2006). Le rôle écologique et économique des biofilms est donc considérable, aussi bien par ses effets positifs que par ses effets négatifs.

Le terme dépôt définira un ensemble de micro-organismes, d'une même population ou non, résultant d'une accumulation de biomasse sur une surface (suite à un phénomène de décantation ou de convection), sans croissance biologique, non enchâssés dans une matrice extracellulaire, mais pouvant néanmoins être associés à diverses molécules. Les dépôts biologiques sont essentiellement rencontrés lors des étapes de filtration et constituent généralement le facteur limitant du procédé. L'étude bibliographique se focalisera plus particulièrement sur l'analyse des structures résultant de l'accumulation de micro-organismes à la surface d'une membrane de filtration (Bacchin, 1994 ; Bessière, 2005). La filtration membranaire est largement utilisée dans l'industrie pour la séparation de particules ou de micro-organismes. Cette technique permet en effet de réaliser, sans ajout d'adjuvants chimiques, la clarification ou la désinfection totale ou partielle d'un liquide afin de répondre à des critères de sécurité sanitaire ou alimentaire, des critères de potabilité... L'industrie agroalimentaire utilise largement les procédés de filtration pour la production et/ou la stérilisation de nombreux liquides comme le vin, la bière, les jus de fruits, le lait (Daufin et al., 1998; Boissier et al., 2008). Dans l'industrie pharmaceutique, la filtration sert à purifier des liquides biologiques et à les rendre stériles, c'est-à-dire exempt de germes microbiens comme dans le cas de la production d'antibiotiques ou de vaccins (Casetta & Negretti, 1989 ; Peixoto et al., 2007).

En traitement de l'eau, certains micro-organismes peuvent être utilisés pour leur capacité naturelle ou acquise par génie génétique à fixer certaines molécules par exemple des métaux lourds (Goyal, 2007; Congeevaram *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 1998), et sont séparés ensuite du milieu épuré par filtration. Sur le même principe, les micro-organismes peuvent être utilisés pour clarifier l'eau traitée par des boues activées (bioréacteurs à membrane) (Li *et al.*, 2005; Langenbach *et al.*, 2009).

L'une des limitations majeures de ces procédés unitaires est liée à l'accumulation irréversible de matière (micro-organismes, ...) à la surface de la membrane, et est appelée de façon générique « colmatage » (Bacchin, 1994 ; Bessière, 2005). Les conséquences de cette accumulation de matière sont des dépenses supplémentaires d'énergie liées à l'augmentation de la résistance au transfert, une augmentation de la fréquence des nettoyages, pendant lesquels la production doit être suspendue, et la diminution de la durée de vie des membranes du fait des lavages fréquents (Espinasse *et al.*, 2008). L'impact économique des pertes de performances liées au colmatage ont ainsi donné lieu à de nombreux travaux sur la compréhension des phénomènes intervenant dans la formation et les propriétés des dépôts, en développant notamment des méthodes spécifiques pour étudier la formation et la structure et/ou l'organisation des dépôts. Ces aspects seront développés dans le chapitre suivant.

Le terme floc correspondra à un ensemble de micro-organismes, d'une même population ou non, qui auront la capacité de s'agréger entre eux par des liaisons chimiques (hydrogène ou autres) ou par la formation d'une matrice d'exopolymères. A la différence des biofilms, qui se développent sur une surface solide, mobile ou fixe, les flocs seront des agrégats constitués de micro-organismes pouvant être associés à des particules organiques et/ou inorganiques, à des polymères exocellulaires, à des cations ou n'être le résultat que de liaisons chimiques entre les molécules de surface des micro-organismes.

Dans certains cas réels, il sera difficile de classer les agrégats de façon nette dans une de ces trois catégories, compte-tenu de leur évolution dynamique du fait de perturbations extérieures et/ou de modifications au sein du procédé. Par exemple, un dépôt résultant d'un procédé de filtration peut devenir un biofilm si les micro-organismes prolifèrent et forment une matrice. De même si le dépôt formé au cours d'une filtration est issu de la rétention de flocs, l'agrégat formé pourra présenter les particularités d'un biofilm, avec la présence d'une vie et d'une activité microbienne, d'une matrice exopolymérique... Un floc peut résulter du

détachement d'une partie d'un biofilm, et inversement, un floc dont la taille et la densité augmentent peut sédimenter et se fixer à une nouvelle surface, initiant ainsi un nouveau biofilm. Il convient donc de préciser que <u>les trois définitions données ici sont des</u> <u>définitions d'agrégats modèles</u>, dont la formation et les propriétés, développées ci-dessous, ne sont pas figées, et dépendront de l'évolution de l'agrégat.

La formation d'agrégats biologiques, quelle(s) qu'en soi(en)t l'origine ou les causes, conduit à une structure tridimensionnelle au sein de laquelle l'environnement des microorganismes devient différent de l'environnement qu'ils pourraient trouver en suspension sous forme planctonique. Les phénomènes de transfert (substrat, oxygène) peuvent notamment y être localement fortement modifiés en fonction de plusieurs paramètres tels que l'hydrodynamique au sein du système, la structure même de l'agrégat, la présence locale de certains composés ... (Siegrist & Gujer, 1985; Beyenal & Tanyolaç, 1998). Par exemple, dans un biofilm, la présence d'une gangue d'exopolymères va entraîner des conditions de transfert différentes de celles rencontrées dans un dépôt (Mudliar et al., 2008). Dans un floc, en fonction de sa taille, de son organisation et de sa compacité, les cellules au cœur de la structure seront susceptibles d'être dans des conditions de limitations nutritionnelles consécutives à des phénomènes limitant de transfert de matière, tout comme les cellules basales d'un biofilm (Li & Bishop, 2004; Ge et al., 2006). Outre l'organisation, ces conditions locales particulières ont un impact sur l'activité globale et la viabilité des microorganismes et vont conditionner l'évolution des caractéristiques de l'agrégat et les performances globales du procédé biologique.

L'étude d'agrégats biologiques nécessite notamment l'étude de leur structure et/ou de leur organisation. Deux sortes de structures biologiques ont été étudiées dans ce travail : les dépôts et les biofilms. Nous centrerons donc l'analyse bibliographique sur les principales méthodes de caractérisation de ces deux types d'agrégats. Néanmoins, outre ces aspects généraux, et selon le procédé, le contexte d'application, le ou les micro-organismes concernés, chaque cas pourra comporter des spécificités qui lui seront propres. Par exemple, les études de la structure des dépôts de filtration sont souvent couplées à des études hydrodynamiques dépendant du mode de filtration. En premier lieu quelques généralités relatives aux deux principaux modes de filtration et leurs particularités sont rappelées dans le paragraphe ci-dessous.

En ce qui concerne les dépôts en filtration, la conséquence la plus critique pour le procédé est le colmatage. La filtration membranaire est basée sur l'application d'une différence de pression permettant le passage du solvant à travers une membrane dont la taille des pores assure la rétention des solutés (Daufin *et al.*, 1998). Elle peut être menée en mode d'écoulement tangentiel ou frontal (Figure 1). En filtration frontale, l'écoulement du fluide est perpendiculaire à la surface de la membrane et toute la matière entrant dans le module de filtration est retenue et s'accumule à la surface de la membrane. En filtration tangentielle, le fluide circule parallèlement à la membrane, générant des conditions hydrodynamiques et plus précisément des forces de cisaillement qui permettent de limiter l'accumulation de matière à sa surface.



Figure 1 : Mise en œuvre des filtrations frontale et tangentielle (Bessière, 2005)

L'accumulation de matière sur la membrane impacte différemment le procédé en fonction du mode de conduite : si le système fonctionne à pression transmembranaire constante, la formation d'un dépôt se traduit par une diminution du flux de perméation dans le temps. Si le système fonctionne à flux constant, comme souvent en traitement de l'eau par exemple, la formation d'un dépôt se traduira par une augmentation de la pression transmembranaire (Bacchin, 1994; Bessière, 2005). Dans les deux cas, le colmatage induira une augmentation de la consommation d'énergie, des cycles de lavage plus fréquents...

L'étude de la structure des dépôts en parallèle à l'étude hydrodynamique est donc nécessaire pour mieux appréhender les mécanismes mis en œuvre. De nombreux travaux ont été dédiés à la caractérisation globale ou locale des agrégats biologiques, certains travaux présentant des méthodologies développées plus spécifiquement à l'étude de dépôts, mais pouvant être étendues aux biofilms.

### 2. Structure globale : surface, épaisseur, porosité,...

L'étude complète d'agrégats biologiques passe nécessairement par l'étude de leur structure et/ou de leur organisation. De nombreuses méthodes de caractérisation de la structure globale ont été développées. Outre les méthodes invasives *ex-situ* nécessitant la déstructuration de l'agrégat pour en étudier les différents composants, ou les techniques de microscopie électronique à balayage pour l'étude de surface, différentes techniques non-optiques et optiques ont été proposées.

### 2.1. Etude de la surface

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy en anglais) permet d'obtenir une représentation de la surface d'un objet. Des électrons, après avoir été envoyés sur l'échantillon, sont réfléchis par sa surface pour donner une vue en trois dimensions avec une très bonne résolution (de l'ordre du nanomètre) permettant ainsi d'étudier la topographie de l'objet.

Boissier *et al.* ont utilisé la MEB pour étudier la surface de la membrane de filtration afin de caractériser l'impact de différentes particules présentes dans du vin (levures, bactéries et colloïdes) sur la performance d'un procédé de microfiltration tangentielle, et notamment pour étudier la réversibilité de la formation d'un dépôt (Boissier *et al.*, 2007).

La microscopie électronique à balayage ne permet cependant ni d'accéder à l'intérieur de l'échantillon ni de réaliser de réelles mesures physiques de l'agrégat (épaisseur, porosité,...). Elle ne permet pas d'observer de cellules vivantes car le plus souvent la technique nécessite une fixation et une métallisation des échantillons (fine couche de carbone, d'or ou de platine). De plus, dans le cas de l'étude d'agrégats, certains chercheurs ont montré que les techniques de préparation de l'échantillon pour la MEB (fixation, déshydratation) pouvaient avoir un impact et modifier l'apparence, la distribution et l'hétérogénéité de la structure de l'agrégat (Fratesi *et al.*, 2005).

### 2.2. Etude de l'épaisseur et de la porosité

Dans une revue détaillée, Chen *et al* ont décrit un grand nombre de méthodes noninvasives optiques et non-optiques, c'est-à-dire impliquant la génération et la détection d'un signal externe pour caractériser l'agrégat, ou quasi non-invasive, c'est-à-dire impliquant l'utilisation de traceurs ou la présence de petits générateurs ou détecteurs de signaux situés sur ou dans la membrane (Chen *et al.*, 2004). Un tableau récapitulatif de toutes les techniques est présenté ci-dessous (Tableau 1).

		-					
Method	Non-invasive	Device specific	Region specific	Approximate resolution	Real time	Model based	Complex
Optical							
DOTM	Y	Y	II	>0.5 µm	R	N	L
Laser triangulometry	Y	Y	п	5 µ.m.	R	N	L
Shadowgraph	Υ	Υ	П, Ш	>200 μm above membrane	R	Ν	М
Refractometry	Y	Y	II, III	5 µ.m.	R	N	Μ
Interferometry	Y	Y		20 µm	R <sup>a</sup>	N	м
Photosensor	Y	Y	II, III	10 µm	R	N	L, M
Video	Y	Y	п	50 µm <sup>b</sup>	R	N	L, M
Fluorescence	Q	Y	I	<1 µm	R	N	L
PIV	Υ	Υ	III	Tracer size	R	N	Μ
Non-optical							
Impedance spectroscopy	Q	Y	I, II	<1 μm <sup>b</sup>	S	Y	н
Ultrasonic reflectometry	Y	N	I, II	0.75 µm	S	Y	L
Radio isotope	Q	Y	II, III	20 μm <sup>b</sup>	R	N	L
NMR.	Y	N	I, II, III	10 µm	Rª	N	Н
CAT	Y	N	III	$0.5  \text{mm} \times 1  \text{mm}$	R	N	н
SANS	Y	Y	II	0.1 nm	Rª	Y	н
Electrochemical methods	Q	Y	II	$<1  \mu m$	R	Y	L
CTA	Q	Ν	III	0.01 m/s	R	Y	L

Tableau 1 : Techniques d'analyse des dépôts (Chen et al., 2004)

Parmi ces techniques, certaines sont considérées comme non-invasive (Y), quasiinvasive (Q). Elles nécessitent parfois un appareillage spécifique (Device specific : Y), ou non (Device specific : N). Elles sont plus ou moins spécifiques de l'étude des phénomènes dans la membrane (Region specific : I), au niveau de la ou des couches de particules ou de cellules (Region specific II) ou de la fraction liquide (Region specific III). Certaines permettent une étude en temps réel rapide (Real Time R), très rapide grâce à un équipement adapté (Real Time R<sup>a</sup>), ou relativement lent (Real Time S). Un modèle mathématique est parfois nécessaire (Model based Y) ou non (Model based N). La résolution des différentes méthodes a été extraite par Chen *et al* de différentes publications, néanmoins certaines ont du être estimées d'après les données des différents travaux car ces derniers ne le précisaient pas (Approximate resolution exposant b).

Parmi ces méthodes, nous présenterons les plus simples permettant l'accès à des mesures d'épaisseur ou de porosité.

Une approche pour la caractérisation d'agrégats repose sur le suivi de leur développement et la mesure de leur épaisseur. Pour cela, différentes techniques peuvent être employées, non-optiques ou optiques.

La résolution des techniques non-optiques est en général meilleure que celle des techniques optiques mais présentent également pour la plupart un degré de complexité plus élevé (Tableau 1). L'avantage de certaines de ces techniques est qu'elles ne nécessitent pas l'utilisation d'un appareillage spécifique avec, par exemple, une fenêtre de visualisation. Parmi ces techniques non optiques, l'utilisation des ultrasons a l'avantage d'être peu onéreuse, et peut être utilisée à l'échelle industrielle car elle ne nécessite pas la transparence du milieu (Mendret, 2007). De plus, elle pourrait permettre d'accéder à des informations sur la structure (porosité) d'un dépôt, mais elle est limitée actuellement par le manque de connaissances sur la propagation des ondes en milieu poreux.

Les méthodes optiques pour suivre *in-situ* le développement d'un dépôt et/ou pour en mesurer l'épaisseur incluent les techniques basées sur l'observation directe (Li *et al.,* 1998 ; Mores & Davis, 2001 ; Wakeman, 1994 ; Chang *et al.,* 2002), sur l'utilisation de lasers (Schluep & Widmer, 1996 ; Hamachi & Mietton-Peuchot, 1999(a)), ou de photo-interrupteurs (Tung *et al.,* 2001).

Les techniques d'observation directe reposent sur l'utilisation de microscopes équipés de caméras vidéo permettant un suivi en temps réel de la formation d'un dépôt. Les premières expériences d'observation directe, dites DOTM pour «Direct Observation Throught Membrane » développées par Li et al (Li et al., 1998) reposaient sur l'utilisation de membranes transparentes qui permettaient l'observation des dépôts à travers la membrane, le microscope étant placé du côté du perméat (schéma 1 Figure 2). Dans une première étude, Li et al., 2003, ont pu observer in situ le dépôt de particules en microfiltration tangentielle sur la surface d'une membrane transparente en microscopie classique, puis ces auteurs ont ensuite adapté la technique à l'observation d'une bactérie (Pseudomonas) marquée avec un fluorochrome (l'acridine orange). Néanmoins, bien que l'observation puisse être en temps réel et *in-situ*, cette technique nécessite des membranes particulières, qui deviennent transparentes lorsqu'elles sont humidifiées. Mores & Davis, 2001, ont développé une technique dite DVO pour « Direct Visual Observation », dans laquelle le microscope est situé du côté de l'alimentation (schéma 2 Figure 2), ce qui permet l'utilisation de membranes non transparentes, mais nécessite une certaine clarté de la solution à filtrer (Chen et al., 1994). Ces deux techniques autorisent l'observation de la formation des premières couches du dépôt, mais ne permettent qu'une observation sur un plan en 2D, du fait de la faible profondeur de champ des microscopes utilisés. L'épaisseur ne peut donc pas être déterminée. Pour mesurer

le développement d'un dépôt et son épaisseur par observation directe, Wakeman a observé le dépôt par le côté (schéma 3 Figure 2), grâce à une caméra rapide. Cependant la résolution des images n'a pas permis la visualisation individuelle des particules de 0,5  $\mu$ m, 2,6  $\mu$ m et 25  $\mu$ m (Wakeman, 1994), mais seulement une estimation de l'épaisseur globale du dépôt. Cette technique nécessite néanmoins que son épaisseur soit homogène pour une mesure pertinente. Sur le même principe, pour l'observation de dépôts ou de biofilms sur des membranes tubulaires ou des fibres creuses, Chang *et al* et Freitas dos Santos & Livingston ont étudié les profils de dépôts ou de biofilms. Ils ont mesuré leurs épaisseurs le long de membranes ou de fibres creuses à l'aide d'un microscope optique équipé d'une caméra, l'agrégat se développant sur la face externe de la fibre (Chang *et al.*, 2002 ; Freitas dos Santos & Livingston, 1995) (Figure 3).



Figure 2 : Techniques d'observation de dépôts ou biofilms sur des membranes planes. Les objectifs (Obj) peuvent être situés côté perméat (1), côté rétentat (2) ou sur le côté de la membrane pour visualiser le profil de l'agrégat (3).



Figure 3 : Images de fibres creuses après 4h de filtration d'une suspension de levures à 0,1 g/L (Chang *et al.,* 2002)
Le principe de la méthode optique basée sur l'utilisation de lasers repose sur la réflexion d'une lumière laser sur la surface de la membrane à travers une fenêtre placée du côté de l'alimentation d'un module de filtration. Lors de la formation d'un dépôt ou d'un biofilm, l'angle de réflexion de la lumière sur la surface du dépôt est différent de l'angle de réflexion sur la surface de la membrane. Cette différence permet d'estimer son épaisseur (Figure 4). La simplicité de mise en œuvre de cette technique, ainsi que sa résolution de l'ordre de 2-5  $\mu$ m en fait un outil précis pour l'estimation de l'épaisseur. Schluep & Widmer ont pu mesurer la hauteur d'un dépôt de levures avec une précision de +/- 2  $\mu$ m, au cours d'une expérience de micro-filtration dans un module de filtration adapté à la technique. Ils ont ainsi validé un modèle décrivant la formation du dépôt de filtration et le déclin de flux associé (Schluep & Widmer, 1996). Hamachi & Mietton-Peuchot ont comparé l'effet de différentes conditions opératoires sur les caractéristiques des dépôts (perméabilité, résistance, porosité et compressibilité), le calcul de certaines de ces caractéristiques faisant intervenir la mesure de l'épaisseur, réalisée grâce à la technique laser (Hamachi & Mietton-Peuchot, 1999).



Figure 4 : Principe de la trigonométrie laser

Une autre technique optique pour évaluer l'épaisseur de dépôts est basée sur l'utilisation de photo-interrupteurs. Ces détecteurs sont composés d'un émetteur infra-rouge et d'un collecteur. Quand l'objet est près du détecteur, la lumière émise est réfléchie par sa surface dans le collecteur. Diminuer la distance entre l'objet et le détecteur entraîne une augmentation de l'intensité réfléchie. Tung *et al.*, 2001, ont pu mesurer l'évolution d'un dépôt dans une gamme de 10  $\mu$ m à 5 mm d'épaisseur avec une précision de 10  $\mu$ m. Néanmoins, un phénomène d'atténuation du signal apparaît lorsque la concentration de la solution d'alimentation augmente, ce qui implique que la technique est plus adaptée à la filtration de solutions peu concentrées.

Toutes ces méthodes sont utilisées pour la caractérisation de la structure globale d'agrégats biologiques ou non-biologiques, certains travaux ayant utilisé des particules de silice, de latex ou de la bentonite (Chen *et al.*, 1997 ; Hamachi *et al.*, 1999 (b); Zhang *et al.*, 2006) comme modèles de micro-organismes. En effet, l'une des difficultés rencontrées lors de l'étude des dépôts microbiens est liée à leur caractère évolutif car il s'agit de particules vivantes qui peuvent croitre, mourir ou se lyser et l'utilisation de modèles inertes facilite l'analyse des mécanismes mis en jeu. Lors d'études sur des agrégats biologiques réels composés de micro-organismes, la technique la plus utilisée pour caractériser la structure globale se base sur la coloration des micro-organismes grâce à des colorants fluorescents.

De nombreux fluorochromes sont couramment utilisés en biologie pour étudier la structure d'agrégats et/ou l'activité des micro-organismes à un instant donné, comme l'acridine orange, le Syto9<sup>®</sup>, l'iodure de propidium (IP), ou l'isothiocyanate de fluorescéine (Ivanov *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003; Takenaka *et al.*, 2001). Certains de ces marqueurs sont spécifiques de l'ADN (Syto 9), et/ou renseignent sur l'état physiologique des micro-organismes. Ainsi l'iodure de propidium n'est capable de diffuser que dans les cellules dont l'intégrité membranaire est altérée, que l'on assimile souvent à des cellules mortes et le Syto9<sup>®</sup> marque l'ADN de toutes les cellules. Leurs spectres d'excitation et d'émission étant bien distincts, ces deux colorants peuvent être utilisés conjointement.

Néanmoins, une des limites à l'utilisation de ces colorants fluorescents dans des structures microbiennes complexes est leur pénétration en profondeur qui peut être délicate. De plus, ces colorants sont spécifiques de molécules cibles, mais pas d'une espèce microbienne. Ainsi, dans le cas d'une structure microbienne mono-espèce, ils peuvent être utilisés pour l'étude de la structure globale (Takenaka *et al.*, 2001) et sont parfois couplés à d'autres composés. Par exemple des anticorps spécifiques de polysaccharides extracellulaires peuvent être associés à un colorant tel que le TRITC (Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate), un dérivé de la rhodamine (Horstkotte *et al ; 2006*), marquant la matrice. Néanmoins, dans le cas d'une structure complexe, si plusieurs espèces sont présentes dans l'écosystème, elles ne pourront pas être distinguées de cette façon. Les interactions cellules-cellules inter ou intra-espèces ne pourront donc pas être étudiées et il sera difficile d'expliquer l'impact précis de l'organisation interne de l'agrégat sur le procédé.

Certains phénomènes, rencontrés avec toute molécule fluorescente, peuvent causer des biais lors de l'analyse. C'est le cas par exemple du « bleaching » ou photoblanchissement et du « quenching ». Ces phénomènes ont pour conséquence une baisse du rendement de

fluorescence sans modifier le spectre d'émission. Dans le cas du bleaching, elle est due à une simple fuite de la fluorescence et dans le cas du «quenching» elle peut résulter d'une interaction entre différents fluorochromes, mais également d'un transfert d'énergie à des composés non fluorescents  $(0_2)$ .

Dans certains cas, le signal peut être perturbé par une fluorescence parasite liée à une émission de fluorescence naturelle des micro-organismes, comme certaines souches méthanogènes, ou à l'autofluorescence de composés entourant les micro-organismes (débris biologiques ou inorganiques, support...). Ces biais peuvent apparaître dans toute technique basée sur la fluorescence.

La technique que nous allons utiliser reposant sur un phénomène de fluorescence, le paragraphe suivant est consacré à la présentation de ce principe optique, ainsi que des dispositifs de microscopies permettant la visualisation des colorants ou micro-organismes fluorescents.

# 2.3. Microscopies de fluorescence

La fluorescence est un phénomène de photoluminescence qui, suite à une excitation lumineuse à une longueur d'onde donnée, se traduit par une émission de rayons lumineux à une autre longueur d'onde. D'autres phénomènes de luminescence existent, comme la chimiluminescence consécutive à une réaction chimique, ou la bioluminescence consécutive à une réaction enzymatique (Figure 5) (Poujol, 2006).



Figure 5 : Schéma des phénomènes de luminescence (Poujol, 2006)

Une molécule fluorescente possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission) (Valeur, 2004). Par définition, une molécule à l'état fondamental est dite stable et les molécules susceptibles de fluorescer possèdent un système d'électrons appariés dans un état stable. L'absorption d'un photon d'énergie suffisante entraîne le passage d'un des deux électrons qui se trouvait sur une orbitale de plus faible énergie à une orbitale d'énergie plus élevée, la molécule se trouvant alors dans un état dit " excité " et instable. La durée de vie d'un électron sur une orbitale de niveau d'énergie élevée est de l'ordre de quelques nanosecondes (Poujol, 2006 ; Valeur, 2004). L'électron revient donc très rapidement à un niveau S1, sans émettre de radiation, puis au niveau fondamental S0, avec émission de radiations (photons). Le diagramme de Jablonsky schématise l'ensemble du processus d'excitation et de désactivation (Figure 6).



Longueur d'onde (nm)  $\lambda$ 

Figure 6 : Diagramme de Jablonsky (Poujol, 2006)

Les photons émis par fluorescence ont une énergie plus faible que celle des photons absorbés. Ainsi, d'après la loi de Stockes, la longueur d'onde de la lumière d'émission sera plus élevée que celle de la lumière d'excitation. Le spectre d'émission de fluorescence sera donc décalé vers des longueurs d'ondes plus grandes que la longueur d'onde d'excitation. C'est ce qu'on appelle le déplacement de Stockes (Valeur, 2004).

La microscopie de fluorescence repose sur l'utilisation d'une radiation lumineuse pour éclairer un objet à une longueur d'onde « excitatrice », induisant ainsi l'émission de lumière à

une longueur d'onde différente (Valeur, 2004). Plusieurs types de microscopes peuvent être utilisés pour visualiser des échantillons fluorescents selon la résolution souhaitée ou pour observer des structures en 2D ou en 3D.

Une propriété clef du microscope est son pouvoir de résolution ou pouvoir de séparation. Il s'agit de sa capacité à distinguer deux points voisins. Plus le pouvoir résolutif est élevé, plus la limite de résolution (la distance entre les deux objets) est faible. Cette résolution (R) est dépendante des phénomènes de diffraction de la lumière, qui induisent la représentation d'un point par un disque appelé « disque d'Airy ». La limite de résolution dépend de la longueur d'onde d'excitation ( $\lambda$ ) et de l'ouverture numérique (ON), celle-ci dépendant de l'indice de réfraction du milieu (n) à la sortie de l'objectif et du demi-angle du cône de lumière maximum  $\alpha$  (Hell, 2007), selon la formule suivante :

$$R = \frac{0.61\lambda}{ON} = \frac{0.61\lambda}{n\sin\alpha}$$

Avec R la résolution,  $\lambda$  la longueur d'onde d'excitation, ON l'ouverture numérique, n l'indice de réfraction du milieu et  $\alpha$  le demi-angle du cône de lumière maximum.

• Microscope à fluorescence 2D :

Pour l'observation en 2D, on utilise des microscopes à fluorescence ou des microscopes à épifluorescence, le suffixe « épi » désignant les microscopes pour lesquels la lumière incidente (ou d'excitation) arrive sur le dessus de l'échantillon, tandis que pour les microscopes à fluorescence, la lumière incidente arrive en dessous de l'échantillon et traverse donc l'échantillon (Conchello & Litchman, 2005). Le principe de base du microscope à fluorescence ou épifluorescence est d'envoyer une lumière excitatrice (visible ou UV), en partie filtrée, sur l'échantillon puis de séparer la lumière de fluorescence émise du reste de la lumière excitatrice grâce à des filtres et un miroir dichroïque afin que seule la fluorescence correspondant en théorie seulement à l'objet fluorescent d'intérêt puisse être captée par une caméra ou l'observateur. Les objets non-fluorescents n'émettent pas de lumière et ainsi restent noirs, comme le fond. La combinaison de trois éléments permet la séparation de la lumière d'émission (Conchello & Litchman, 2005), à savoir :

- un filtre d'excitation qui permet une première sélection des longueurs d'ondes d'excitation,

- un filtre barrière qui ne laisse passer vers le détecteur que les longueurs d'ondes les plus élevées de la lumière émise,
- un miroir dichroïque qui reflète les plus petites longueurs d'ondes (celles correspondant à l'excitation) et ne laisse passer que les plus grandes longueurs d'ondes (celles correspondant à l'émission) en fonction des spectres d'excitation et d'émission du fluorochrome pour lequel il a été conçu.

Beaucoup de microscopes à fluorescence ou à épifluorescence fonctionnent avec des petits blocs-filtres, composés chacun d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre barrière, correspondant aux principaux fluorochromes utilisés. On peut ainsi disposer de plusieurs blocs-filtres sur un même microscope, afin de visualiser des fluorochromes différents sur un même échantillon. Un exemple de bloc-filtre conçu pour l'observation de la protéine Gfp (Green fluorescent protein) est présenté sur la figure ci-dessous (Figure 7). Les trois composants principaux (notés 2,3 et 4) ont des caractéristiques pour une visualisation optimale de la protéine Gfg. Le miroir dichroïque bascule de la réflexion à la transmission juste entre les pics d'absorption (ou d'excitation) et d'émission de la Gfp, qui sont représentés respectivement en bleu clair et vert clair.



<u>Figure 7 :</u> Détails d'un bloc-filtre conçu par Chroma Technologies pour exciter et détecter la protéine Gfp (Conchello & Litchman, 2005)

Le microscope à épifluorescence est adapté à la visualisation d'échantillons fluorescents tels que des cellules procaryotes ou eucaryotes marquées. Dans l'étude de dépôts, il a pu être utilisé avec une technique appropriée pour visualiser le dépôt des premières cellules sur une membrane. Cette technique (DOTM) non invasive développée par Li *et al* (Li *et al.*, 1998), a été décrite dans le premier chapitre afin d'observer *in situ* le dépôt de

particules en microfiltration tangentielle sur la surface d'une membrane transparente, puis de souches bactériennes (*Pseudomonas*) marquées par un fluorochrome (l'acridine orange) (Li *et al.*, 2003). Cette méthode présente l'intérêt d'être *in situ* et *in-vivo*, les micro-organismes pouvant être observés avec ou sans marquage (en fond clair ou en fluorescence). Néanmoins, dans l'application à l'étude d'échantillons plus épais, comme les agrégats, les images peuvent manquer de netteté à cause de la visualisation de la fluorescence émise hors focus, c'est-à-dire venant de plans supérieurs ou inférieurs (Emptage, 2001). Pour remédier à ce problème, il est possible de déconvoluer les images. Ce traitement permet grâce à un calcul, d'éliminer le flou dû à la fluorescence émise hors du plan focal. Néanmoins, une autre solution est d'utiliser des microscopes adaptés à l'étude de structures épaisses, permettant d'éliminer la fluorescence « hors focus », et ainsi de réaliser des prises de vue en 3D.

• Microscope à fluorescence 3D.

En microscopie de fluorescence 3D, on peut distinguer différents types de microscopie, dont la plus utilisée dans l'étude d'agrégats est la microscopie confocale, ou monophotonique, par opposition à la microscopie multiphotonique.

Les deux techniques sont des techniques de microscopie par balayage laser de fluorescence qui permettent une visualisation de tissus en 3 dimensions, en réalisant des coupes virtuelles de l'objet, et une analyse *in-situ et*/ou *in-vivo* selon le fluorochrome étudié. Nous présenterons ces deux techniques en réalisant une comparaison, en termes de limites et d'applications.

# § Microscopie confocale à balayage laser (CSLM)

La microscopie confocale est une technique moderne de microscopie de fluorescence et fait également partie de la microscopie optique. Elle vise à améliorer la microscopie de fluorescence conventionnelle dont un des inconvénients majeurs est la perte de résolution due à l'émission de fluorescence des plans inférieurs et supérieurs qui se superposent à l'image du plan focal. La microscopie confocale permet de pallier ce problème en utilisant un diaphragme (pinhole confocal) qui ne laisse passer que le rayonnement issu du plan focal. En observant ainsi des plans successifs, on pourra reconstituer l'image en 3D de l'objet (Héliot, 2006).

Dans ces microscopes, un deuxième diaphragme (pinhole d'illumination ou pinhole source) permet un éclairage focalisé en un point et un système de balayage spatial de l'échantillon est possible grâce à deux miroirs galvanométriques permettant ainsi l'obtention d'une image 2D d'un plan focal en faisant varier le champ parcouru en x et en y. En déplaçant ensuite l'objet en z dans l'espace optique grâce à un mouvement de la platine, on obtient « une pile d'images », dont chacune correspond à une vue en xy d'un plan focal donné. L'avantage est de fournir un axe d'illumination constant selon l'axe z, mais peut présenter un inconvénient si l'échantillon est très sensible aux déplacements de la platine, car ceux-ci pourront générer des mouvements ou des modifications structurales dans l'objet (Emptage, 2001; Conchello & Litchtman, 2005).

L'utilisation d'une source lumineuse LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) ainsi que la taille réduite du champ éclairé permettent d'obtenir une résolution latérale légèrement supérieure à celle obtenue avec un microscope optique classique (Stelzer, 2000) (Tableau 2).

<u>**Tableau 2 :**</u> Résolution radiale et/ou axiale du microscope à épifluorescence (2D) et du microscope confocal pour deux objectifs différents à une longueur d'onde excitatrice  $\lambda = 500$  nm (Stelzer, 2000)

Objectifs	Résolution radiale	Résolution radiale	Résolution axiale
	Microscope 2D en	Microscope 3D en	Microscope 3D en
	μm (épifluorescence)	μm (confocal)	μm (confocal)
40 X (eau)	0,23	0,16	0,47
100 X (huile)	0,19	0,14	0,38

Grâce à l'existence de plusieurs lasers, un laser correspondant à une valeur de longueur d'onde, on peut également visualiser simultanément plusieurs fluorochromes dans un même échantillon. La limitation dans l'utilisation d'un nombre important de fluorochromes réside dans les caractéristiques spectrales de chacun afin d'obtenir une bonne discrimination des différents fluorochromes.

Le microscope confocal est relié à un système informatique qui permet à la fois de régler les paramètres de l'acquisition et de stocker les données récupérées de l'échantillon. Des photomultiplicateurs (PMT) permettent la conversion du signal lumineux (photons) en signal électronique (électrons) au niveau d'une photocathode, les électrons étant ensuite multipliés grâce à plusieurs électrodes (dynodes) dans un tube multiplicateur.

Des logiciels de reconstruction ou de traitement d'image permettent ensuite de visualiser l'échantillon en 3D, de réaliser des coupes virtuelles, de n'observer qu'un des

fluorochromes utilisés, de réaliser des mesures physiques (épaisseur, volume de l'échantillon,...) ainsi que de déterminer des co-localisations.

Une des limites du microscope confocal pour l'étude de phénomènes dynamiques est le temps d'acquisition qui peut être élevé (Conchello & Lichtman, 2005) et qui dépend de plusieurs paramètres :

la vitesse du balayage laser : elle peut être réglée, mais si on augmente la vitesse du laser
(ou la fréquence de balayage), on perd de l'information et l'image risque d'apparaître plus
« bruitée »,

- l'épaisseur de l'échantillon à analyser : plus l'échantillon est épais et plus la durée d'acquisition sera importante. On peut réduire le pas, c'est-à-dire la distance entre chaque focus analysé, mais dans ce cas, on perd de l'information en z. Ceci est à adapter selon l'étude réalisée,

 le « moyennage » réalisé sur un plan focal : plusieurs acquisitions du même plan focal peuvent être réalisées et une moyenne de ces acquisitions est ensuite effectuée par l'ordinateur. Cette méthode est couramment utilisée pour éliminer du bruit de fond et améliorer la qualité des images.

- du mode d'acquisition : séquentiel ou non. Dans le cas de l'étude d'un échantillon comportant deux fluorochromes A et B, si l'acquisition est réalisée en mode séquentiel, le balayage d'un plan focal peut être réalisé avec un laser correspondant à un fluorochrome A, puis avec un deuxième laser correspondant à un fluorochrome B. Le temps d'acquisition est alors doublé par rapport à un balayage simple. Dans certains cas, on peut réaliser le balayage avec les deux lasers en même temps, mais cela dépend des spectres d'excitation et d'émission des fluorochromes utilisés.

Les microscopes à balayage laser les plus récents ont cependant un mode « focus » qui permet cinq prises d'images par seconde. Bien que ces images apparaissent souvent très bruitées, ce mode peut être utilisé pour accélérer l'acquisition et trouver un point particulier dans un échantillon (Conchello & Lichtman, 2005).

Du fait de la fluorescence des molécules étudiées, des phénomènes de « bleaching » et de « quenching », définis précédemment, peuvent apparaître. Ils dépendent de la stabilité du fluorochrome étudié, mais également des paramètres d'acquisition, comme de la puissance du laser utilisé.

Pour pallier ces différents problèmes, améliorer la résolution et l'observation d'objets épais, la microscopie multiphotonique a été développée, en particulier la microscopie biphotonique qui est la plus utilisée.

# § Microscopie biphotonique

La microscopie biphotonique, plus récente que la microscopie confocale, est surtout utilisée en biologie cellulaire pour suivre de manière dynamique les événements moléculaires à l'intérieur d'une cellule vivante. Des améliorations techniques par rapport à la microscopie confocale telle que la capacité de pénétration plus profonde du laser dans l'échantillon en fait un outil qui peut se montrer intéressant pour l'étude d'agrégats. La microscopie biphotonique repose sur l'absorption « quasi-simultanée » par un atome ou une molécule de deux photons de longueurs d'ondes élevées (Denk *et al.*, 1990 ; Guiot, 2001). L'excitation se fait par des lasers femtosecondes permettant des impulsions de très courte durée (< 200 fs).

Du fait que l'énergie d'un seul photon de longueur d'onde élevée est insuffisante pour exciter des fluorochromes situés dans des plans focaux supérieurs et inférieurs, l'excitation (et donc l'émission) se situe(nt) dans une zone ellipsoïdale de petit volume autour du point focal, où le flux de photons est suffisamment élevé pour entraîner des phénomènes d'absorption de deux photons, permettant ainsi l'excitation du fluorochrome (Figure 8). Les phénomènes de « bleaching » ou de « quenching » sont alors limités au micro-volume de focalisation.



**Figure 8 :** Distribution spatiale de la fluorescence émise par de la fluorescéine dans un plan x-z lors de l'excitation laser à 488 nm en microscopie confocale, et lors de l'excitation par des pulses de lumière à 850 nm en microscopie biphotonique. Les lignes blanches indiquent le plan focal (Rubart *et al.*, 2004)

Divers autres avantages ont été décrits dans la littérature (Brakenho *et al.*, 1996; König *et al.*, 1996; Dufour *et al.*, 2006):

Le rayonnement utilisé est quasi inoffensif pour les cellules vivantes. En effet, la source de lumière étant dans l'infrarouge, elle est moins agressive que certains lasers pour les tissus vivants ou les rayonnements UV utilisés pour certains colorants fluorescents comme le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole).

Un avantage majeur, notamment pour l'étude d'agrégats biologiques réels, est la nette augmentation de la profondeur de pénétration dans l'échantillon. En effet, les coefficients d'absorption de la plupart des composants biologiques sont plus faibles dans l'infrarouge que dans l'ultraviolet, ce qui permet une pénétration du faisceau laser supérieure à celle obtenue en microscopie confocale. Vroom *et al.*, ont réalisé des études comparatives en microscopie confocale et biphotonique sur des biofilms marqués à la rhodamine. Ils ont pu montrer qu'à une profondeur de 140  $\mu$ m, l'intensité de fluorescence captée par le microscope biphotonique est 15 fois plus élevée que celle captée par le microscope confocal (Vroom *et al.*, 1999). Hughes *et al* ont également utilisé la microscopie bi-photonique pour observer la formation de dépôts de levures mais ont été confrontés à un problème de visualisation des dépôts au-delà d'une quarantaine de microns, qu'ils estiment être du à la densité trop forte du dépôt (Hughes *et al.*, 2006). Dufour *et al.*, 2006, ont réalisé un tableau comparatif de la microscopie confocale et biphotonique (tableau 3).

Stewart *et al.*, 1995, ont comparé trois méthodes de visualisation de la structure d'un biofilm : la microscopie électronique à balayage, la microscopie confocale à balayage laser, et des cryo-coupes suivies d'une observation microscopique. Il s'agissait d'un biofilm mixte modèle, composé de *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. Même si les trois méthodes ont pu mettre en évidence une structure hétérogène, d'épaisseur et de densité cellulaire et polymérique variables, les approches par CSLM et les cryocoupes se sont montrées plus intéressantes par leur capacité à pénétrer dans l'intérieur du biofilm, et surtout par leurs potentialités à fournir des informations quantitatives en plus des informations qualitatives associées à l'image.

	Microscopie confocale	Microscopie à deux photons	
Sources laser utilisées	Continue, visible UV : 350 nm Argon-ion : 457, 488 et 514 nm Hélium – néon : 543 nm Hélium – néon : 633 nm	Pulsé, proche infrarouge Ti : saphir centré à 800 nm (systèmes commerciaux typiquement accordables de 750-1100 nm ; 100 -200 fs à un taux de répétition de 80 MHz)	
Systèmes d'acquisition	Balayage laser (galvanomètres, déflecteurs acousto-optiques) Disque rotatif	Balayage laser (galvanomètres, déflecteurs acousto-optiques)	
Limite de résolution	Limitée par la diffraction	Limitée par la diffraction	
Mode d'excitation	Par absorption d'un photon ; linéaire, ∞ intensité ; volume d'excitation large dans un milieu absorbant	Par absorption de deux photons ; non linéaire,∞ (intensité)²; volume d'excitation restreint dans un milieu absorbant	
Mode de collection	Réflexion (épicollection)	Réflexion (épicollection) et transmission (transcollection) avec tranches de tissu	
Sténopé	Oui	Non	
Limites pratiques de profondeur d'imagerie (sans compromis de résolution)	~ 100 µm	~ 1000 µm	
Avantages	Source de laser multiples et peu coûteuse Compatible avec un disque rotatif	Minimisation du point focal en tissu épais : - meilleure résolution axiale - imagerie plus en profonduer - minimisation de la toxicité - simplification du système - augmentation de la sensibilité (aucune élimination de signal)	

Tableau 3 : Comparaison entre la microscopie confocale et la microscopie biphotonique (Dufour et al., 2006)

Compte-tenu des avantages que présentent les techniques microscopiques utilisant la fluorescence, et compte tenu des appareils disponibles au laboratoire, la microscopie confocale 3D sera utilisée pour caractériser nos agrégats biologiques. Le microscope à épifluorescence 2D sera utilisé pour les observations de cellules planctoniques.

Toutes ces techniques de caractérisation des agrégats permettent d'obtenir des informations sur la structure globale des dépôts biologiques, néanmoins, pour obtenir des informations sur la structure locale et notamment sur l'identification des différentes souches microbiennes en présence, d'autres techniques sont utilisées et sont présentées dans le paragraphe ci-dessous.

## 3. Structure locale : identification des souches présentes dans l'agrégat

# 3.1. Méthodes classiques : culture sur milieu spécifique, galerie API, colorations

Les méthodes traditionnelles d'identification des micro-organismes reposent sur leur isolement et requièrent souvent des étapes préliminaires de culture et enrichissement sur des milieux spécifiques sélectifs. De ce fait, les procédures d'isolement à partir d'écosystèmes complexes peuvent être fastidieuses et les temps de réponse sont souvent de plusieurs jours, selon les cinétiques de croissance des souches (Wagner *et al.*, 1993 ; Choi *et al.*, 1994). Or de nombreuses espèces, comme par exemple des espèces rencontrées dans des biofilms de traitement d'eau, ont des taux de croissance très faibles, qui nécessitent des temps d'incubation très long (supérieur à un mois) (Belser, 1979 ; Amann *et al.*, 1997). En outre, d'autres espèces ne sont pas cultivables et donc ni détectables ni quantifiables par ces techniques microbiologiques (Wagner *et al.*, 1993).

Des galeries API dans lesquelles sont miniaturisés les tests conventionnels d'identification bactérienne (recherche d'une enzyme, fermentation d'un sucre,...) peuvent permettre de remonter au genre ou à la souche même (Moter & Gobel, 2000). L'incubation pendant 12 à 24h étant nécessaire, les mêmes limites que précédemment concernant les souches non cultivables ou à faible taux de croissance peuvent donc être rencontrées.

Des techniques rapides sans remise en culture ont été développées afin d'aider à l'identification. C'est le cas des observations microscopiques couplées à des colorations ou des marquages permettant de mettre en évidence quelques grandes caractéristiques des microorganismes (Gram, Ziehl-Neelsen). Ces techniques ne donnent cependant que des informations partielles et sont difficilement applicables aux agrégats microbiens. En effet, leur structure devra être désagrégée ce qui peut endommager certains micro-organismes et la pluralité des souches pouvant être présentes rend l'analyse délicate (Amann *et al.*, 1997).

# 3.2. Méthodes d'immunofluorescence

Les méthodes d'immunofluorescence, plus précises que la microscopie traditionnelle avec coloration, sont basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux plus ou moins spécifiques liés à des fluorochromes qui viennent se fixer sur les micro-organismes cibles (antigènes). Cette technique nécessite cependant une connaissance *a priori* des microorganismes présents dans l'échantillon (Amann *et al.*, 1997). En outre, l'immunofluorescence peut être difficile à utiliser dans le cas de structures complexes compactes telles que les biofilms, la taille parfois importante des anticorps marqués pouvant rendre difficile leur accès aux antigènes (Szwerinski *et al.*, 1985). De plus, les exopolymères présents à la surface des bactéries peuvent perturber la réaction immunitaire (Moter & Gobel, 2000).

# 3.3. Méthodes de chimiotaxonomie

La chimiotaxonomie se base sur l'analyse qualitative et quantitative des constituants cellulaires pour identifier les micro-organismes, à condition qu'ils présentent une spécificité cellulaire ou métabolique. Les principaux constituants étudiés sont les quinones du cycle respiratoire (Hiraishi *et al.*, 1998), les polyamines (Auling *et al.*, 1991), les phospoholipides (Diab El Arab *et al.*, 2001) et les acides mycoliques (Levy-Frebault *et al.*, 1986). La chimiotaxonomie peut présenter des inconvénients tels que le manque de spécificité, si plusieurs populations sont en présence, car certains composés typiques d'une espèce, comme le diaminopropane, une polyamine typique des *acinetobacter*, peuvent également être produits par d'autres espèces. De plus la variation de la concentration des composés dosés en fonction de l'étape du cycle cellulaire ou des changements dans l'environnement peut entraîner de nombreux biais lors du dosage (Amann *et al.*, 1997).

Afin de pallier le manque de spécificité de certaines de ces techniques (classique, immunofluorescence, chimiotaxonomie) et identifier les différentes espèces sans devoir réaliser de remise en culture, les progrès en biologie moléculaire ont permis le développement de nouveaux outils.

#### 3.4. Empreintes moléculaires et sondes moléculaires

Des techniques de biologie moléculaire ont été récemment mises au point pour l'identification de micro-organismes dans les agrégats, plus particulièrement pour les biofilms et les flocs. Elles reposent sur deux catégories d'outils (Dabert *et al.*, 2002) (Figure 9):

- l'analyse des fragments d'acides nucléiques (ADN) extraits de la totalité de la population appelée techniques « d'empreintes moléculaires », qui ne repose sur aucun *a priori* quant à la composition du consortium microbien (A Figure 9).

- l'utilisation de sondes moléculaires, une sonde correspondant à un fragment de nucléotides qui permet de rechercher de manière spécifique un fragment cible d'acide nucléique avec lequel elle s'apparie. Cette technique permet de rechercher des micro-organismes particuliers et nécessite la connaissance de séquences génomiques spécifiques des populations recherchées (familles, genres, espèces) (B Figure 9).



Figure 9 : Stratégies de biologie moléculaire utilisées pour analyser des communautés microbiennes à l'aide d'empreintes moléculaires (A) ou de sondes moléculaires (B) (Dabert *et al.*, 2002).

# • Empreintes moléculaires pour l'analyse de la diversité

L'analyse des fragments d'ADN ne nécessite pas de pré-requis sur la composition de la communauté microbienne (Dabert *et al.*, 2002). Ces techniques reposent sur l'extraction de l'ADN total contenu dans l'échantillon prélevé. Les analyses sont donc *ex-vivo* et *ex-situ*, elles permettent d'accéder à la composition du consortium microbien mais ne peuvent donner aucune information sur la structure de l'agrégat ni sur l'organisation des micro-organismes au sein de celui-ci. L'identification des espèces est généralement basée sur ADNr 16S pour les procaryotes, et l'ADNr 18S pour les eucaryotes ou l'analyse de la séquence intergénique

ADNr 16S-ADNr 23S (ADNr 18S-ADNr 28S pour les eucaryotes), ces séquences étant spécifiques pour chaque souche (Fisher & Triplett, 1999 ; Dabert *et al.*, 2002).

Pour ces méthodes d'empreintes moléculaires, une étape d'amplification par PCR de l'ADN ribosomal, dit ADNr, est nécessaire. Cette amplification repose sur l'utilisation d'amorces, qui sont de petites séquences d'ADN venant s'hybrider et délimiter la zone d'intérêt de l'ADNr à amplifier. Cette étape reste délicate, car elle peut générer de nombreux biais, du fait par exemple d'un manque de spécificité des amorces ou des erreurs commises par l'enzyme servant à la réplication de la zone d'intérêt, créant des mutations sur le fragment amplifié (Suzuki & Giovannoni 1996; Becker *et al.*, 2000 ; Qiu *et al.*, 2001).

Suite à l'amplification, différentes techniques de séparation et d'identification peuvent être employées (Figure 10):

Des méthodes d'électrophorèse en conditions dénaturantes chimiques « DGGE » (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) ou thermique « TGGE » (Thermal Gradient Gel Electrophoresis), qui s'appuient sur les différences de stabilité du double brin d'ADN selon sa « teneur » en base azotées Guanine (G) et Cytosine (C). En effet, ces bases sont liées par trois liaisons hydrogènes, tandis que les liaisons hydrogènes entre les molécules d'Adénine (A) et de Thymine (T) sont au nombre de deux. Un ADN « riche » en G-C sera donc plus stable qu'un ADN « pauvre » en G-C. Les différentes molécules d'ADNr 16S sont ainsi séparées lors de l'électrophorèse avec un gradient dénaturant (Muyzer, 1999 ; Lyautey *et al.*, 2005).

La méthode « SSCP » (Single Strand Conformation Polymorphism) permet de séparer des fragments d'ADN simple brin en fonction des différences de leur structure secondaire liées à leur polymorphisme (Rochex *et al.*, 2008 ; Lünsdorf *et al.*, 2002).

Les méthodes « T-RFLP » (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) et « ARDRA » (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) reposent sur la séparation du mélange de molécules d'ADNr 16S selon la taille des fragments obtenus après l'utilisation d'une enzyme de restriction (Rousseaux *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2007).

La technique « RISA » (rRNA Intergenic Spacer Analysis) s'appuie sur la différence de longueur des séquences intergéniques ADNr16S-ADNr23S d'un micro-organisme à l'autre (Fisher & Triplett, 1999).

Dans toutes ces méthodes, la composition de la communauté microbienne se traduit par un ensemble de pics (SSCP, T-RFPL) ou de bandes (ARDRA, T/DGGE, RISA) caractéristiques des populations présentes ou du moins de celles dont une quantité d'ADN suffisante a pu être extraite. On peut donc suivre l'évolution d'une ou de plusieurs populations au sein de l'agrégat.



Figure 10 : Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans les techniques d'empreintes moléculaires (Dabert *et al.*, 2002).

Ces techniques dites d'empreintes moléculaires permettent de réaliser une analyse des espèces ou des communautés microbiennes présentes dans l'agrégat, sans nécessiter de remise en culture, mais n'apportent pas d'informations sur l'organisation de l'agrégat, car celui-ci doit être déstructuré pour extraire l'ADN.

• Empreintes moléculaires pour l'analyse de l'activité d'un gène particulier

L'activité d'un gène d'intérêt peut aussi être spécifiquement analysée par des techniques moléculaires. Pour cela, une extraction de l'ARN est nécessaire, suivi d'une transcription inverse de l'ARN en ADNc, dit « ADN complémentaire ». L'ADNc est ensuite analysé par les techniques d'empreintes moléculaires décrites ci-dessus (Girvan *et al.*, 2004 ; Bastias *et al.*, 2007).

• Sondes moléculaires

L'approche par sondes moléculaires est basée sur l'utilisation de séquences oligonucléotidiques marquées, qui vont se fixer sur les séquences correspondantes du ou des micro-organismes ciblés du fait de leur complémentarité. Une sonde moléculaire est une séquence d'ADN monobrin dont la taille est généralement comprise entre 15-30 nucléotides (Moter & Gobel, 2000). Les séquences cibles sont généralement des séquences d'ARN ribosomal appelées ARNr 16S chez les procaryotes, ARNr 18S chez les eucaryotes qui sont des régions conservées spécifiques de chaque souche (Kosse *et al.*, 1997 ; Dabert *et al.*, 2002 ; Moter & Gobel, 2000). Il y a plusieurs copies dans chaque cellule, ce qui augmente la sensibilité de la technique et permet de mettre en évidence des cellules difficilement cultivables, présentes en faible quantité (Aoi, 2002). Néanmoins, si une cellule est peu active, elle contiendra peu de copies d'ARNr (Moter & Gobel, 2000).

Parmi les méthodes basées sur l'hybridation moléculaire, on peut trouver les techniques d'hybridation dot blot et FISH (Fluorescent in-situ hybridization), ces deux techniques sont *ex-vivo*, les micro-organismes devant être préalablement fixés ou lysés (Amann *et al.*, 1997; Moter & Gobel, 2000; Dabert *et al.*, 2002).

L'hybridation dot-blot nécessite l'extraction des acides nucléiques de la cellule, qui sont ensuite déposés sur une membrane et hybridés avec des sondes marquées (radioactivité, chemiluminescence, fluorescence) (Raskin *et al.*, 1994). Les résultats sont en général exprimés par la proportion de micro-organismes détectés par une sonde spécifique par rapport à la communauté microbienne totale détectée par des sondes universelles (sondes non spécifiques, sondes de famille taxonomique).

Pour la méthode FISH, l'hybridation est réalisée sur des cellules entières fixées et perméabilisées, avec des sondes oligonucléotidiques marquées à l'aide d'un fluorochrome (Figure 11). Après une étape de lavage, qui élimine les sondes non hybridées, les cellules marquées sont observées en microscopie de fluorescence (épifluorescence ou confocale) ou analysées par cytométrie en flux (Amann *et al.*, 1990 a et b). Comparativement à des sondes

radioactives, les sondes fluorescentes ne présentent pas de danger lié à la radioactivité et elles offrent une meilleure résolution lors de la détection. Un autre avantage du FISH est que plusieurs sondes peuvent être marquées avec des fluorochromes différents émettant à des longueurs d'ondes spécifiques, ceci permettant la détection simultanée de différentes populations lors d'une même étape d'hybridation (Moter & Gobel, 2000).

La méthode FISH permet également de combiner la précision de la génétique moléculaire avec les techniques d'observation en 3D (microscopie confocale) pour identifier et visualiser individuellement des cellules dans leur habitat naturel. Cette technique est couramment utilisée pour étudier l'organisation des différentes populations microbiennes au sein d'agrégats tels que les flocs et les biofilms (Tolken-Nielsen & S. Molin, 2000, Chen *et al.*, 2004; Weber *et al.*, 2007; Wilen *et al.*, 2008).

Néanmoins, des étapes préliminaires, telles que des étapes de fixation et/ou de traitement, sont nécessaires. Par exemple une fixation au paraformaldéhyde ou l'utilisation de lysozyme est parfois essentielle pour faciliter la pénétration des sondes chez des bactéries possédant des parois épaisses (bactéries Gram -, ...). Ces étapes doivent être adaptées à chaque souche microbienne et en outre ne permettent pas de réaliser des analyses en temps réel (Wagner *et al.*, 1998 ; Moter & Göbel, 2000). De plus, les analyses *in-situ* sont délicates et souvent difficiles à réaliser, la technique ne permettant pas de traiter des biofilms ou des structures épaisses dans leur intégralité, ils doivent souvent être déstructurés (Moter & Göbel, 2000). Il existe néanmoins des méthodes cryogéniques, qui consistent à congeler l'échantillon puis à réaliser de fines coupes, sur lesquelles le marquage peut être effectué. L'épaisseur de l'échantillon ou des coupes réalisées est donc une limite majeure de la technique FISH, la pénétration des sondes étant délicate à estimer (Moter & Göbel, 2000 ; & Molin, 2000 (b)) et pouvant entraîner des biais consécutifs à une absence de marquage.



Figure 11 : Etapes de traitement nécessaires pour l'identification et la visualisation de souches marquées par la méthode FISH

Les approches développées pour des études locales visant à l'identification et l'étude de l'organisation des différentes espèces microbiennes au sein d'agrégats biologiques nécessitent des étapes de préparation qui ne permettent pas des études *in-situ* ni *in-vivo*. Néanmoins, assez récemment, la possibilité de construire des micro-organismes autofluorescents a permis de réaliser des approches *in-vivo* et parfois *in-situ* pour l'identification et la localisation des micro-organismes modèles dans des agrégats biologiques.

# **II - Micro-organismes autofluorescents**

# 1. Origine et propriétés des protéines fluorescentes.

La première protéine fluorescente utilisée de façon large en biologie a été la Gfp ou Green Fluorescent Protein. Il s'agit d'une petite protéine de 238 acides aminés (20 kDa environ), isolée pour la première fois en 1962 d'une méduse (*Aequora victoria*) vivant dans les eaux du nord-ouest de l'océan Pacifique par le japonais Osamu Shimomura (Figure 12). Cette méduse synthétise deux molécules, l'une baptisée aequorine émet en présence de calcium et d'oxygène une lumière bleue ( $\lambda$  : 395 nanomètres) qui est capable d'exciter ensuite une seconde molécule (la Gfp), laquelle réémet une lumière verte ( $\lambda$  : 508 nanomètres) (Yang *et al.*, 1996, Stepanenko *et al.*, 2008).



Figure 12 : Vue du dessus de la méduse *Aequoria victoria* éclairée à la lumière du jour (à gauche) et dans le noir lorsqu'elle exprime la Gfp (à droite) (Shimomura ; 2009)

Le gène codant pour la protéine Gfp ne fut cloné qu'en 1992, et en 1994 Martin Chalfie réussit à faire exprimer cette protéine par d'autres organismes couramment étudiés en laboratoire, la bactérie *Escherichia coli* et le ver *Caenorhabditis elegans* (un nématode) (Chalfie *et al.*, 1994). Ces résultats suggérèrent que la protéine Gfp pouvait être utilisée en fusion avec d'autres protéines afin d'étudier le comportement *in-vivo*. L'année suivante, Roger Tsien réussit à mettre au point des variantes de la protéine Gfp de couleurs différentes, obtenues par mutation de son gène (Tsien *et al.*, 1998). Le bleu, le cyan et le jaune vinrent ainsi compléter le vert naturel de la Gfp issue de la méduse.

Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien ont été récompensés en 2008 par le prix nobel de chimie pour la découverte de la protéine fluorescente Gfp et la mise au point de son utilisation comme biomarqueur (Stepanenko *et al.*, 2008 ; Shimomura, 2009).

Plusieurs protéines fluorescentes sont utilisées en biologie. Elles sont simplement dérivées de la Gfp par quelques mutations ponctuelles, mais peuvent également être issues d'autres organismes comme de l'anémone *Discosoma* sp., rencontrée sur les récifs coraliens, dont la protéine fluorescente Rfp « Red Fluorescent Protein » possède également des protéines dérivées (Hadjantonakis *et al.*, 2001 ; Shaner *et al.*, 2004 ; Dunn *et al.*, 2006)

Ces protéines ont des spectres d'absorption et d'émission différents, avec des maxima d'émission dans le rouge (Rfp), le jaune (Yfp), le bleu-cyan (Cfp) ou le bleu (Bfp). Elles peuvent être exprimées dans diverses cellules, permettant ainsi le marquage de protéines particulières (Figure 13). Les deux protéines fluorescentes qui seront utilisées dans notre projet sont issues de la Gfp et de la Rfp, présentées plus en détail ci-dessous (Chudakov *et al.,* 2005 ; Shaner *et al.,* 2005). Quelques applications issues de ces protéines fluorescentes seront présentées au chapitre suivant.



Figure 13 : Spectres d'absorption et d'émission des protéines fluorescentes les plus courantes

# 1.1. La protéine Gfp

Elle est la protéine fluorescente la plus employée par les biologistes cellulaires en tant que marqueur dans des cellules vivantes. Elle adopte spontanément une conformation dans laquelle elle a des propriétés de fluorescence (absorption d'énergie lumineuse d'une certaine longueur d'onde et émission de lumière à une longueur d'onde supérieure). Son maximum d'émission est dans le vert. Le pic prédominant d'excitation de la Gfp native issue de la méduse est à 395 nm, avec un pic mineur à 475 nm (Heim *et al.*, 1994).

Comme indiqué précédemment, la protéine Gfp est une petite protéine, approximativement 20 kDa, constituée de 238 acides aminés, organisés en 11 brins  $\beta$  antiparallèles et une hélice  $\alpha$  centrale. On parle d'une structure en « $\beta$ -can ». Les acides aminés 2 à 229 sont impliqués dans la réaction de fluorescence et les extrémités N-terminale et C-terminale sont accessibles pour la fusion avec d'autres protéines (Tsien *et al.*, 1998).

Le chromophore (centre actif responsable de la fluorescence) est constitué par les chaînes latérales d'une glycine (aa67), une tyrosine (aa66) et une sérine (aa65). Il se forme après cyclisation et oxydation des trois acides aminés de l'hélice centrale. Des études de l'expression de Gfp chez *E. coli* recombinant ont permis de préciser ce mécanisme en proposant un modèle dans lequel une première étape de cyclisation rapide aurait lieu entre la sérine en position 65 et la glycine en position 67 pour former un intermédiaire imidazolinone (Figure 14). Cette étape serait suivie par une étape beaucoup plus lente, donc limitante, d'oxygénation par l'O<sub>2</sub> de la tyrosine en position 66 (Cubitt *et al.*, 1995 ; Yang *et al.*, 1996 ; Tsien *et al.*, 1998). Le rôle de l'O<sub>2</sub> apparaît donc comme déterminant pour une utilisation correcte de la protéine Gfp.



Figure 14 : Mécanisme de formation du chromophore de la protéine Gfp proposé par Cubitt *et al.*, 1995. (Figure tirée des travaux de Tsien *et al.*, 1998).

La protéine Gfp native forme des dimères chez *A. victoria*. La forme dimérique est impliquée dans les interactions physiques avec l'aequorine chez cet organisme, qui sont nécessaires au phénomène de transfert d'énergie qui permet l'excitation de la protéine Gfp. Une fois extraite et mise en solution, la structure monomérique ou dimérique dépend de sa concentration. Lorsqu'elle est à une concentration inférieure à 2 mg/mL la protéine est sous forme monomérique. Au-delà de 5 mg/mL, elle est sous forme dimérique (Chalfie, 1995). La force ionique en particulier intracellulaire joue également un rôle sur le phénomène de dimérisation : dans le cytoplasme des cellules eucaryotes ou procaryotes, où des protéines Gfp recombinantes sont souvent exprimées, la formation des dimères est favorisée (Chalfie, 1995).

Bien qu'aucun co-facteur connu ni aucun composé enzymatique ne soient nécessaires pour cette réaction apparemment auto-catalytique, la production (ou synthèse) de la protéine Gfp est fonction de la température : une diminution de la production de protéine Gfp est observée pour des températures supérieures à 30°C. Cependant une fois produite, la protéine Gfp est stable pour des températures allant jusqu'à 65°C et dans une gamme de pH allant de 5,5 à 12. La structure de la protéine semble la rendre très stable et des études physiques et chimiques sur la protéine Gfp purifiée ont montré qu'elle était très résistante à la dénaturation et qu'un traitement avec de la guanidine hypochlorique à 90°C ou un pH inférieur à 4 ou supérieur à 12 était nécessaire pour la dénaturer. Par ailleurs le phénomène peut être réversible et une « renaturation » partielle ou quasi-totale se produit dans les minutes qui suivent une inversion des conditions de dénaturation par dialyse ou neutralisation (Ward & Bokman, 1982 ; Yang *et al.*, 1996).

Le rôle de l'oxygène dans l'oxydation de la tyrosine et sur la fluorescence de la protéine reste paradoxal. En effet, la molécule d' $O_2$  est nécessaire à la formation d'une double liaison entre deux carbones de la tyrosine, renforçant la structure aromatique de la protéine, mais l'oxygène ne doit pas entrer trop fréquemment en contact avec le fluorophore pour éviter les phénomènes de « quenching », c'est-à-dire une diminution du rendement de fluorescence ou des dommages photochimiques (Yang *et al.*, 1996).

L'utilisation de la protéine sauvage Gfp comme marqueur fluorescent peut cependant être restreinte par une maturation limitée à des températures proches de 37°C (cas des cellules de mammifères). Une autre limite à l'utilisation de ce marqueur est une faible intensité de fluorescence lorsqu'on l'excite avec une lumière bleue. Pour améliorer les propriétés de la Gfp d'*Aequoria* des variants ont été construits, dont la EGfp (pour Enhanced Gfp), qui contient une substitution de la sérine 65 par une thréonine ce qui permet d'augmenter de 35 fois l'émission de la protéine par rapport à sa forme sauvage. Le pic prédominant d'excitation de la protéine EGfp est à 488 nm, avec un pic d'excitation à 508 nm. C'est cette protéine EGfp qui sera utilisée dans notre étude (Tsien *et al.*, 1998).

# 1.2. La protéine Rfp

Bien que de nombreux variants dérivés de la Gfp d'*A. victoria* émettent dans le bleu, le cyan et le vert, aucun n'émet à des longueurs d'ondes supérieures à 529 nm (Tsien, 1998). La découverte de protéines similaires à la Gfp de l'espèce *Anthozoa* et émettant à des longueurs d'ondes plus élevées a permis une augmentation notable du nombre de couleurs disponibles pour des applications en biologie. Matz *et al.*, ont cloné six protéines fluorescentes naturelles de l'espèce *Anthozoa* (Matz *et al.*, 1999), toutes similaires de 26 à 30 % entre elles (Stepanenko *et al.*, 2008). Dans leur milieu naturel, le rôle supposé de ces protéines serait qu'elles constituent un système photobiologique qui régule l'environnement lumineux des tissus de leur hôte : en cas de faible luminosité, ces protéines peuvent augmenter la disponibilité de la lumière (Schlichter *et al.*, 1986), et à l'inverse si la luminosité est élevée, elles ont une fonction protectrice (Salih *et al.*, 2000). Une protéine, la DsRed (présentant 26 % d'homologie avec la protéine Gfp d'*A. victoria* (Patterson *et al.*, 2001)), a été clonée à partir d'une espèce de *Discosoma* et présente un spectre d'émission dans le rouge. Elle a un maximum d'excitation à 558 nm et un maximum d'émission à 583 nm. Cette protéine, comme toutes celles qui fluorescent dans le rouge ou l'infra-rouge, peut être combinée à d'autres protéines fluorescentes de longueurs d'onde d'excitation et d'émission plus courtes pour du marquage multi-couleur ou des expériences de FRET (fluorescent resonance energy transfer) (voir paragraphe II-3) (Mizuno *et al.*, 2001). La résistance de la protéine mature DsRed au photoblanchissement ou « bleaching », à certains dénaturants et aux variations de pH de 4,5 à 12 la rend comparable aux rhodamines en écartant toutefois la toxicité potentielle de ces colorants (Baird *et al.*, 2000).

La diversité de couleurs des protéines fluorescentes est due à de légères modifications de structure tridimensionnelle de la protéine s'expliquant par la présence d'acides aminés différents ou à une réaction de maturation supplémentaire donnant naissance à des liaisons supplémentaires (Stepanenko *et al.*, 2008).

La Gfp et la Rfp diffèrent par leur structure : la Gfp forme des dimères tandis que les Rfp (dont la protéine DsRed) forment des tétramères. Chaque monomère est en contact avec le ou les monomères protéiques adjacents par le biais d'interfaces chimiques. La tétramérization des protéines natives fluoresçant dans le rouge d'*Anthozoa* peut provenir d'une évolution de ces protéines afin d'augmenter leur thermotolérance aux rayons lumineux souvent intenses dans les tropiques. Ainsi, la protéine tétramérique DsRed présente une résistance au photobleaching 10 fois plus élevée qu'une de ses formes modifiées s'exprimant et fluoresçant sous forme monomérique et 4 à 5 fois supérieure que la protéine Gfp d'*A. victoria* (Campbell *et al.*, 2002).

Des transformations de la Dsred ont été réalisées afin d'obtenir des protéines maturant plus rapidement (Campbell *et al.*, 2002 ; Bevis *et al.*, 2002). C'est une de ces protéines, la DsRed-express que nous utiliserons dans notre étude.

Une autre différence entre la Gfp d'*A. victoria* et la protéine DsRed de *Discosoma* est la température optimale de maturation de la DsRed, qui se situe à 37°C, alors que la température optimale pour la Gfp est légèrement plus basse (30 °C) (Mizuno *et al.,* 2001). Ceci peut être expliqué par la température de l'eau du milieu naturel dans lequel les organismes *Aequoria* et *Discosoma* vivent. En effet, *A. victoria* est rencontrée dans le nordouest de l'océan pacifique, tandis que *Discosoma* provient de l'océan indo-pacifique.

# 2. Intérêt et applications des protéines fluorescentes

Les protéines fluorescentes permettent un marquage *in-vivo* des cellules, sans traitement particulier de l'échantillon et ne nécessitent pas d'ajout de co-facteurs. Néanmoins des facteurs de sélection et/ou inducteurs sont parfois nécessaires selon les stratégies de construction et/ou d'expression choisies. Ces protéines fluorescentes sont actuellement utilisées dans différentes configurations :

- étude d'un promoteur
- étude d'une protéine
- étude d'interactions entre protéines

Pour l'analyse de différentes protéines fluorescentes, plusieurs lasers et filtres doivent être utilisés selon les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission. Récemment, Andersen *et al* ont tenté d'utiliser un système de marquage fluorescent de différentes souches de *Listeria monocytogenes*, synthétisant respectivement cinq protéines fluorescentes : Cfp, Gfp, Yfp, DsRed-Express et HcRed. Les auteurs ont montré qu'avec l'utilisation d'une combinaison appropriée de longueurs d'ondes d'excitation et de filtres, la discrimination entre les souches de *L. monocytogenes* exprimant les protéines Cfp, Yfp et DsRed mélangées en proportions identiques est possible à l'échelle de la cellule. Par contre la différenciation entre les colonies exprimant la Gfp et la Yfp n'a pas été possible (Andersen *et al.*, 2006).

Néanmoins, Kogure *et al.*, ont réussi à exprimer 6 protéines fluorescentes dans une même cellule en utilisant une technique appelée FCCS (Dual color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy) qui repose sur l'utilisation de deux (ou plus) protéines fluorescentes pouvant être excitées à la même longueur d'onde, mais émettant à des longueurs d'ondes différentes (Kogure *et al.*, 2006).

#### 2.1. Etude dynamique de l'expression des gènes en temps réel

Des extensions oligopeptidiques spécifiques C-terminales peuvent rendre les protéines Gfp, généralement très stables, sensibles à la dégradation par certaines protéases intracellulaires spécifiques (Andersen *et al.*, 1998). Les protéines résultantes ont des temps de demi-vie allant de 40 minutes à quelques heures. Ces variants de la Gfp peuvent ainsi permettre de suivre la dynamique d'une protéine d'intérêt exprimée en fusion avec la protéine Gfp, cette dernière permettant de suivre dans l'espace et dans le temps la synthèse de la

protéine d'intérêt (Southward & Surette, 2002; Kogure *et al.*, 2006). Néanmoins, le temps de maturation des protéines fluorescentes doit être estimé et pris en compte car il peut présenter une limite à un suivi « en temps réel ».

Un tel variant de la protéine Gfp a été utilisé pour étudier la distribution tridimensionnelle d'une activité de croissance dans un biofilm de *Pseudomonas putida* (Sternberg *et al.*, 1999). Pour cela une construction dans laquelle le gène codant pour un variant de la protéine Gfp est fusionné à un promoteur P1 *d'E. coli* dépendant du taux de croissance a été réalisée. L'activité du promoteur a pu ainsi être suivie. Cette approche a permis de différencier les cellules à croissance rapide et celles ayant une croissance plus lente en fonction de la fluorescence mesurée à différents instants et de visualiser la distribution spatiale et temporelle de l'activité de croissance dans le biofilm. Néanmoins, lorsqu'on souhaite étudier la localisation d'une population microbienne au cours du temps, ces protéines sensibles à la dégradation ne sont pas adaptées et des protéines plus stables doivent être utilisées.

# 2.2. Suivi dynamique du développement d'un biofilm mixte

Les différentes protéines fluorescentes disponibles ont permis le marquage spécifique d'une population et ainsi l'identification de souches différentes dans une culture mixte.

Ainsi Tolker-Nielsen *et al.*, 2000a, ont pu étudier la dynamique de développement tridimensionnel d'un biofilm de *Pseudomonas sp.* B13 et *Pseudomonas putida*, exprimant respectivement une protéine Gfp (green fluorescent protein) et une protéine Rfp (red fluorescent protein) (Figure 15). Les auteurs ont réalisé une construction intragénomique et l'expression des protéines fluorescentes est constitutive.



Figure 15 : Structure tridimensionnelle d'un biofilm mixte en microscopie confocale. Les images ci-dessus représentent une projection du biofilm âgé d'un jour (à gauche), de deux jours (au milieu) et de cinq jours (à droite) Tolker-Nielsen *et al.*, 2000 (a).

Ces travaux sont les seuls à notre connaissance qui utilisent des protéines fluorescentes en co-cultures, les protéines étant utilisées comme marqueurs d'une population. Néanmoins, de nombreuses perspectives dans l'étude d'interactions microbiennes et d'organisation dans des agrégats biologiques peuvent être envisagées, en s'appuyant sur des micro-organismes modèles de différentes espèces, familles ou genres.

#### 3. Techniques dérivées de l'utilisation des protéines fluorescentes

Différentes techniques reposant sur l'utilisation de protéines fluorescentes sont apparues permettant d'étudier la diffusion ou la localisation de protéines en temps réel (dans l'espace) ou encore la dynamique de la protéine produite (dans le temps). La photoconversion, par exemple, permet la conversion au cours du temps d'un chromophore vert en un chromophore rouge (par « cassure » d'un acide aminé dans le chromophore) (Yanushevich *et al.*, 2003). En caractérisant au préalable le phénomène, on peut ainsi estimer « l'âge biologique » d'une protéine en étudiant le ratio vert/rouge.

Une autre technique dérivée, le FRET (Frequence Resonance Energy Transfert) permet l'étude des interactions entre protéines. Elle repose sur le transfert d'énergie entre une molécule « donneuse » de photons et une autre molécule acceptrice. Quand une des protéines exprimant une fluorescence s'approche de l'autre et qu'elles entrent en interaction, la deuxième protéine est excitée par la fluorescence de la première et émet ainsi dans une autre longueur d'onde. Cette technique présente plusieurs inconvénients comme par exemple le fait que la distance entre les protéines doit être relativement faible (de l'ordre de quelques dizaines d'Å) (Karpova *et al.*, 2003).

# 4. Limites/Contraintes des protéines fluorescentes

Malgré leurs nombreux avantages pour des études physiologiques *in-vivo*, métaboliques ou pour l'identification ou la localisation d'espèces microbiennes, les protéines fluorescentes présentent des contraintes ou des limites à prendre en compte lors de leur utilisation.

#### 4.1. Recouvrement des spectres

Certaines protéines fluorescentes ont des spectres très proches, et il peut y avoir alors un recouvrement (« latéral ») des spectres si plusieurs protéines fluorescentes sont exprimées, et de ce fait une impossibilité de différencier les protéines (Andersen *et al.*, 2006).

Ce risque de recouvrement est d'autant plus grand que l'intensité de fluorescence des différentes protéines est variable. En effet, une protéine ayant une plus forte intensité de fluorescence peut recouvrir le signal d'une protéine qui fluoresce avec une intensité moindre. Ceci est encore plus marqué si la protéine ayant une plus forte intensité est exprimée en plus grande quantité.

#### 4.2. Oligomérisation

Les protéines fluorescentes tétramériques ont un poids moléculaire supérieur aux protéines fluorescentes monomériques ou dimériques et ont donc parfois tendance à former des agrégats dans les cellules. Le développement des protéines fluorescentes mono ou dimériques permet aujourd'hui de trouver de plus en plus de protéines fluorescentes de ce type (Shaner *et al.*, 2004). Néanmoins, leur intensité de fluorescence est parfois plus faible. Le choix de la forme mono-, di-, ou tétramérique d'une protéine dépend donc de l'utilisation. Dans notre étude, la forme tétramérique de la DsRed-express n'a pas présenté de problème particulier.

# 4.3. Rôle de l'O<sub>2</sub>

Comme cité précédemment, l'oxygène est un élément indispensable à la maturation des protéines fluorescentes (Stepanenko *et al.*, 2008), car il intervient dans une réaction d'oxydation au cours de cette phase. L'utilisation des protéines fluorescentes comme marqueur d'une population ou rapporteur de l'expression d'un gène est donc adaptée essentiellement aux micro-organismes aérobies et aux agrégats microbiens peu ou pas limités en oxygène.

#### 5. Conclusion

Les protéines fluorescentes apparaissent donc comme un outil intéressant pour des applications *in-vivo*. Le nombre de « couleurs » actuellement disponibles permet d'envisager des marquages multiples pour l'identification de différentes souches dans un consortium tout en tenant compte des propriétés spectrales propres à chacune des protéines.

Les protéines fluorescentes peuvent également être utilisées pour suivre une activité, en plaçant par exemple le gène *gfp* sous l'action d'un promoteur impliqué dans une activité ciblée (Sternberg *et al.*, 1999 ; Southward & Surette, 2002).

Le marquage simultané d'une activité et d'une souche ou population est envisageable si les spectres d'émission sont bien séparés afin de pouvoir différencier la protéine révélant l'activité de celle servant à identifier la souche.

Dans les techniques reposant sur l'utilisation de protéines fluorescentes, les étapes les plus délicates et parfois fastidieuses sont la conception et la construction génétique du vecteur qui permettra l'expression de la protéine puis son insertion dans la souche. Une fois la ou les souches construites, l'exploitation de l'expression des protéines ne nécessitera pas d'étapes de traitement ou de marquage des cellules. Cependant, en amont des constructions, la sélection des protéines de marquage est cruciale car elle déterminera les conditions d'acquisition des images (excitation, émission, lasers, filtres...). Il en est de même du choix du promoteur qui sera un élément clé de l'expression de la protéine. Le système d'expression de la fluorescence (promoteur, plasmide) devra quant à lui être spécifique de chaque souche ou espèce ciblée.

# III-Données métaboliques et génétiques sur les micro-organismes hôtes modèles : *Escherichia coli* et *Saccharomyces cerevisiae* pour l'expression des protéines fluorescentes

Les micro-organismes ont développé de nombreux mécanismes de régulation des voies anaboliques et cataboliques. Les bactéries, par exemple, ne synthétisent pas d'enzymes cataboliques pour la dégradation d'un substrat lorsqu'il n'est pas présent dans le milieu. Ces mécanismes de régulation sont en général rapidement réversibles pour répondre à des modifications brutales des conditions environnementales. Les deux souches seront présentées tour à tour, en commençant par la bactérie *E. coli*, dont le métabolisme est plus simple que celui de la levure *S. cerevisiae*.

## 1. Escherichia coli

## 1.1. Généralités

*E. coli* est le micro-organisme procaryote modèle le plus étudié, notamment du fait de l'ancienneté de sa découverte en 1885 par Théodore Escherich, de sa croissance rapide (une division toutes les vingt minutes dans des conditions optimales de croissance) et de l'innocuité de plusieurs souches les rendant facilement utilisables en laboratoire. La pathogénicité de certaines souches peut dépendre de leur capacité à adhérer à la surface des muqueuses notamment grâce à des pili ou fibriae, et à y développer des biofilms. Toutes les souches *d'E. coli*, pathogènes ou non, peuvent développer ces systèmes d'adhésion, mais ils ne sont que peu observés chez des cellules planctoniques (en suspension) (James *et al.*, 2004).

*E. coli* est une bactérie Gram négatif de la famille des Enterobactéries, qui est le plus souvent isolée du tube digestif de l'homme ou des animaux. Elle se divise par scissiparité et présente un métabolisme aérobie-anaérobie facultatif, c'est-à-dire qu'elle peut se développer en présence ou en absence d'O<sub>2</sub>. C'est un coccobacille qui en fonction des conditions environnementales, peut prendre la forme de bacilles (bâtonnets) ou de coques (rondes). Sa taille, plus petite que celle des levures, est d'environ 2 à 3 micromètres de long sur 0,6 micromètres de large lorsqu'elle est sous forme de bâtonnets. C'est une bactérie mobile grâce à la présence de flagelles péritriches. Son génome comprend 4,6 millions de paires de bases codant environ 4200 protéines et a été entièrement séquencé en 1997 (souche d'*E. coli* non pathogène de laboratoire) (Blattner *et al.*, 1997).

# 1.2. Souches de E. coli recombinants

Les bactéries peuvent être transformées soit par insertion d'un plasmide, soit par incorporation du gène d'intérêt directement dans le génome. Cependant, les facteurs de sélection chez les bactéries sont souvent basés sur des résistances à des antibiotiques. Dans une construction par insertion dans un plasmide d'un gène de résistance, l'antibiotique doit être ajouté dans le milieu de culture afin d'éviter la perte du plasmide. Lorsque l'on incorpore le gène d'intérêt directement dans le génome, une première étape de sélection du recombinant nécessite la présence de l'antibiotique dans le milieu, mais une fois la souche recombinante isolée, lors des cultures ultérieures, le facteur de sélection n'est plus indispensable. Lee & Choi ont comparé la stabilité d'une souche recombinante d'E. coli transformée par insertion d'un plasmide ou transformée par recombinaison génomique et cultivée respectivement dans un milieu avec et sans antibiotique. Ils ont constaté une meilleure stabilité chez la souche transformée par voie plasmidique et cultivée dans un milieu avec antibiotique (Lee & Choi, 1987). D'autres chercheurs ont cependant montré que même pour des transformations par insertion de plasmides, une perte du plasmide ou une diminution du nombre de copies par cellules peut survenir, influencée notamment par les conditions de culture et la taille du brin inséré (Hakkaart et al., 1985; Smith & Bidochka 1998).

L'utilisation d'un facteur de sélection du type antibiotique peut cependant présenter différents inconvénients :

 lors de cultures mixtes ou dans des milieux réels, le facteur de sélection peut interférer avec les autres souches ou d'autres espèces biologiques en présence et modifier l'équilibre de l'écosystème.

 - l'augmentation de la résistance aux antibiotiques dans les biofilms du fait de la diffusion de ces molécules limitée dans ces structures épaisses et complexes rend ce facteur de sélection moins efficace pour ce type d'application (Stewart & Costerton, 1991).

Afin de s'affranchir de la nécessité d'utiliser un facteur de sélection, une modification dans le génome peut être envisagée. Cependant, Errampalli *et al.*, 1997, dans le cas de la Gfp, ont mis en évidence qu'une seule copie du gène sauvage était insuffisante pour détecter la protéine lorsqu'elle était exprimée. En augmentant le nombre de copies de gène inséré ou en utilisant un variant de la Gfp présentant une intensité de fluorescence plus forte que la protéine sauvage, comme la protéine EGfp, de nombreux chercheurs ont pu utiliser avec succès ce type de transformation pour marquer une seule population (Tombolini *et al.*, 1997 ;

Andersten *et al.*, 2006), deux populations se développant en biofilm (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000) ou étudier l'activité d'un gène (Sternberg *et al.*, 1999).

L'insertion dans le génome nécessite toutefois une bonne connaissance de celui-ci pour ne pas risquer d'insérer le fragment d'intérêt sur un gène fonctionnel de la souche, et implique souvent un nombre de copies du gène de la Gfp plus faible que lors de l'utilisation de plasmides réplicatifs, ce qui peut permettre de limiter le « coût » énergétique de la production de la protéine fluorescente, mais limitera également l'intensité de fluorescence de la souche.

Parmi les nombreux promoteurs portés par des plasmides qui sont usuellement utilisés pour transformer *E. coli*, le promoteur *lac*, qui peut être induit par l'IPTG, un analogue structural du lactose, permet de réguler l'expression du gène situé en aval. Ce promoteur fait partie d'un ensemble de gènes constituant l'opéron lactose, dont la régulation a été étudiée par de nombreux chercheurs. Brown *et al* en ont fait récemment une description simple (Brown *et al.*, 2008) :

lorsque le lactose est absent, la transcription des gènes relatifs au lactose n'a pas lieu d'être,
le promoteur est alors réprimé par un répresseur qui se lie sur une séquence appelée opérateur,
et la transcription des gènes en aval du promoteur n'a pas lieu (Figure 16).



Figure 16 : Mécanisme de répression de l'opéron lactose (Borde & Boucher, 2005)

lorsque le lactose est présent, il se lie au répresseur et le rend inactif (Figure 17). Deux cas sont ensuite possible : en l'absence de glucose, l'opéron est fortement induit, les séquences en aval sont transcrites et on observe un haut niveau d'expression de ces gènes. Si le glucose et le lactose sont tous deux présents, l'expression des gènes en aval du promoteur lactose sera plus faible.



Figure 17 : Mécanisme d'induction de l'opéron lactose (Borde & Boucher, 2005)

#### 2. Saccharomyces cerevisiae

# 2.1. Généralités

La levure *S. cerevisiae* est un organisme Eucaryote (possédant un noyau) unicellulaire qui se multiplie par bourgeonnement. Les cellules de levure sont généralement ovoïdes et possèdent un diamètre d'approximativement 5 à 10 µm. Le génome nucléaire de la levure de boulangerie *S. cerevisiae* est formé de 16 petits chromosomes, qui comportent environ 6000 gènes codant des protéines (Goffeau *et al.*, 1996).

Ce micro-organisme est l'un des plus utilisés dans l'industrie. Les levures sont cultivées pour les cellules elles-mêmes (production de biomasse ou levain), pour leurs composants cellulaires, pour les molécules recombinantes qu'elles produisent, ou pour différents produits issus de son métabolisme. La levure *S. cerevisiae* possède deux types principaux de métabolisme: le métabolisme oxydatif et le métabolisme fermentaire, qui découlent, de façon générale, de la nature et de la quantité de source carbonée disponible ainsi que de la teneur en oxygène dissous (Figure 18). Un métabolisme intermédiaire, dit oxydo-réductif peut également être rencontré. Ces deux métabolismes sont très exploités d'un point de vue industriel. La fermentation favorise la production d'éthanol, alors que la respiration favorise la production de biomasse.



Figure 18 : Métabolismes oxydatif (à gauche) et fermentaire (à droite) rencontrés chez la levure (Walker & Walker, 1998)

Le métabolisme oxydatif du glucose correspond à une oxydation complète du sucre en eau et gaz carbonique. La totalité du pyruvate issu de la glycolyse est transportée dans la mitochondrie, où il est dégradé en  $CO_2$  et Acétyl-CoA, ce dernier étant ensuite oxydé en  $CO_2$  et H<sub>2</sub>O.

Le métabolisme fermentaire pur de la levure correspond à la transformation du glucose, en l'absence d'oxygène du milieu, en éthanol et dioxyde de carbone comme produits principaux. La différence entre les voies oxydative et fermentaire réside dans le devenir du pyruvate. Deux paramètres conditionnent le métabolisme oxydatif : la disponibilité de l'oxygène et la concentration en glucose qui doit rester faible pour éviter un « overflow » carbone. Si le glucose est en excès, il devra être métabolisé par la voie réductive ; la valeur seuil est spécifique de la souche. Verduyn *et al.*, 1984, ont montré qu'une souche de *S. cerevisiae* en condition aérobie passait en métabolisme fermentaire et commençait à produire de l'éthanol quand la concentration en glucose atteignait 150 mg/L et que la vitesse spécifique de production d'éthanol augmentait avec la concentration en glucose jusqu'à une
concentration en glucose atteignant 1 g/L. Ce basculement d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme oxydo-fermentaire dans des conditions aérobies est appelé « effet Crabtree ». Sonnleitner & Käppeli, 1985, ont réalisé un modèle métabolique pour étudier la croissance de *S. cerevisiae* sur glucose et sont arrivés à la conclusion que la capacité respiratoire de la levure était l'élément qui contrôlait le basculement d'un métabolisme purement oxydatif à un métabolisme oxydo-réductif. La capacité respiratoire peut-être représentée par un goulot d'étranglement qui détermine le flux maximal de sucre (flux critique) pouvant être oxydé (Figure 19).



Figure 19 : Capacité respiratoire limite de *S. cerevisiae* (D'après Sonnleitnert & Käppeli, 1985)

Si le flux de sucre est inférieur à celui qui peut être oxydé, seuls de la biomasse et du dioxyde de carbone sont produits (schéma 2.1 de la Figure 19).

Le schéma 2.2 représente le flux maximal de sucre pouvant être oxydé sans production d'éthanol (Figure 19). Si le flux de sucre est supérieur à celui qui peut être oxydé, le surplus est dirigé vers la voie fermentaire et il y aura production d'éthanol (schéma 2.3 Figure 19).

# 2.2. Souches de S. cerevisiae recombinantes

De même que pour la bactérie, la transformation de ce micro-organisme peut être réalisée de deux façons : par incorporation d'un plasmide portant le gène d'intérêt ou par intégration directe du gène d'intérêt ou de la "cassette" (séquence d'ADN portant le gène et le promoteur régulant son expression) dans le génome. Pour *S. cerevisiae*, des vecteurs peuvent être maintenus dans les cellules, à l'instar des plasmides bactériens, en adoptant dans ce cas une stratégie spécifique qui repose sur l'existence d'auxotrophies pour des acides aminés ou des nucléotides chez de nombreuses souches de laboratoire. Ces levures ne pouvant pas synthétiser cet élément indispensable à leur croissance, elles ne peuvent pas se développer en

l'absence du composé dans le milieu. Cette caractéristique, propre à chaque souche, peut être utilisée comme facteur de sélection. En effet, en incorporant dans le plasmide à insérer un gène qui permettra la synthèse d'un composé essentiel, seules les souches qui auront incorporé le plasmide pourront se développer sur un milieu défini ne contenant pas ce composé. L'inconvénient majeur d'une transformation par insertion plasmidique par rapport à une insertion intragénomique réside dans la nécessité d'utiliser des milieux biochimiquement définis pour maintenir le plasmide. Ils sont souvent plus coûteux et plus fastidieux à préparer que les milieux classiques. Néanmoins, comme dans le cas d'*E. coli*, l'insertion dans le génome nécessite une bonne connaissance de celui-ci pour ne pas risquer d'insérer le gène d'intérêt sur un gène fonctionnel de la souche, et conduit souvent à un nombre de copie du gène de la Gfp plus faible que lors de l'utilisation de plasmides réplicatifs.

Parmi les nombreux plasmides ou cassettes utilisés pour transformer S. cerevisiae, le promoteur ADH1 est souvent retenu. En effet il contrôle l'expression de l'alcool déshydrogénase et en présence de glucose, il permet donc une expression forte du gène placé en aval. Il existe plusieurs enzymes « alcool-deshydrogénases » qui interviennent dans la production ou la dégradation de l'éthanol en catalysant la réduction réversible de l'acétaldéhyde en éthanol (Figure 20). Chez S. cerevisiae quatre gènes codent pour des isoenzymes de l'alcool déshydrogénase, les rôles respectifs des gènes ADH1 et ADH2 ont été déterminés : ADH1 code pour une isoenzyme prédominante pendant la fermentation sur glucose, qui sert d'inducteur à ce gène (Denis et al., 1982). Cette enzyme catalyse la régénération du NADH en NAD+, avec production simultanée d'éthanol. Pendant la croissance, l'enzyme ADH1 est présente en quantité importante dans la cellule. Cependant lorsque la concentration de la source de carbone devient faible, la répression de différentes autres enzymes est levée afin d'utiliser l'éthanol précédemment excrété comme source de carbone via la respiration oxydative et la gluconéogenèse. Dans cette configuration, l'enzyme ADH2 réprimée jusqu'alors par le glucose est synthétisée et devient fonctionnelle pour la réaction inverse pour utiliser l'éthanol (Lutstorf & Megnet, 1968, cité par Denis et al., 1983). Denis et al., 1983, ont montré que la quantité d'ARN messager codant pour la protéine ADH1 et la vitesse de synthèse protéique de ADH1 diminue d'un facteur de 6 à 10 fois lorsque S. cerevisiae est transférée dans un milieu contenant une source de carbone nonfermentescible, comme l'éthanol, ou pendant la phase stationnaire de croissance.





La connaissance du métabolisme des micro-organismes modèles utilisés est nécessaire pour définir la construction des micro-organismes recombinants, notamment pour choisir les facteurs de sélection (antibiotiques, auxotrophies) et les promoteurs en fonction des objectifs de travail.

#### IV- Conclusion de l'étude bibliographie

Les outils actuels utilisés pour la caractérisation de la structure des agrégats biologiques reposent souvent sur des méthodes d'approche globale. Certains dispositifs spécifiques ont été également développés pour réaliser des observations directes *in-situ* grâce à des techniques de microscopies adaptées. Néanmoins, ces méthodes ne permettent qu'un accès très partiel à des informations locales précises sur les caractéristiques de ces structures complexes et notamment sur l'organisation des différentes espèces microbiennes au sein des agrégats biologiques. Les approches spécifiquement développées pour réaliser des études locales, reposent généralement sur des méthodes qui nécessitent des étapes de préparation des étapes des étapes de pr

La possibilité de construire des micro-organismes autofluorescents par l'insertion (génomique ou plasmidique) de gènes codant pour des protéines fluorescentes a été récemment étudiée. Il ressort de l'étude bibliographique que certains chercheurs ont proposé d'utiliser des micro-organismes fluorescents pour les observer directement sans préparation déstructurante, mais les exemples restent peu nombreux et ciblés sur des applications très précises. Cette analyse nous a conduit à envisager une méthodologie originale basée sur l'utilisation de micro-organismes auto-fluorescents modèles et la conception de dispositifs spécifiques de culture et de visualisation pour tendre vers une analyse *in-vivo* et *in-situ* de l'influence des conditions opératoires (contraintes physico-mécaniques et/ou biologiques) sur les caractéristiques d'agrégats biologiques, en permettant de suivre l'évolution de l'agrégat au cours du temps.

Les caractéristiques des deux souches sélectionnées comme modèles permettent d'envisager des constructions plasmidiques, en utilisant des facteurs de sélection propres à chaque souche et compatible avec une co-culture. En effet, dans l'optique d'une culture mixte, le facteur de sélection de la levure recombinante reposant sur une auxotrophie au tryptophane, et la souche d'*E. coli* ne présentant pas cette auxotrophie, les deux micro-organismes pourront se développer simultanément dans un milieu sans tryptophane. De plus, l'utilisation de l'ampicilline comme facteur de sélection pour nos souches recombinantes de *E. coli* sera bien compatible avec une culture de *S. cerevisiae*, cette levure pouvant croître en présence de l'antibiotique.

Après un inventaire présentant le matériel et les méthodes utilisés lors de ce travail de thèse, un premier chapitre de résultats s'attachera à décrire les aspects méthodologiques de l'étude (construction des souches, comparaison avec des souches recombinantes avec les souches sauvages, conditions d'observation, ...). Les deux chapitres suivants seront consacrés à la mise en œuvre de ces micro-organismes dans des environnements définis et sous contrainte maîtrisée. Ces situations modèles seront obtenues lors d'opérations de filtration ou par la génération de biofilms.

# Matériel et méthodes

#### I - Souches et méthodes de construction des micro-organismes autofluorescents

#### 1. Souches mises en œuvre

Les souches mises en œuvre pendant ce travail sont :

- la bactérie *E. coli* BL21 (DE3) star (Invitrogen) ainsi que les souches recombinantes obtenues par transformation de la souche initiale, dont le génotype est le suivant : F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm rne131 (DE3).

- la levure haploide *S. cerevisiae* PJ69-4A (James *et al.*, 1996) ainsi que la souche recombinante obtenue par transformation de la souche initiale, dont le génotype est le suivant : MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 (deleted) gal80 (deleted) LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ.

#### 2. Construction de souches procaryotes Escherichia coli autofluorescentes

La souche hôte *E. coli* BL21 (DE3) star compétente a été préparée selon la méthode SEM « Simple and Efficient Method » (Inoue *et al.*, 1990). Cette méthode repose sur la fragilisation et la perméabilisation de la membrane cellulaire sous l'effet d'un choc thermique (0°C dans de la place puis 42°C au bain marie pendant 30 secondes, puis de nouveau dans la glace à 0°C) afin de faire pénétrer une ou plusieurs copies d'un plasmide dans les cellules. Ces cellules sont dites chimio-compétentes par opposition aux cellules électro-compétentes (où dans ce cas un choc électrique permet la pénétration du plasmide dans la cellule). Les plasmides utilisés (pAmCyan, pZsYellow et pDsRed-express) ont été fournis par la société Clontech. Ils ont été choisis de telle sorte que les longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission des protéines fluorescentes induites dans *E. coli* par ces constructions soient suffisamment éloignées les unes des autres. Ainsi le recouvrement des spectres d'émission sera minimal lors des excitations lasers pour la visualisation des micro-organismes.

Les trois souches construites par incorporation des plasmides cités précédemment expriment respectivement une protéine cyan (AmCyan), jaune (ZsYellow) ou rouge (DsRedexpress) permettant la visualisation de ces 3 souches en mélange (Andersen *et al.*, 2006).

#### 3. Construction d'une souche eucaryote Saccharomyces cerevisiae autofluorescente

La souche hôte *S. cerevisiae* PJ69-4A a été transformée par insertion du plasmide pYGfp. Comme pour la souche *E. coli*, la souche *S. cerevisiae* PJ69-4A a été rendue chimiocompétente pour permettre la pénétration du plasmide pYgfp. La méthode repose sur l'utilisation d'Acétate de Litium (LiAc) et de Polyéthylène glycol (PEG), qui servent à perméabiliser la membrane et à déstabiliser les lipides membranaires. Comme précédemment un choc thermique permet l'intégration du plasmide (Gietz & Schiestl, 1995).

La souche *S. cerevisiae* PJ69-4A possède une auxotrophie vis-à-vis du tryptophane (*i.e.* cette souche ne peut se développer qu'en présence de tryptophane dans le milieu). Par contre, l'intégration d'un plasmide possédant une séquence correspondant à un gène intervenant dans la biosynthèse du tryptophane permet d'éliminer cette auxotrophie. La souche peut ainsi se développer sur un milieu sans tryptophane, celui-ci servant alors de facteur de sélection et de propagation des souches ayant intégré le plasmide. Le plasmide pYgfp, qui sera utilisé dans cette étude, porte une séquence codant pour la protéine EYGfp sous contrôle du promoteur ADH1, promoteur fort correspondant à un gène codant pour l'alcool déshydrogénase, enzyme déterminante de la voie de synthèse d'éthanol chez *S. cerevisiae*.

#### II -Milieux de culture, suivi des cultures

- 1. Milieux de cultures
  - 1.1. Saccharomyces cerevisiae
    - 1.1.1. Milieux de conservation

Les milieux de conservation des souches sauvage et recombinante sont respectivement des milieux « Yeast Nitrogen Base » (YNB) solides complémentés ou non en tryptophane.

Composition du milieu « Yeast Nitrogen Base »: *Remarque : Les masses sont données pour un litre de milieu.* 

Milieu de base:	
Yeast nitrogen base	1,7 g
$(NH_4)_2SO_4$	5 g
Glucose	20 g
Agar	20 g

Ce milieu de base est autoclavé (121°C, 1 bar, 20 minutes) et complémenté avec les composés ci-dessous :

Bases azotées	
Adénine	50 x 10 <sup>-3</sup> g
Uracile	50 x 10 <sup>-3</sup> g

La solution mixte d'Adénine-Uracile est préparée dans une solution de NaOH 0,1M sous forme concentrée (x100). La solution est stérilisée sur filtres Minisart 0,2  $\mu$ m (Sartorius). Le volume adéquat (10 mL/L milieu) est ajouté au milieu de culture préalablement stérilisé. La solution doit être conservée à température ambiante.

Acides aminés	
Leucine	25 x 10 <sup>-3</sup> g
Histidine	10 x 10 <sup>-3</sup> g
Méthionine	60 x 10 <sup>-3</sup> g
(Tryptophane	10 x 10 <sup>-3</sup> g)

La solution mixte Leucine-Histidine-Méthionine avec ou sans Tryptophane est préparée sous forme concentrée (x100) et stérilisée sur filtres Minisart 0,2  $\mu$ m (Sartorius). La solution est conservée à 4°C.

Le tryptophane est ajouté à la solution d'acides aminés pour la préparation du milieu de culture pour la souche sauvage du fait de l'auxotrophie de cette souche vis-à-vis de cet élément.

# 1.1.2. Milieux de culture et de préculture

Un milieu minéral complet est utilisé pour cultiver la levure *S. cerevisiae*. La composition de ce milieu a été calculée pour être non limitante jusqu'à 20 g/L de biomasse (Alfenore *et al..*, 2002).

Remarque : Les masses sont données pour un litre de milieu.



Ce milieu de base est autoclavé (121°C, 1 bar, 20 minutes) et complémenté avec les composés ci-dessous :

# Glucose

La solution de glucose est préparée à une concentration égale à 400 g/L et stérilisée par autoclavage (121°C, 1 bar, 20 minutes) puis ajoutée au milieu salin pour atteindre la concentration initiale en glucose souhaitée.

# **Oligo-éléments**

$ZnSO_4, 7H_2O$	4 x 10 <sup>-2</sup> g
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	3,8 x 10 <sup>-3</sup> g
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	5 x 10 <sup>-4</sup> g
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	9 x 10 <sup>-4</sup> g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	6 x 10 <sup>-5</sup> g
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	2,3 x 10 <sup>-2</sup> g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> , 6H <sub>2</sub> O	2,3 x 10 <sup>-2</sup> g
$H_3BO_3$	3 x 10 <sup>-3</sup> g

Chaque solution d'oligo-élément est préparée séparément sous forme d'une solution concentrée (x1000). Le pH de la solution de fer ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>, 6H<sub>2</sub>O) est ramené à 1,0 par ajout d'une solution d' HCl 1M et stérilisée par filtration sur filtres Minisart stériles 0,2  $\mu$ m (Sartorius). Les autres solutions sont stérilisées par autoclavage (121°C, 1 bar, 20 minutes) et conservées à l'obscurité.

Vitamines	
Acide pantothénique	5 x 10 <sup>-3</sup> g
Acide nicotinique	5 x 10 <sup>-3</sup> g
Mésoinositol	125 x 10 <sup>-3</sup> g
Thiamine	5 x 10 <sup>-3</sup> g
Pyridoxine	5 x 10 <sup>-3</sup> g
Acide para-aminobenzoïque	1 x 10 <sup>-3</sup> g
Biotine	1,2 x 10 <sup>-5</sup> g

Les vitamines sont préparées sous forme d'une solution concentrée (x400). La solution est préparée en maintenant le pH à 6,5 (avec du NaOH 1 M ou HCL 1 M) après chaque ajout des différentes vitamines. Cette solution est stérilisée par filtration sur filtres Minisart stériles 0,2  $\mu$ m (Sartorius) et stockée à 4°C.

Bases azotées	
Adénine	50 x 10 <sup>-3</sup> g
Uracile	50 x 10 <sup>-3</sup> g

La solution mixte d'Adénine-Uracile est préparée dans du NaOH 0,1M sous forme concentrée (x100). La solution est stérilisée sur filtres Minisart 0,2 µm stériles (Sartorius). Un volume adéquat (10 mL/L milieu) est ajouté au milieu de culture préalablement stérilisé. La solution doit être conservée à température ambiante.

# Acides aminés

Leucine	25 x 10 <sup>-3</sup> g
Histidine	10 x 10 <sup>-3</sup> g
Méthionine	60 x 10 <sup>-3</sup> g
(Tryptophane	10 x 10 <sup>-3</sup> g)

La solution mixte Leucine-Histidine-Méthionine avec ou sans Tryptophane est préparée sous forme concentrée (x100) et stérilisée par filtration (filtres Minisart 0,2  $\mu$ m Sartorius). La solution est conservée à 4°C.

Le tryptophane est ajouté à la solution d'acides aminés pour la préparation du milieu de culture de la souche sauvage du fait de l'auxotrophie de la souche vis-à-vis de cet élément.

Un milieu riche YPD solide a été parfois utilisé pour la souche sauvage pour la production de pigments rouge, sa composition est la suivante :

Remarque : Les masses sont données pour un litre de milieu.

Glucose	20 g
Bactopeptone	20 g
Extrait de levure	10 g
(Agar	20 g)

Le milieu est stérilisé par autoclavage (121°C, 1 bar, 20 minutes) et conservé à 4°C.

1.2. Escherichia coli

1.2.1. Milieux riches de conservation et/ou de préculture :

#### Milieu riche 2YT (Yeast extract-Tryptone)

Remarque : Les masses sont données pour un litre de milieu.

Tryptone	16 g
Extrait de levure	10 g
NaCl	5 g
(Agar	20 g)
(Ampicilline	0,1 g)
(IPTG	0,04 g)

Le milieu est stérilisé par autoclavage (121°C, 1 bar, 20 minutes). Le milieu gélosé avec ajout d'agar à 20 g/L est utilisé pour la conservation des souches sur milieu solide.

Les solutions d'ampicilline et d'IPTG sont préparées sous forme concentrées, respectivement x1000 et x100, puis stérilisées par filtration sur filtres Minisart stériles 0,2µm

(Sartorius) et conservées à -20°C et sont ajoutées en sorties d'autoclave pour les souches recombinantes.

# 1.2.2. Milieux minéral de culture et de préculture

Le milieu utilisé pour la culture d'*E. coli* est un milieu minéral complet. *Remarque : Les masses sont données pour un litre de milieu.* 

Solution de Sels A	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
$(NH_4)_2SO_4$	0,75 g
$(NH_4)_2HPO_4$	8 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,13 g

Solution de Sels B

MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> 0	1 g
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> 0	0,04 g
FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	0,04 g

Ces solutions sont préparées sous forme concentrée (x500) pour le MgSO<sub>4</sub> et (x1000) pour le CaCl<sub>2</sub> et le FeSO<sub>4</sub>. Le pH de la solution de fer est ramené à pH 2 avec une solution de HCl 1M, puis stérilisée par filtration (filtres Millipore 0,2  $\mu$ m). Les solutions de MgSO<sub>4</sub> et CaCl<sub>2</sub> sont autoclavées (121°C, 1 bar, 20 minutes). Les solutions sont stockées à température ambiante et à l'obscurité.

Solution d'acide citrique

100 mL d'une solution d'acide citrique est préparée à 100 g/L.

# Oligo-éléments

$MnSO_4, H_2O$	20 x 10 <sup>-3</sup> g
CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	8 x 10 <sup>-3</sup> g
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	$4 \times 10^{-3} g$
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	4 x 10 <sup>-3</sup> g

$CuCl_2$ , 2 $H_2O$	$2 \times 10^{-3} g$
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 x 10 <sup>-3</sup> g

Les solutions de chaque oligo-élément sont préparées sous forme concentrée (x1000). Elles sont stérilisées par autoclavage (121°C, 1 bar, 20 minutes) et conservées à l'obscurité.

<u>Vitamine</u> Thiamine 0,01 g

La solution de thiamine est préparée sous forme concentrée (x1000), stérilisée par filtration sur filtres Minisart stériles  $0,2\mu$ m (Sartorius) et conservée à 4°C.

Antibiotique Ampicilline 0,1 g

La solution est préparée sous forme concentrée (x1000), stérilisée par filtration sur filtres Minisart stériles 0,2µm (Sartorius) et conservée à -20°C.

Protocole de préparation du milieu de culture pour un volume final de 1 L :

Dans 60 mL d'une solution d'acide citrique à 100 g/L, les solutions d'oligo-éléments puis la solution de sels B sont ajoutés dans l'ordre ci-dessus pour éviter la précipitation des ions divalents (chélation par le diacide).

La solution de sels A est préparée dans environ 700 mL d'eau puis est ajoutée à la solution précédente dans une fiole jaugée et complétée à 1 litre. Le pH est ajusté à 6,8 avec une solution commerciale d'ammoniaque (28 %).

Le milieu final est stérilisé par autoclavage à 121 °C, 1 bar durant 20 minutes.

Après stérilisation, le glucose et/ou le lactose est ajouté à partir d'une solution concentrée (200 à 400 g/L) préalablement stérilisée par autoclavage (121°C, 1 bar, 20 minutes).

Les solutions de thiamine et d'ampicilline sont ajoutées juste avant l'utilisation du milieu pour les cultures de la souche recombinante.

Un récapitulatif des souches, des milieux et des conditions de culture associées est présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau 4) :

S	Souches Mil		Température
LEVURES	PJ69-4a	Milieu minéral S. cerevisiae	30 °C
S. cerevisiae		avec ajout de tryptophane	
	PJ69-4a pYgfp	Milieu minéral levure sans	30°C
		tryptophane	
BACTERIES	BL21(DE3) star	Milieu minéral E.coli sans	37°C
E. coli		antibiotique	
	BL21(DE3) star	Milieu minéral E.coli avec	37°C
	pDsRed-express	antibiotique	

Tableau 4 : Souches et milieux de culture

#### 2. Mode de conduite des cultures

Les cultures des différents micro-organismes ont été réalisées en mode discontinu, en fioles et en réacteurs.

# 2.1. Cultures discontinues en fioles d'Erlenmeyer

Ces cultures non régulées en pH ont été réalisées selon le protocole décrit ci-dessous.

L'inoculum est réalisé en 2 étapes (boîte puis tube comme pré-culture). Un tube contenant 2 mL de milieu de culture (cf milieu de culture paragraphes II-1.1 ou II-1.2) est ensemencé à partir d'une colonie isolée sur gélose (cf milieu de conservation paragraphes II-1.1 ou II-1.2). Ce tube est incubé pendant 12 heures à 24 heures à 30°C pour la culture de *S. cerevisiae* ou 37°C pour la culture d'*E. coli* sous agitation (200 tours/minutes). Le contenu de chaque tube est ensuite transféré dans un Erlenmeyer bafflé de 1 L contenant 100 ou 200 mL de milieu de culture (cf milieu de culture paragraphes II-1.1 ou II-1.2). Cet Erlenmeyer est incubé à 30°C ou 37°C sous agitation (200 tours/minutes).

# 2.2. Cultures discontinues en bioréacteurs instrumentés

L'inoculum est réalisé en 3 étapes (boîte puis tube comme pré-culture). Un tube contenant 2 mL ou 4 mL de milieu de culture (cf milieu de culture paragraphes II-1.1 ou II-1.2) est ensemencé à partir d'une colonie isolée sur gélose (cf milieu de conservation paragraphes II-1.1 ou II-1.2). Ce tube est incubé pendant 12 heures à 24 heures à 30°C pour la culture de *S. cerevisiae* ou 37°C pour la culture d'*E. coli* sous agitation (200 tours/minutes). Le contenu de chaque tube est ensuite transféré dans un Erlenmeyer bafflé de 250 mL contenant 20 ou 40 mL de milieu de culture (cf milieu de culture paragraphes II-1.1 ou II-1.2).

Cet Erlenmeyer est incubé à 30°C ou 37°C sous agitation (200 tours/minutes) pendant 12h. Le contenu est ensuite transféré dans un nouvel Erlenmeyer bafflé de 2 L, contenant 200 ou 400 mL de milieu de culture (cf milieu de culture paragraphes II-1.1 ou II-1.2). Cet Erlenmeyer constitue le levain.

Après incubation 12 heures à  $30^{\circ}$ C ou à  $37^{\circ}$ C sous agitation (200 tours/minutes), le levain est transféré dans un bioréacteur (taux d'ensemencement : 10% (v/v)) instrumenté contenant 2 ou 4 L de milieu de culture (cf milieu de culture paragraphes II-1.1 ou II-1.2). La concentration en glucose et/ou lactose est définie en ajoutant un volume donné des solutions concentrées de façon à obtenir un volume final de 2 ou 4 L. Selon les cultures, les concentrations finales en glucose et/ou lactose varient de 10 à 50 g/L.

Un récapitulatif pour les deux souches est présenté dans le tableau ci-dessous (Tableau 5).

Etapes	(1)	(2)	(3)	(4)
Culture discontinue S. cerevisiae	2 mL de milieu dans un tube à essai	20 mL final de milieu dans un Erlens de 250 mL	200 ml de milieu final dans un erlens de 2 L	2 L de milieu final dans un fermenteur adapté pour 2 L maximum
Culture discontinue <i>E. coli</i>	4 mL de milieu dans un tube à essai	40 mL final de milieu dans un Erlens de 250 mL	400 ml de milieu final dans un erlens de 2 L	4 L de milieu final dans un fermenteur adapté pour 4 L maximum

Tableau 5 : Récapitulatif des étapes de cultures des différentes souches utilisées.

#### Mise en œuvre des cultures en bioréacteurs

Pour la caractérisation des cinétiques biologiques des souches de *E. coli* et de *S. cerevisiae* sauvages et recombinantes, deux types de réacteurs sont utilisés.

Les cultures des souches de *S. cerevisiae* ont été réalisées dans des réacteurs en verre de marque B. Braun (Biotech International), d'un volume utile de 2 L. Les cultures des souches *E. coli* ont été réalisées dans des réacteurs en verre de marque Sartorius, d'un volume utile de 4 L.

Lors des cultures, ces réacteurs sont protégés de la lumière afin d'éviter les phénomènes de « bleaching », c'est-à-dire des dispersions de fluorescence induites par les protéines fluorescentes consécutivement à l'excitation du fluorochrome par la lumière naturelle.

Les réacteurs sont instrumentés afin d'avoir un contrôle et une mesure en ligne des paramètres tels que la température, le pH, la pression partielle en oxygène dissous (pO<sub>2</sub>).

La sonde pH est calibrée avant autoclavage des réacteurs (121 °C, 1 bar, 20 minutes), la sonde pO<sub>2</sub> est calibrée après autoclavage des réacteurs, à l'air et à l'azote, et après un délai de 6h environ nécessaire à la polarisation de la sonde.

Le système d'agitation est du type turbine de Rushton (1 turbine pour les réacteurs de B. Braun 2 L, et 2 turbines pour les réacteurs Sartorius de 4 L).

Les réacteurs contiennent initialement 2 L et 4 L de milieu de culture respectivement pour les souches de *S. cerevisiae* ou de *E. coli*.

La source de carbone (glucose/lactose) ainsi que les solutions de thiamine et d'antibiotique pour *E. coli* ou les solutions d'oligo-éléments, de vitamines, de nucléotides et d'acides aminés pour *S. cerevisiae* sont ajoutés dans le réacteur après stérilisation.

Les volumes de solutions concentrées en source carbonée (glucose ou lactose) sont calculés et ajoutés initialement avant inoculation pour obtenir la concentration souhaitée dans le milieu. Des ajouts de source carbonée pourront être réalisés dès que le milieu de culture deviendra limitant pour la souche et seront précisés dans le texte.

La vitesse d'agitation est fixée initialement à 200 tours/minutes jusqu'à ce que la pression partielle en oxygène dissous (pO<sub>2</sub>) atteigne 20 % de la concentration de saturation à l'air à pression atmosphérique, puis augmentée de façon à ne pas limiter la culture en oxygène.

Dans certaines expériences la  $pO_2$  sera régulée à une valeur initialement fixée par contrôle de l'agitation et du débit d'aération.

#### 3. Méthodes analytiques : suivis des cultures

#### 3.1. Détermination de la biomasse (turbidimétrie, masse sèche)

#### 3.1.1. Mesure de la densité optique (DO) → turbidimétrie

L'évolution de la biomasse est estimée par spectrophotométrie à 600nm (spectrophotomètre Biochrom Libra S12) dans une cuve à usage unique de 1 cm de trajet optique. La suspension cellulaire est diluée afin d'obtenir une absorbance comprise entre 0,1 et 0,7 unité d'absorbance. La culture étant homogène, la mesure est réalisée en triple sur chaque prélèvement.

#### 3.1.2. Détermination de la masse de matière sèche

Des membranes (Sartorius Sortolon Polyamide 0,2 ou 0,45  $\mu$ m) sont préalablement séchées 24h dans une étuve sous vide modéré 200 mmHg à 60 °C et ramenées à température ambiante dans un dessiccateur avant d'être pesées. Un volume défini (5 à 20 mL) de suspension cellulaire homogénéisée est prélevé et filtré sur ces membranes avec un système de Büchner (pompe à vide KnR Lab). Les membranes sont à nouveau séchées et pesées. La masse de matière sèche par unité de volume est alors déterminée connaissant le volume filtré et la masse de micro-organismes obtenue après séchage.

#### 3.2. Dosage des substrats et des produits

3.2.1. Quantification de la concentration en glucose : méthode enzymatique

La concentration en glucose dans un échantillon est déterminée par méthode enzymatique par un analyseur YSI 27A (Yellow Springs Instruments). Le principe de mesure repose sur la détection de l'eau oxygénée libérée lors de la transformation du glucose en acide gluconique par une glucose-oxydase immobilisée sur une membrane selon l'équation de réaction suivante:

Glucose + 2 H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub> 
$$\rightarrow$$
 acide gluconique + 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

L'oxydation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par une électrode de platine libère un flux d'électrons. Le courant ainsi créé est proportionnel à la concentration en glucose.

L'appareil est calibré avec une solution de glucose de concentration connue à 2,5 g/L et la gamme de linéarité se situe entre 0,1 et 2,5 g/L. Les échantillons de milieu de culture sont préalablement centrifugés (12 000 g, 3 minutes) et la mesure est faite sur le surnageant. La précision de l'appareil est de l'ordre de 10 %.

3.2.2. Dosage des substrats et métabolites par HPLC («High Performance Liquid Chromatography»).

Les concentrations des substrats et métabolites (glucose, lactose, éthanol, glycérol, acides acétique et succinique) sont quantifiées par analyse HPLC au cours des cultures. La

chaine chromatographique utilisée (DIONEX Ultimate-3000) est équipé d'une colonne Aminex HPX 87 H (300 mm x 7,8 mm BIO-RAD), d'une double détection : réfractométrie (réfractomètre Shodex RI-101) et UV (détecteur UV à barrette diode Ultimate 3000 photodiode array detector) et d'un logiciel d'acquisition et de traitement de données (Chroméleon version 6,80). L'éluant est une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 5 mM à un débit de 0,5 mL/min. La boucle d'injection est de  $30\mu$ L. La température de la colonne est fixée à 50 °C. Les temps de rétention et les gammes d'étalonnage sont quantifiés pour chaque composé (Tableau 6).

Composé	Glucose	Lactose	Ethanol	Glycérol	Acétate	Pyruvate
$t_{R}$ (min)	11, 2	9,5	26,6	16,7	18,6	12,1
Gamme	0-20	0-20	0-30	0-10	0-5	0-5
d'étalonnage (g/L)						

Tableau 6 : Temps de rétention (t<sub>R</sub>) des composés quantifiés par HPLC

Pour l'analyse HPLC, 1 mL de milieu de culture est centrifugé pendant 3 min à 12 000 g. Le surnageant est récupéré et filtré sur filtres Sartorius (0,2 µm) puis injecté en HPLC.

# 3.3. Mesure de l'intensité de fluorescence

L'intensité de la fluorescence émise par les échantillons de culture cellulaire prélevés au cours des fermentations est mesurée par un spectrofluorimètre (Bioteck- Synergy HT), équipé d'un logiciel KC4 (Version 3.0 « PowerReports<sup>TM</sup> ») pour la définition des paramètres de mesures et la restitution des données. Les microplaques utilisées (96 puits) sont opaques afin d'éviter tout phénomène de fluorescence parasite d'un puits à un autre.

Afin de mesurer uniquement la fluorescence issue des micro-organismes et éviter les interférences dues à certains composés du milieu de culture, 1 mL de suspension cellulaire est centrifugé (12 000 g, 3 min), le surnageant est éliminé et remplacé par le même volume d'eau physiologique (solution aqueuse de NaCl à 9 g/L). Les cellules sont ensuite lavées et centrifugées à nouveau. La mesure de fluorescence est effectuée sur ce nouveau surnageant et si celle-ci est trop élevée (supérieure à 2 ou 3 UA), un nouveau rinçage est effectué dans les mêmes conditions que précédemment. Lorsque la fluorescence résiduelle du surnageant est estimée suffisamment faible (inférieur à 2 ou 3 UA), 150  $\mu$ L de suspension cellulaire sont prélevés et aliquotés dans trois puits différents. La mesure est effectuée sur la plaque dans les conditions adaptées à chaque type de fluorescence mesurée.

Ainsi, la sensibilité optimale et la gamme de linéarité de l'appareil ont été établies pour chacune des souches exprimant une protéine fluorescente.

Différentes valeurs de sensibilités ont été testées pour chaque souche (sur une échelle de 0 à 100 UA). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été adaptées aux spécificités des protéines fluorescentes produites par ces micro-organismes.

Le tableau ci-dessous (Tableau 7) reprend les conditions retenues pour la mesure de l'intensité de fluorescence émise par les protéines fluorescentes vertes et rouges.

	Longueur d'onde et	Longueur d'onde	Sensibilité	Linéarité (limitée
	bande passante du	et bande passante	retenue	par la biomasse)
	filtre d'excitation	du filtre	(UA)	
	(nm)	d'émission (nm)		
Protéine Gfp	485/20	528/20	50	0-1 g/L
	520/05	500/25	25	0.00./I
Proteine Rfp	530/25	590/35	35	0-20 g/L

Tableau 7 : Conditions retenues pour la mesure la fluorescence émise par les protéines vertes et rouges.

#### 3.4. Traitement des données issues des cultures cellulaires

Les différentes données (masses sèches, substrats, métabolites, intensité de fluorescence) sont lissées et traitées grâce au logiciel LIREC développé au sein de l'équipe « Génie Microbiologique Analyse systémique et Innovation en bioprocédés » du LISBP.

Ce logiciel comprend deux modules de calcul, le premier étant un module de lissage qui permet d'approcher les données expérimentales par régression polynomiale en minimisant le critère quadratique entre données expérimentales et calculées. Le deuxième module permet, à partir des données brutes ou lissées, de vérifier en dynamique le recouvrement des bilans carbone et des bilans d'oxydo-réduction.

#### III - Marquage des cellules par des colorants

# 1. Détermination de l'activité ou de la viabilité cellulaire

Différents colorants ont été utilisés pour déterminer la viabilité ou l'activité des levures.

L'Iodure de Propidium (IP), intercalant possible de l'ADN, est un colorant fluorescent qui doit être manipulé et éliminé selon des règles précises (Tableau 8).

Le bleu de méthylène (BM) et la Fluorescéine Di-Acétate (FDA), bien que moins toxiques présentent également quelques précautions d'emploi (Tableau 8). Les phrases de risque correspondantes sont indiquées en annexe I.

Colorant	Risques R	Conseils de prudence S
Bleu de méthylène	R22	S26; S36/37/39
FDA	R36	S36/37/39
Iodure de propidium	R40; R46	\$26; \$22; \$46; \$53; \$24/22
Rhodamine B	R22 ; R40	S26/39

Tableau 8 : Données de sécurité relatives aux colorants utilisés

#### 1.1. Marquage au bleu de méthylène

Le bleu de méthylène est un colorant pouvant être utilisé chez différentes espèces levuriennes (dont *S. cerevisiae*) comme marqueur de l'activité métabolique de ces genres microbiens. D'après Postgate (Postgate, 1967), le colorant pénètre dans les cellules et est réduit par des activités déshydrogénases ou estérases fonctionnelles dans les cellules actives. La forme réduite du bleu de méthylène est incolore alors que la forme initiale (oxydée) est bleue. Les cellules non colorées correspondent donc aux cellules dites actives alors que les cellules bleues seront comptées comme cellules mortes.

Le protocole de marquage est le suivant :

Un volume de solution de bleu de méthylène (0,1 g/L) est ajouté au même volume de suspension cellulaire. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les cellules sont observées au microscope optique.

La solution de bleu de méthylène est préparée avec 10 mg de bleu de méthylène et 2 g de tricitrate de sodium dihydraté pour 100 mL d'eau distillée. Cette solution est ensuite filtrée sur filtres Minisart 0,2 µm stériles (Sartorius).

#### 1.2. Marquage à la FDA

La FDA est une molécule fluorescente qui pénètre les membranes cellulaires des micro-organismes et est hydrolysée par les estérases intracellulaires en fluorescéine acide. Cette forme du fluorochrome émet une fluorescence dans le domaine du vert lorsque la suspension est exposée à une lumière d'excitation bleue. Les cellules mortes en l'absence d'activités estérases fonctionnelles sont incapables de réduire la FDA et restent incolores.

Le protocole de marquage est le suivant :

200  $\mu$ L d'une solution de FDA à 25 $\mu$ g/mL sont ajoutés à 500  $\mu$ L de suspension cellulaire ou de cellules rincées dans du NaCl si le milieu présente un risque d'autofluorescence élevé.

La solution de FDA à 25  $\mu\,g/mL$  est préparée comme suit :

Une solution concentrée est préparée à 5 mg/mL dans de l'acétone filtrée à partir d'une poudre de FDA (Sigma). Cette solution est conservée à l'abri de la lumière à -20 °C, puis diluée avant utilisation dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) pour atteindre une concentration de 25  $\mu$ g/mL.

Après 10 à 15 minutes d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la suspension est observée au microscope à épifluorescence ou au microscope confocal.

# 1.3. Marquage à l'IP

L'iodure de propidium (IP) est une molécule utilisée pour mettre en évidence l'intégrité membranaire. Ce marqueur est considéré comme un marqueur d'exclusion car il ne peut diffuser qu'à travers les membranes dégradées. Il se fixe alors aux acides nucléiques et induit une fluorescence rouge après excitation par une lumière de longueur d'onde proche du bleu. Les cellules ayant une paroi altérée apparaissent alors en rouge.

Le protocole de marquage est le suivant :

13  $\mu$ L d'une solution d'IP à 1 mg/mL (solution Sigma) sont ajoutés à 1 mL de milieu de culture, ou de cellules rincées dans du NaCl si le milieu présente un risque d'autofluorescence élevé. Les cellules sont observées au microscope à épifluorescence ou au microscope confocal après 10 minutes d'incubation à l'obscurité.

#### 2. Marquage global des cellules dans des agrégats à la Rhodamine B

La rhodamine B est utilisée en biologie comme fluorochrome. Ce colorant a été utilisé pour marquer les levures, dans les proportions suivantes: 50  $\mu$ L d'une solution de Rhodamine B de concentration 0,5 g/L pour 100  $\mu$ L de culture.

C'est un produit classé cancérogène de catégorie 3 CIRC, c'est-à-dire suspecté cancérigène pour l'homme sans études suffisantes pour le classer cancérigène et qui doit être manipulé avec des précautions adéquates. (Tableau 8).

# IV - Méthodologie d'étude de l'effet de l'oxygène sur la protéine Gfp produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A pYGfp

Deux méthodes différentes ont été mises en œuvre afin d'évaluer l'impact de l'oxygène sur la protéine Gfp (soit extraite des cellules soit intracellulaire).

#### 1. Protéine Gfp extraite des cellules

La protéine fluorescente est extraite de cellules de levures *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp cultivées pendant 20 h à 30 °C dans un milieu minéral (cf milieu de culture paragraphes II-1.1 ou II-1.2) sous agitation (130 tours/min).

150 mL issus d'une suspension cellulaire à 1 g/L sont prélevés centrifugés à 4500 g, pendant 3 min, à 4°C. Le culot cellulaire est récupéré, lavé avec de l'eau distillée à 4 °C et centrifugé dans les mêmes conditions opératoires que précédemment. Le culot cellulaire est ensuite récupéré dans 5 mL de tampon de cassage (Tris-HCl 50 mM pH 7,8 ; KCl 100 mM; EDTA 1 mM et DTT 1 mM) et 5 g de microbilles (0,5 mm de diamètre) sont ajoutés au culot cellulaire qui subit alors 6 cycles d'agitation (vortex 30 s et arrêt de 15 s dans la glace entre chaque cycle). L'extrait est centrifugé à une vitesse de 4500g pendant 10 min, à 4 °C. 4 mL de surnageant sont récupérés et stockés dans de la glace avant analyses, la présence de billes ne permettant de récupérer que 80 % du volume (4 mL récupérés sur 5 mL de tampon).

Les valeurs de fluorescence initiales étant suffisamment élevées (environ 650-700 unités arbitraires), l'extrait est dilué 10 fois dans du liquide physiologique (NaCl 9g/L), le volume final obtenu est de 40 mL. Le pH, mesuré initialement et pendant l'expérience, reste constant aux environs de 7. L'expérience est réalisée à la température ambiante stabilisée à 22 °C.

La solution d'extrait protéique diluée (40 mL) est placée dans un bécher recouvert de coton cardé à l'obscurité afin d'éviter tout phénomène parasite sur l'émission de fluorescence.

La solution est aérée (flux d'air de 0,5 mL/min), par un dispositif de bullage conçu pour réduire la taille des bulles. La valeur du débit d'air a été ajustée afin d'obtenir une réponse rapide sur la variation de pression partielle en  $O_2$  dissous, tout en minimisant l'évaporation de l'extrait. La perte globale de liquide (due à l'évaporation) est néanmoins quantifiée par pesée.

Un agitateur magnétique est placé sous le récipient afin de garantir un mélange et un transfert d'oxygène convenables. La cinétique de variation de la pO<sub>2</sub> est déterminée grâce à une sonde pO<sub>2</sub> préalablement étalonnée. 500  $\mu$ L de solution sont prélevés au cours du temps et des triplicats (150  $\mu$ L) sont analysés sur chaque prélèvement au spectrofluorimètre à plaque afin de quantifier la dynamique de variation de l'intensité de fluorescence.

Le dispositif mis en place pour cette expérience est représenté sur la figure ci-dessous (Figure 21).



Figure 21 : Dispositif d'étude de l'impact de l'oxygène sur la protéine Gfp en solution.

#### 2. Protéine Gfp intracellulaire

Pour étudier l'effet de l'oxygène sur la protéine intracellulaire, 40 mL d'une culture de *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp (la même culture que celle utilisée pour réaliser l'extrait cellulaire de la protéine Gfp) sont centrifugés. Le culot cellulaire est remis en suspension dans du liquide physiologique (NaCl 0,9 %). Comme précédemment, la suspension cellulaire est aérée (flux d'air 0,5 L/min) (Figure 21). L'intensité de fluorescence émise par les cellules est mesurée régulièrement par prélèvements d'échantillons comme décrit précédemment. Le pH, initial et mesuré pendant l'expérience, est resté constant (environ 7). L'expérience est réalisée à température ambiante (22 °C).

#### V - Dispositifs expérimentaux pour l'étude d'agrégats biologiques

#### 1. Dépôts sous contrainte de pression contrôlée

Une cellule de filtration (Figure 22) a été conçue et développée afin de pouvoir observer *in-situ* la formation et / ou la structure de dépôts biologiques. Elle est composée d'une chambre contenant une membrane céramique de 4,5 cm de diamètre (TAMI industries, ref MPD47000M020) dont le seil de coupure est de 0,2  $\mu$ m, sur laquelle le dépôt va être réalisé. Le couvercle de la chambre comporte de part et d'autre d'une fenêtre d'observation recouverte d'une lamelle, deux connections permettant l'injection des micro-organismes et / ou de liquide (milieu, eau physiologique). Cette fenêtre supérieure permet la visualisation directe par microscopie des micro-organismes se déposant sur la membrane. Le support inférieur sur lequel repose la membrane comporte un « cône » d'aspiration pour la sortie du perméat.

Cette cellule est reliée au niveau de la sortie du perméat à une pompe (Gilson Minipuls 2, gamme de débits utilisée de 0 à 1 L/h, c'est à dire un débit spécifique sur la membrane de 0 à 508 L/(h.m<sup>2</sup>)). La pression est mesurée grâce à un manomètre digital (VD81MC Thyacount), permettant une gamme de mesure de  $5 \times 10^{-4}$  à 1200 mbars avec une précision d'environ 5 mbars (données constructeur : +/- 0,4 % de la pleine échelle).

La pression transmembranaire est obtenue par différence entre la pression mesurée à l'aval de la membrane et la pression atmosphérique (Figure 23). En effet, dans la gamme de débits utilisés, les vitesses étant très faibles, les pertes de charges sur le circuit peuvent être négligées (annexe II).

La perméabilité au solvant (solution de NaCl à 0,9%) de la membrane propre est déterminée selon la procédure suivante :

- 1 la pompe de soutirage du perméat est réglée à un débit minimal
- 2 la valeur de la pression est consignée lorsque la stabilité est atteinte
- 3 le débit est augmenté et la procédure est répétée



Entrées pour injections de liquide physiologique et de micro-organismes

Lamelle couvrant la fenêtre d'observation Membrane céramique

Cône d'aspiration pour la sortie du perméat

Figure 22 : Schéma en coupe de la cellule de filtration conçue pour l'étude dynamique des dépôts



Figure 23 : Dispositif expérimental pour l'étude de l'impact de la pression sur un dépôt biologique.

La procédure expérimentale suivie pour créer des dépôts et étudier leurs propriétés repose sur une séquence de différentes étapes :

1- 1 mL de suspension cellulaire (culture pure ou mélange) défini de façon à obtenir une masse de micro-organismes fixée est injecté dans la cellule de filtration

2- La chambre, dont le volume total est d'environ 1,6 mL, est entièrement remplie avec de l'eau physiologique de façon à chasser toute bulle d'air (pour cela, la seconde connexion sur le couvercle de la chambre est ouverte). La seconde connexion de la chambre est refermée après avoir homogénéisé la suspension (aspiration-refoulement avec une seringue et agitation manuelle).

3- La cellule de filtration frontale qui est spécifiquement conçue pour permettre l'observation directe des dépôts formés durant la filtration, est placée directement sur la platine porte objet du microscope confocal.

4- La pompe d'aspiration, à l'aval de la membrane, est mise sous tension pendant 2 à 3 secondes, ce qui correspond à un volume filtré d'environ 0,5 mL, de façon à forcer le dépôt de quelques micro-organismes sur la surface de la membrane. Cette étape permet de repérer la zone de dépôt et de régler les paramètres géométriques d'acquisition (dans l'axe z).

5- La filtration est initiée en appliquant un flux de filtration faible (de 1,5 à 5  $L/(h.m^2)$ ), qui est mesuré sur le circuit de retour du perméat.

6- La pression transmembranaire est mesurée grâce au manomètre placé à l'aval de la membrane lorsqu'elle est stabilisée (dans les conditions de ces essais, le temps nécessaire pour la stabilisation est de l'ordre de 2-3 minutes environ),

7- L'acquisition d'images est ensuite réalisée selon des conditions établies au préalable en observant un échantillon de la suspension cellulaire ou un dépôt témoin.

#### 2. Génération de biofilms

### 2.1. Dispositif

Les réacteurs utilisés sont les mêmes que ceux décrits pour les cultures discontinues de la souche *S. cerevisiae*. Le dispositif développé est présenté sur la figure suivante (Figure 24).



Figure 24 : Dispositif de mise en œuvre des cultures en mode continu.

Lors de la conduite d'une culture en mode continu, le fermenteur dans lequel se trouvent les micro-organismes est alimenté par du milieu frais à débit constant par une pompe (Masterflex, console drive). Le volume du fermenteur est maintenu constant grâce à une régulation de niveau par surverse ; la pompe de soutirage (Masterflex console drive) fonctionnant à un débit légèrement supérieur à celui d'alimentation. Ce mode de culture permet aux micro-organismes d'être continuellement approvisionnés en milieu frais dans des conditions sélectionnées, l'expérience peut donc être poursuivie sur une durée importante. L'expérience qui a été menée s'est déroulée sur 10 jours, durée nécessaire pour étudier

l'implantation des souches et aboutir à la formation d'un biofilm. La température du réacteur est régulée à 30 °C, pour favoriser l'implantation de la levure, et le pH est régulé à 6.

Un des paramètres clé dans la conduite du réacteur en mode continu est le taux de dilution D qui conditionne l'apport de milieu et fixe le taux de croissance des microorganismes lorsque le régime permanent est atteint. Le taux de dilution est définit comme suit :

$$D = Q / V$$

V est le volume total de milieu dans le réacteur et la boucle de recirculation, fixé ici à 974 mL, Q est le débit d'alimentation fixé initialement à 3,3 mL/min (ou  $\approx$  0,2 L/h).

Dans ces conditions, le taux de dilution est d'environ  $0,2 h^{-1}$ , le temps de séjour correspondant est de 5 h.

Le réacteur sera dans un deuxième temps alimenté en milieu de culture frais à un taux de dilution de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  ce qui correspond respectivement à des débits globaux de 0,1 L/h.

L'originalité de ce dispositif continu est la boucle de recirculation, comprenant différents tronçons dans lesquels sont placés des coupons sur lesquels des micro-organismes peuvent s'implanter et former un biofilm. Ce système de boucle externe permet de prélever stérilement au cours du temps des échantillons de biofilm se développant sur des coupons dans différents compartiments, sans perturber la dynamique globale de formation.

Ces coupons sont des coupons autoclavables, en polyéthylène, de 8 mm de large sur 1,5 cm de long environ, de façon a pouvoir être placés de façon stable dans les tuyaux de la boucle de recirculation dont le diamètre interne est de 8 mm. Le débit de recirculation dans la boucle a été fixé à 45 mL/min, ce qui correspond à un temps de séjour dans la boucle inférieur à 50 secondes. Cette valeur a été sélectionnée de façon à réaliser un compromis entre une vitesse de circulation qui ne pénalise pas la formation du biofilm et un temps de séjour dans la boucle court par rapport aux cinétiques biologiques. Sur cette durée compte tenu de l'activité des micro-organismes, les réactions biologiques peuvent être négligées (taux de croissance de  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ), Dans ces conditions, la vitesse du liquide reste en effet modérée, environ 1,5 cm/s compte tenu du diamètre de la conduite dans la boucle de recirculation qui est de 8 mm.

La culture continue est réalisée après une phase discontinue de 10-12 heures environ correspondant à la consommation quasi-totale de la source carbonée initialement présente dans le milieu (2 g/L environ de glucose résiduel contre 20 g/L initialement).

#### 2.2. Analyse des coupons en polyéthylène

- Images en microscopie électronique : les coupons ont été observé par microscopie électronique à balayage (JEOL JSM-6380LV), avec et sans dépôt d'un film carbone.
- Rugosimétrie : la rugosité des coupons a été mesurée à l'aide d'un rugosimètre à contact classique, sur des longueurs de 0,8 cm. Des moyennes ont ensuite été réalisées sur 10 mesures.

# VI - Acquisition et traitement des images

# 1. Acquisition des images 2D

Un microscope à épifluorescence LEICA DM 4000 B équipé de cubes « blocsfiltres », composés chacun d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre barrière a été utilisé pour ce travail. Les blocs-filtres correspondent aux principaux fluorochromes utilisés en microbiologie comme la FDA, les protéines Gfp, l'IP, la rhodamine B, ou les protéines fluorescentes rouges type DsRed. Les différents blocs-filtres disponibles sur le matériel utilisé sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 9).

Bloc-filtre	Filtre d'excitation (longueur	Filtre d'émission (longueur
	d'onde en nm)	d'onde en nm)
DAPI	360 (+/- 40)	470 (+/-40)
FITC	480 (+/- 40)	505 (+/- 30)
Cy3	545 (+/- 30)	610 (+/- 75)
Cy5	620 (+/- 60)	700 (+/- 75)

Tableau 9 : Bloc-filtres disponibles sur le microscope à épifluorescence LEICA DM 4000 B

Cet appareil peut également être utilisé pour visualiser les micro-organismes en fond clair ou en contraste de phase. Dans le cas d'observation en contraste de phase, les anneaux de lumière sont pré-ajustés et le changement d'objectif ne nécessite aucun réajustement.

Quatre objectifs X10, X20, X40 et X100 sont disponibles sur ce microscope. L'objectif X100 est utilisé en immersion à huile. Les autres objectifs sont utilisés sans immersion. La source lumineuse est une lampe EL 6000 (Leica).

#### 2. Acquisition des images 3D

Les observations des dépôts sont réalisées sur un microscope confocal LEICA (LEICA SP2, DMRXA2) équipé de différents objectifs (les objectifs utilisés sont des objectifs longues distances X20 ou X40, en immersion à eau) et de différents filtres et détecteurs. Ces équipements permettent la visualisation simultanée et la différenciation des différentes protéines ou molécules fluorescentes grâce à des lasers ayant une ou plusieurs raies d'excitation :

- Le laser Argon possède 4 raies d'excitation à 458, 476, 488 et 514 nm, de puissance respectives 5mW, 5mW, 20 mW et 20 mW.

- Le laser Hélium-Néon possède une raie d'excitation à 543 nm de puissance 1,2 mW.

Un traitement statistique peut être effectué sur chaque image afin de réduire le bruit de fond et obtenir une meilleure résolution.

Au cours des expériences (notamment dans le cas de l'observation des dépôts), les paramètres d'acquisition du microscope confocal sont maintenus constants. Pour les expériences relatives aux biofilms, les paramètres ont été définis de manière optimale, c'est-àdire avec un gain et un « offset » pour chaque photomultiplicateur qui permettent d'obtenir une image nette, sans saturation et non bruitée. Pour rappel, le gain correspond à un étage d'électrodes (dynodes) donné lors de l'amplification des électrons et l'offset permettant de "jouer" sur le seuil bas du photomultiplicateur, c'est-à-dire sur son seuil de détection.

Les valeurs de paramètres d'acquisition pouvant varier selon l'étude, elles seront indiquées lors de la présentation des résultats.

Pour chaque acquisition, un lot, ou ensemble (ou stack), d'images pour chaque plan z de l'échantillon est enregistré. La taille moyenne d'un fichier peut varier en fonction de nombreux paramètres (surface scrutée, épaisseur, moyennage...) mais est globalement comprise entre 100 et 400 mégaoctets.

#### 3. Traitement et analyse d'images

Les images obtenues en 2D ou en 3D sont analysées grâce au logiciel commercial Volocity® (Improvision) ou au logiciel Image J (en libre accès sur internet).

La plupart de nos analyses ainsi que la reconstruction 3D ont été réalisées avec le logiciel Volocity® qui comprend des modules performants notamment pour la reconstruction et la quantification sur les images. Les comptages cellulaires ainsi que quelques analyses

d'intensité de fluorescence sur les images ont été réalisés avec Image J. Le logiciel utilisé sera indiqué pour chaque étude.

Le principe de traitement réside dans la calibration des images d'après la taille des pixels (largeur, longueur) dans le cas d'images 2D ou de voxels pour des images 3D (largeur, longueur, épaisseur) et la définition d'un seuil permettant de définir les pixels ou voxels considérés comme étant du bruit de fond et ceux étant du signal correspondant aux objets fluorescent à étudier.

Un voxel, ou « volumetric pixel » est un pixel en 3D et représente la plus petite unité composant l'image. La taille des voxels dépend des paramètres d'acquisition, notamment du pas choisi entre chaque plan z et de l'objectif utilisé pour l'observation. Un voxel étant toujours un parallélépipède et non un cube, la résolution axiale (en z) est différente de la résolution radiale (en xy).

Outre la reconstruction 3D de l'image, le logiciel Volocity® permet de réaliser des mesures d'épaisseur, de volume, de surface et de quantifier le niveau de co-localisation des différentes fluorescences utilisées (module de quantification associé au logiciel).

# Résultats Chapitre I : Aspects méthodologiques

#### I - Construction et caractérisation des souches autofluorescentes

La construction de souches recombinantes nécessite un minimum de connaissance sur les caractéristiques du micro-organisme notamment sur son génome et ses spécificités métaboliques. La transformation d'une souche sauvage peut être réalisée de différentes façons en incorporant le gène d'intérêt, soit de façon classique par le biais d'un plasmide, soit directement dans le génome, la capacité à synthétiser la fonction d'intérêt devenant alors constitutive. Dans tous les cas, l'isolement des souches transformées nécessite des facteurs de sélection qui sont fonction du type de construction réalisée. Par exemple, des souches bactériennes transformées peuvent être sélectionnées parce qu'elles ont acquis une capacité de résistance à un antibiotique que la souche sauvage ne possédait pas initialement. Cette résistance peut être acquise par l'incorporation d'un fragment d'ADN codant pour une résistance à cet antibiotique. Le fragment incorporé comportera également les autres gènes d'intérêt correspondant aux caractéristiques que l'on souhaite faire acquérir à la souche recombinante (gène codant pour l'expression une molécule particulière, gène codant pour des enzymes permettant de nouvelles fonctions inexistantes dans la souche sauvage, ...). L'antibiotique devra ainsi être ajouté au milieu au moment de la transformation pour permettre la sélection des recombinants et parfois lors des cultures réalisées ultérieurement.

Pour les cellules eucaryotes, la stratégie repose souvent sur l'existence d'auxotrophies vis-à-vis d'acides aminés ou de nucléotides. Les souches sauvages ne pouvant pas synthétiser ces éléments indispensables à leur croissance, elles ne peuvent se développer que si ce composé est ajouté dans le milieu. Cette caractéristique, propre à chaque souche, peut être utilisée comme facteur de sélection, en incorporant un fragment d'ADN portant un gène qui leur permettra de synthétiser l'élément pour lequel la souche sauvage est auxotrophe. Seules les lignées issues des cellules qui auront incorporé ce plasmide le garderont et pourront se développer sur un milieu défini ne contenant pas l'élément sur lequel est basé le système de sélection. Cette stratégie peut également être appliquée aux cellules procaryotes, à condition qu'elles possèdent une auxotrophie.

Dans cette étude, l'objectif était de rendre auto-fluorescentes des souches connues pour leur implication dans divers procédés agro-alimentaire ou de traitement de l'eau. Le choix réalisé pour les constructions s'est porté sur les espèces *E. coli* et *S. cerevisiae* qui se sont avérées les meilleures candidates pour les transformations.
#### 1. Saccharomyces cerevisiae autofluorescentes

1.1. Construction de la souche eucaryote <u>Saccharomyces cerevisiae</u> autofluorescente

La souche PJ69-4A a été choisie car elle possède une auxotrophie vis-à-vis du tryptophane, caractéristique indispensable pour assurer le maintien du plasmide pYGfp choisi pour la transformation. La levure *S. cerevisiae* a été rendue compétente afin de faciliter la pénétration d'un plasmide par la méthode à l'acétate de lithium (LiAc). Cette méthode repose sur la fragilisation et la perméabilisation de la membrane cellulaire afin de pouvoir faire pénétrer une ou plusieurs copies d'un plasmide grâce à un choc thermique. Le plasmide inséré est le plasmide pYGfp, qui a été choisi par rapport à des propriétés d'induction bien précises, à savoir :

- une séquence codant pour une protéine fluorescente, la yEGfp (pour «Yeast Enhanced Gfp »), qui est une protéine optimisée permettant une intensité de fluorescence plus importante que la Gfp d'origine (celle d'*Aequoria victoria*) grâce à la modification de certains codons (Cormack *et al*, 1997). La dénomination des protéines fluorescentes peut varier selon les fournisseurs ou selon des modifications apportées sur les protéines, mais nous utiliserons dans la suite de la présentation des résultats la dénomination Gfp comme abréviation de la protéine yEGfp. L'expression de cette protéine est sous contrôle du promoteur ADH1, qui régule chez la souche sauvage la synthèse de l'enzyme « alcool déshydrogénase », intervenant lors de la croissance sur glucose dans la transformation de l'acétaldéhyde en éthanol en mode réductif ou oxydo-réductif.

- une séquence codant pour un gène intervenant dans la biosynthèse du tryptophane. La souche sauvage possédant une auxotrophie vis-à-vis de ce composé, l'intégration du plasmide lui permet de pouvoir se développer dans un milieu sans tryptophane. Ceci constituera le facteur de sélection des souches recombinantes.

L'organisation des gènes portés par le plasmide pYGfg est présentée sur la figure suivante (Figure 25).



Figure 25 : Carte du plasmide pYGfp portant le gène codant pour la protéine fluorescente Gfp

# *1.2. Cinétique de croissance de la souche* <u>Saccharomyces cerevisiae</u> *sauvage et de son recombinant*

La cinétique de croissance de la souche *S. cerevisiae* PJ69-4A dans laquelle a été inséré le plasmide codant pour la protéine fluorescente verte Gfp a été comparée à la cinétique de croissance de la levure sauvage. Les cultures sont menées en mode discontinu dans des fermenteurs en verre protégés de la lumière et contenant 2L de milieu minéral spécifiquement défini pour *S. cerevisiae* PJ69-4A (cf milieu de culture paragraphes II-1.1 ou II-1.2). Le glucose est la seule source de carbone et du tryptophane est ajouté dans le réacteur contenant la souche sauvage pour pallier l'auxotrophie qui la caractérise.

Les cinétiques de croissance, production et consommation des levures sont quantifiées au cours du temps par la mesure des masses sèches et dosage des concentrations des produits et du substrat (glucose) (mesurées par HPLC). Les données expérimentales sont lissées (traits pleins et pointillés) grâce au logiciel LIREC (cf matériel et méthodes II-4.4.) et présentées sur la figure ci-dessous (Figure 26).



**Figure 26 :** Courbes de croissance de la souche *S. cerevisiae* PJ69-4A ( $\blacktriangle$ ) et de son recombinant *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp ( $\blacklozenge$ ) et de consommation du glucose par la souche sauvage ( $\bullet$ ) et la souche recombinante ( $\blacksquare$ ).

Les concentrations en glucose utilisées initialement sont respectivement de 12 g/L et 16,5 g/L pour les souches sauvage et recombinante. Malgré cette légère différence de concentration initiale en substrat, les comportements des deux souches sont similaires. Les profils de croissance sont très proches et la croissance débute rapidement, aussi bien pour la souche sauvage que pour la souche recombinante.

Pour les souches sauvage et modifiée, les temps nécessaires pour la consommation totale du glucose sont de respectivement de 17 et 20 heures, la biomasse formée (exprimée en masse sèche) correspondante est de 1,43 g/L et 1,55 g/L.

Dans les conditions expérimentales de ces essais, les taux de croissance maximaux des deux levures sont de  $0,325 \pm 0,025$  h<sup>-1</sup>.

Les rendements de croissance par rapport à la source de carbone  $(Y_{X/S})$  sont donc respectivement de 0,10 et 0,08 gramme de biomasse produite par gramme de glucose consommé pour la souche initiale et la souche modifiée.

L'analyse des co-produits pour les deux souches permet de calculer les différents rendements de production de ces principaux co-métabolites :

- Les concentrations en glycérol atteignent 0,82 g/L pour la souche modifiée et 0,59 g/L pour la souche sauvage, ce qui correspond respectivement à des rendements globaux  $Y_{P/S}$  de 0,049 et 0,050 gramme de glycérol produit par gramme de glucose consommé.

- Les concentrations en éthanol produit sont de 7 g/L pour la souche modifiée et 4,3 g/L pour la souche sauvage, ce qui correspond respectivement à des rendements globaux Y  $_{P/S}$  de 0,43 et 0,35 gramme d'éthanol produit par gramme de glucose consommé.

La transformation génétique ne semble donc pas avoir modifié de façon significative le comportement de la levure. La souche de *S. cerevisiae* exprimant une protéine fluorescente pourra donc être utilisée comme modèle d'étude pour caractériser le comportement d'une levure dans une structure microbienne complexe.

# 1.3. Production spontanée de pigment chez Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A

La souche *S. cerevisiae* PJ69-4A possède la capacité lorsqu'elle est cultivée dans certaines conditions de milieu, notamment une concentration en adénine limitante, de produire un pigment rouge (Chaudhuri *et al*, 1997).

En effet, chez cette levure l'un des gènes participant à la biosynthèse de l'adénine a été délété (ADE2-). L'absence de ce gène lors de la croissance sur un milieu avec une concentration en adénine limitante, conduit à l'accumulation d'un intermédiaire, AIR (phosphoribosylaminoimidazole), la voie de biosynthèse de ce composé étant réprimée lorsque la souche se développe dans un milieu contenant suffisamment d'adénine (Sharma *et al*, 2003). L'intermédiaire AIR se pigmente suite à différentes réactions ayant lieu après son accumulation (condensation, polymérisation). D'autres facteurs environnementaux et physiologiques, tels que la température de culture, l'aération, la concentration en glucose, et la présence de différents éléments comme les acides aminés et les purines, l'âge de la culture, sont connus pour influencer le niveau de pigmentation (Chaudhuri *et al*, 1997 ; Sharma *et al*, 2003). Les étapes conduisant à l'accumulation du pigment sont présentées sur la figure suivante (Figure 27).



Figure 27 : Etapes menant à l'accumulation et la maturation du pigment rouge dans la vacuole (Sharma *et al*, 2003).

Cette pigmentation naturelle étant apparue au cours de certaines cultures, une étude spécifique a été réalisée afin de préciser les conditions de production ou de non production, et pouvoir utiliser cette capacité de synthèse du pigment pour caractériser un état d'appauvrissement du milieu local réactionnel et faire un lien éventuel avec des aspects transfert de matière. La levure *S. cerevisiae* PJ69-4A a été cultivée dans un milieu YNB avec 20 g/L de glucose et des concentrations variables en adénine.

La concentration en glucose a été choisie pour obtenir une croissance rapide et atteindre une concentration en biomasse faible (environ 2 g/L) pour éviter toute carence en adénine pendant la durée de l'expérience autre que celle imposée par la concentration initiale en adénine.

Certains chercheurs ont quantifié ce pigment après extraction cellulaire et mesure de l'absorbance à 530 nm (Chaudhuri *et al*, 1997). Néanmoins, ce pigment présentant des propriétés de fluorescence, la détermination de la quantité de pigment produit sur levures entières peut être réalisée en microscopie à épifluorescence 2D ou en microscopie confocale 3D par analyse d'images sur la base de l'intensité de fluorescence émise.

Pour cela, la souche sauvage *S. cerevisiae* PJ69-4A a été inoculée dans 15 mL de milieu YNB contenant quatre concentrations différentes en adénine comprises entre 0 et 0,02 g/L, gamme définie suite à des essais préliminaires sur une gamme de 0 à 0,1 g/L. Les cultures ont été mises sous agitation à 30°C et à l'obscurité pendant 24h. Afin de déterminer si l'adénine est bien le seul élément limitant, le glucose est dosé en fin de croissance. Les cultures pour

lesquelles la concentration résiduelle en glucose est non nulle sont remises à incuber pendant quatre à cinq heures à l'issue desquelles la concentration est à nouveau mesurée afin de vérifier que la croissance était bien terminée.

Chaque essai est dupliqué et les cultures sont observées au microscope à épifluorescence, avec le bloc-filtre Cy3 permettant de visualiser la pigmentation rouge des levures. Les paramètres d'acquisition, et notamment le temps d'exposition fixé à 4,5 secondes, sont gardés constants dans tous les essais. Aucun traitement n'a été appliqué sur les images, hormis une recalibration d'après la taille des pixels. L'intensité de la pigmentation est mesurée par l'analyse des images obtenues à l'aide du logiciel ImageJ. La valeur obtenue appelée intensité de fluorescence spécifique est ramenée au nombre total de cellules apparaissant sur les images correspondantes en fond clair. Les images obtenues sont présentées sur la figure ci-dessous (Figure 28) et l'intensité spécifique de fluorescence pour chaque condition est présentée dans le tableau ci-dessous (Tableau 10).

Tableau 10 : Intensité de fluorescence spécifique en fonction de la concentration en adénine dans le milieu.

	milieu 0 (0,0 mg/L d'adénine)	milieu 1 (0,005 g/L d'adénine)	milieu 2 (0,01 g/L d'adénine)	milieu 3 (0,02 g/L d'adénine)
Image en fluorescence	-	1a	2a	3a
Intensité spécifique de fluorescence moyenne	-	8402 (+/- 1020)	4498 (+/- 1394)	417 (+/- 147)







Figure 28 : Images obtenues au microscope à épifluorescence à l'objectif X40, en fluorescence avec le blocfiltre Cy3 (a) et en lumière blanche (b), pour les milieux 1, 2 et 3.

Le niveau de pigmentation des levures apparaît très hétérogène. L'intensité globale de la pigmentation est restée assez faible même dans les cultures pour lesquelles la concentration en adénine est limitante.

Un graphe représentant l'intensité de fluorescence (Figure 29), en fonction de la concentration en adénine peut également être tracé afin de définir la concentration pour laquelle la synthèse du pigment rouge débute.



Figure 29 : Intensité de fluorescence spécifique en fonction de la concentration en adénine dans le milieu. La droite en pointillés correspond au modèle linéaire, la courbe en trait plein au modèle exponentiel.

Lorsqu'on traite ces résultats par une régression linéaire, la concentration limitante en adénine contrôlant la production de pigment est de 0,020 g/L. Un modèle exponentiel nous permet de déterminer 3 zones de contrôle de la production ou non de pigment rouge :

- lorsque la concentration en adénine est inférieure à 0,005 g/L, l'intensité spécifique de fluorescence est maximale
- lorsque la concentration en adénine est comprise entre 0,005 g/L et 0,020 g/L, l'intensité spécifique de fluorescence suit un modèle d'inactivation de type exponentiel en fonction de la concentration croissante en adénine dans le milieu,

 lorsque la valeur de concentration en adénine est de 0,020 g/L, seuil trouvé par le modèle linéaire, l'intensité spécifique de fluorescence est réduite d'un facteur 100. La synthèse du pigment est relativement faible.

Aussi, si l'on souhaite mettre à profit cette pigmentation naturelle pour identifier et localiser cette levure dans un agrégat ou faire le lien avec des limitations nutritionnelles locales, il faudra donc que la concentration en adénine soit inférieure à cette 0,01g/g biomasse produite. Il convient toutefois de préciser que cette pigmentation étant apparue assez hétérogène dans les conditions testées, une étude plus rigoureuse devrait être menée pour utiliser cette propriété intrinsèque de cette souche comme marqueur de conditions locales.

Ces résultats nous permettent néanmoins de définir une concentration minimale d'adénine à utiliser si l'on veut au contraire éviter la synthèse du pigment et son accumulation et donc supprimer tous phénomènes d'interférence si la levure est cultivée en présence d'autres souches recombinantes exprimant des protéines fluorescentes rouges.

Ces résultats argumentent donc l'utilisation de milieux de culture contenant des concentrations minimales en adénine de 0,01g/g biomasse produite.

# 1.4. Etude de la sensibilité de la protéine Gfp à l'oxygène

Le contexte de notre travail s'intéresse plus particulièrement à des structures microbiennes complexes au sein desquelles, même dans des procédés aérés, l'oxygène peut devenir localement limitant du fait de la structuration et de l'organisation des populations dans ces agrégats pouvant constituer un frein aux phénomènes de transfert de matière.

L'étude bibliographique ayant montré que l'oxygène était l'élément majeur intervenant le mécanisme de maturation de la protéine Gfp, en participant à la formation d'une double liaison entre deux carbones de la tyrosine (Yang *et al*, 1996), l'étude de l'impact de l' $O_2$  sur le potentiel sur la fluorescence de la levure *S. cerevisiae*, souche aérobie, et de la protéine Gfp est apparue primordiale.

Des expériences ont donc été menées afin de préciser et quantifier le rôle de l'oxygène. Les études ont concerné la protéine Gfp extraite de levures *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp recombinante et des suspensions de levures de *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp exprimant la protéine Gfp.

Pour cela, une culture de *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp a été réalisée en Erlenmeyer sur milieu minéral sans tryptophane et placée sous agitation à l'obscurité à 30°C pendant 20h.

Cette culture est ensuite séparée en deux aliquots, l'un d'eux est utilisé pour réaliser l'extraction de la protéine Gfp, le second est centrifugé et les cellules sont remises en suspension dans du NaCl à 9 g/L. La linéarité des mesures de fluorescence sur l'extrait cellulaire ou les cellules entières a été vérifiée et validée dans les gammes de concentration de cellules et de fluorescence étudiées.

Dans les deux cas, 40 mL de solution d'extrait cellulaire ou de suspension de levures sont soumis à un flux contrôlé d'air pour évaluer l'effet de l'oxygène sur la fluorescence. L'évaporation consécutive au flux d'air a été quantifiée en moyenne à 0,56 mL/h. Cette évaporation induit une modification du volume réactionnel (faible au départ) qui, compte tenu de la durée de l'essai, n'est pas prise en compte pour l'expérience sur l'extrait cellulaire, dont la durée totale est d'environ une heure. En revanche, elle est prise en compte dans le calcul des valeurs de fluorescence pour l'expérience réalisée sur la suspension cellulaire qui s'est prolongée durant 50 h (soit 28 mL).

#### 1.4. 1. Cas de la protéine Gfp extraite de la cellule

Les valeurs initiales de fluorescence directement mesurées en microplaques pour l'extrait protéique Gfp issu de la culture de levures *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp étant élevées, l'extrait est dilué 10 fois dans du NaCl (9g/L). L'intensité de fluorescence est ramenée à la quantité initiale de cellules ayant été lysées pour cette expérience. Les résultats sont présentés sur la figure suivante (Figure 30).



**Figure 30 :** Evolution de la pression partielle en oxygène dissous (pO<sub>2</sub>) (■) et de l'intensité de fluorescence spécifique d'un d'extrait protéique au cours du temps (♦) soumis à un flux d'air (0,5 L/min) à pression atmosphérique.

De façon globale, ce profil d'évolution met en évidence une augmentation importante de la fluorescence au cours du temps lorsque la protéine est mise au contact de l'oxygène ; conformément aux informations issues de l'étude bibliographique (cf étude bibliographique paragraphe II-1.), l'oxygène semble bien agir sur la maturation de la protéine.

Pendant les premières minutes, alors que la concentration en oxygène dissous croit, l'intensité de fluorescence spécifique reste stable à sa valeur initiale. Cette phase de latence pouvant indiquer que le phénomène de maturation/oxydation de la protéine n'est pas instantané ou qu'une concentration minimale d'oxygène dissous est requise pour activer la molécule. La valeur de fluorescence (570 UA/g de biomasse) pendant cette période traduit la présence de protéine Gfp déjà mature dans l'extrait cellulaire. Un spectre de fluorescence a été réalisé sur l'extrait confirmant que la seule fluorescence mesurée est la fluorescence de la Gfp. La présence de protéines Gfp matures peut être expliquée par le fait que les levures ont été cultivées en erlenmeyer agité et donc en aérobie permettant ainsi la synthèse et/ou la maturation d'une certaine quantité de protéines détectées en début d'expérience.

Cinq minutes après le début de l'aération, alors que la pression partielle en oxygène dissous (pO<sub>2</sub>) dans le milieu atteint quasiment 100 % de la concentration à saturation à l'air à pression atmosphérique. Une augmentation progressive de la fluorescence spécifique de l'extrait cellulaire est alors observée pouvant correspondre à la maturation d'un pool de protéines qui ne l'étaient pas initialement. L'intensité de fluorescence se stabilise après 55 minutes, des mesures réalisées sur la solution protéique après 3h et 7h sous flux d'air (non représenté sur le graphe précédent pour cause d'échelle). La fluorescence spécifique finale obtenue atteint une valeur de 900 UA/g de biomasse, soit une augmentation de 65% par rapport à la valeur initiale.

Un flux d'azote a également été appliqué pendant plusieurs heures à la suite de l'expérience sous flux d'air et aucune variation notable de l'intensité de fluorescence n'a été constatée dans l'extrait cellulaire. Il n'y a donc pas altération/dégradation de la protéine Gfp lorsque celle-ci est mature et l'oxygène ne joue alors plus aucun rôle sur l'expression de la fluorescence de la protéine mature. Ceci est en adéquation avec les données bibliographiques, qui indiquent que la protéine Gfp est très stable, et que seuls des agents dénaturants et/ou des conditions physico-chimiques drastiques peuvent dénaturer la protéine (Ward & Bokman, 1982).

Des études menées sur des protéines Gfp produites au cours de cultures anaérobies d'une souche de *E. coli* ont montré que les cinétiques d'augmentation de la fluorescence

mesurées sous flux d'air étaient identiques pour l'extrait protéique et pour des cellules entières. Ces cinétiques correspondent à des cinétiques d'ordre 1 dont la constante de temps  $k_1 = 0,24 h^{-1}$  (+/- 0,06) (Heim *et al.*, 1994).

Dans notre étude sur l'extrait cellulaire, la cinétique d'augmentation de la fluorescence semble également correspondre à une cinétique d'ordre 1 avec comme constante de temps  $k_1 = 0,28 \text{ h}^{-1}$  (Figure 32) ce qui est en parfaite adéquation avec les travaux mentionnés cidessus (Heim *et al*, 1994).



Figure 31 : Cinétique d'évolution de la fluorescence dans l'extrait cellulaire.

En comparant ces travaux aux travaux de Heim *et al.*, 1994, en conditions anaérobies, les conditions de cultures aérobies utilisées dans notre étude et la mise en évidence de la stabilité importante de ces protéines au cours du temps et sous différentes conditions d'environnement gazeux suffisent à expliquer que l'on retrouve une valeur de fluorescence relativement élevée en début d'expérience attestant d'une proportion non négligeable de protéines matures en début d'expérience.

Cette étude a été réalisée sur un extrait protéique de Gfp issu de *S. cerevisiae* modifiée et corrobore les résultats mentionnés dans la littérature sur des protéines extraites d'*E. coli*. Les micro-organismes eucaryotes et procaryotes ayant des caractéristiques différentes, il est donc apparu intéressant d'étudier également l'impact de l'oxygène sur cellules eucaryotes entières, contrairement à l'étude de Heim *et al*, 1994, menée sur cellules procaryotes.

#### 1.4.2. Cas de la protéine Gfp intracellulaire

L'étude de l'effet de l'oxygène sur la protéine intracellulaire a été réalisée sur 40 mL d'une culture de *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp. La suspension a été centrifugée, le surnageant éliminé et les cellules remises en suspension dans 40 mL de NaCl (9 g/L). Comme précédemment, la solution est soumise à un flux d'air (0,5 L/min) et l'intensité de fluorescence émise par les cellules est mesurée régulièrement par prélèvements d'échantillons de culture. La fluorescence du surnageant a également été mesurée en début et fin d'expérience, afin de vérifier que la protéine Gfp n'avait pas excrétée dans le milieu par la levure au cours de l'expérience, du fait d'une éventuelle lyse cellulaire. En parallèle, un marquage au bleu de méthylène pour mesurer l'activité des cellules est réalisé en début et en fin d'expérience.

Comme dans le cas précédent, l'intensité de fluorescence est ramenée à la quantité de cellules utilisées pour l'expérience. Les résultats sont présentés sur la figure ci-dessous (Figure 32).



Figure 32 : Evolution de la pO2 (■) et de l'intensité de fluorescence de levures entières exprimant la Gfp au cours du temps (♦) soumise à un flux d'air (0,5 L/min) à pression atmosphérique.

La pression partielle en oxygène dissous du milieu réactionnel atteint rapidement 100 % de la concentration à saturation à l'air à pression atmosphérique, et la dynamique est similaire à celle observée dans l'expérience précédente. Il convient par contre d'ors et déjà de noter que le temps de maturation des protéines intracellulaires est significativement plus long que sur l'extrait protéique. En effet, le temps d'expérience est ici de minimum 25h pour atteindre l'intensité de fluorescence maximale contre moins de 1h dans le cas précédent.

Les intensités de fluorescence initiales et finales mesurées dans les surnageants montrent qu'il n'y a pas eu excrétion de la protéine Gfp dans le milieu extracellulaire. Par ailleurs, les marquages au bleu de méthylène montrent une viabilité de 96,8 % (+/- 0,9 %) en début d'expérience et de 78,0 % (+/- 0,3 %) en fin d'expérience. Les cellules mortes marquées au bleu de méthylène ne présentant plus de fluorescence verte (cf résultats chapitre I paragraphe II-4.3.), et compte tenu de l'absence de fluorescence dans les surnageants, on peut exclure tout phénomène de lyse. La mortalité observée serait donc liée au manque de nutriments dans le milieu réactionnel.

Les valeurs de fluorescences spécifiques obtenues pour la suspension cellulaire (valeurs initiales de 2000 UA/g de biomasse et finales de 3280 UA/g de biomasse) sont trois à quatre fois supérieures à celles obtenues pour l'extrait protéique (valeurs initiales de 570 UA/g de biomasse et finales de 900 UA/g de biomasse), ceci pouvant être dû à une extraction incomplète des protéines Gfp dans l'expérience précédente.

Comme dans l'expérience précédente sur l'extrait cellulaire, une augmentation de l'intensité de fluorescence est observée. Cependant cette augmentation est beaucoup plus tardive, l'augmentation de l'intensité de fluorescence étant observée après 12 h d'aération. La valeur maximale est atteinte après 25 heures d'aération.

La bibliographie indique que le temps de maturation de la protéine Gfp extraite d'*E. coli* ou intracellulaire (Heim *et al*, 1994) est identique. Dans les conditions de cet essai et pour la levure *S. cerevisiae*, le temps de maturation semble différent selon que la protéine soit extraite (quelques minutes) ou intracellulaire (plusieurs heures).

Le milieu utilisé pour la suspension cellulaire n'étant pas un milieu nutritif, aucune activité métabolique n'est supposée avoir lieu au niveau cellulaire. On peut alors supposer que le transport de l'oxygène par diffusion libre au travers de la paroi et de la membrane cytoplasmique devient limitant, limitant ainsi la quantité d'oxygène disponible au niveau intracellulaire pour la maturation de la protéine. Ainsi, divers phénomènes liés à l'organisation cellulaire pourraient intervenir dans le transfert de l'oxygène vers le cytoplasme, augmentant donc le temps de maturation de la protéine malgré des conditions extracellulaires non limitées en oxygène. Le taux de mortalité demeurant faible sur la durée de l'expérience (viabilité de plus de 78 %), l'oxygène diffusant dans la cellule doit être en partie

consommé par la levure pour sa survie (maintenance cellulaire) diminuant ainsi la quantité disponible pour la protéine.

Dans le cas de cellules entières, c'est donc l'accessibilité de l'oxygène liée à son transfert du milieu de culture vers le cytoplasme qui constituerait l'étape limitante pour la maturation de la protéine fluorescente.

1.5. Caractérisation de l'expression de la Gfp par <u>Saccharomyces cerevisiae</u> PJ69-4A pYGfp dans des cultures discontinues

### 1.5.1. Influence de l'oxygène

L'influence de l'oxygène sur la protéine Gfp elle-même et sur les levures exprimant cette protéine a été mise en évidence dans le chapitre résultats (cf paragraphe I-1.1.4.). Il convient néanmoins d'étudier l'impact de la concentration en oxygène dissous dans le milieu sur le niveau global de synthèse et d'expression de la protéine Gfp au cours de cultures cellulaires. Dans cet objectif, des cultures discontinues en réacteur ont été réalisées avec des régulations de la température à 30°C, du pH à 5 et de la pO<sub>2</sub> (voir matériel et méthodes, paragraphe II-2.1). La pression partielle en oxygène dissous qui est régulée à 90% de la concentration de saturation à l'air à pression atmosphérique dans un premier réacteur (expérience 1) et à 1% dans le deuxième (expérience 2), constitue l'unique paramètre qui diffère entre les 2 cultures.

Le milieu de culture utilisé est le milieu minéral adapté à la levure *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp, avec 20 g/L de glucose.

Les évolutions de la biomasse, de la consommation de substrat, de la production de métabolites et de l'intensité de fluorescence brute sont mesurées sur des prélèvements réguliers au cours de ces deux cultures. Les résultats de ces analyses sont présentés sur les graphes suivants, Figure 33 pour la culture réalisée avec une pO<sub>2</sub> régulée à 90 % et Figure 34 pour la culture réalisée avec une pO<sub>2</sub> régulée à 1 %.

La croissance des levures est quantifiée au cours du temps par la mesure de la masse de matière sèche par unité de volume, les concentrations des produits et du substrat (glucose) sont déterminées par HPLC et l'intensité de fluorescence est analysée par lecteur à microplaques. Les données expérimentales sont lissées (traits pleins) grâce au logiciel LIREC et présentées sur les figures ci-dessous (Figure 33 et Figure 34).



**Figure 33 :** Culture de la souche *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp avec une pO<sub>2</sub> régulée à 90%. Evolutions temporelles des concentrations en biomasse (●), en glucose (♦), en éthanol (■) et de l'intensité de fluorescence (▲)



Figure 34 : Culture de la souche *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp avec une pO<sub>2</sub> régulée à 1 %. Evolutions temporelles des concentrations en biomasse (●), en glucose (♦), en éthanol (■) et de l'intensité de fluorescence (▲)

Si les profils d'évolution des deux cultures sont globalement proches avec des rendements de croissance identiques (2 g de biomasse formés pour 20 g de glucose consommé soit un rendement de  $0,1 \text{ g}_X/\text{g}_S$ ), quelques différences apparaissent néanmoins. Notamment, il apparaît que le temps nécessaire pour atteindre l'épuisement du substrat est d'environ 16 h pour la souche cultivée à une pO<sub>2</sub> régulée à 1 %, et de 20 h si la pO<sub>2</sub> est régulée à 90 %.

Le rendement spécifique en éthanol est légèrement supérieur lors de la culture réalisée avec une pO<sub>2</sub> régulée à 1% et est de 0,4 g d'éthanol formé par g de glucose consommé contre 0,33 g d'éthanol produit par g de glucose consommé pour la culture réalisé avec une pO<sub>2</sub> régulée à 90 %. Les taux de croissance maximaux sont proches, respectivement de 0,31 et 0,27 h<sup>-1</sup> pour la souche cultivée à une pO<sub>2</sub> régulée à 90 % et la souche cultivée à 1 %.

Néanmoins, on remarque une nette différence de l'intensité de fluorescence émise dans les deux cultures. Les levures cultivées dans des conditions d'aération limitante (1 %) sont difficilement observables au microscope à épifluorescence mais néanmoins certaines peuvent être distinguées. Ce résultat semble indiquer que dans un biofilm épais, les levures pourraient être un bon indicateur d'un niveau de limitation plus ou moins important en oxygène selon la profondeur.

Les intensités de fluorescence supérieures en milieu complètement aéré peuvent être liées à une production ou à une activation plus importante de Gfp en métabolisme aérobie.

Pour préciser ces hypothèses, les expériences précédentes ont été prolongées dans le temps, en augmentant la pO<sub>2</sub> de la culture régulée à 1 % à une valeur de 50 % pour être dans des conditions d'aération non-limitantes quand les cellules ont atteint la phase stationnaire. Sur la culture régulée à une pO<sub>2</sub> de 90 %, aucun paramètre de régulation n'est modifié.



Figure 35 : Culture de la souche *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp avec une pO<sub>2</sub> régulée à 1 % puis augmentée à 50 % à 25h de culture (flèche noire). Evolutions temporelles des concentrations en biomasse (●), en glucose (◆), en éthanol (■) et de l'intensité de fluorescence (▲)

Lorsque la culture initialement conduite en limitation d'oxygène ( $pO_2 = 1$  %) est poursuivie en condition non limitante ( $pO_2 = a$  50 %), on observe une augmentation de l'intensité de fluorescence mais non instantanée. Une phase de retard d'environ 7h est nécessaire avant que l'intensité de fluorescence augmente. Dans le même temps et du fait de la limitation en substrat, il n'y a pas de croissance cellulaire. La concentration en biomasse reste quasiment constante (Figure 35) alors que l'intensité de fluorescence augmente d'un facteur environ 2,5 fois passant d'une valeur d'environ 75 UA à une valeur d'environ 170 UA entre le temps de 32 h et celui de 45 h. Ces résultats sont en adéquation avec les résultats issus des expériences préliminaires sur cellules entières non proliférantes (cf paragraphe I.1 Figure 30). L'hypothèse de l'activation de la protéine plutôt qu'une production accrue semble donc la plus appropriée, et rejoindrait également les observations faites par Heim *et al.*, 1994.

Sur la culture régulée à 90% de pression partielle en oxygène dissous, une augmentation de la fluorescence a également été observée (Figure 36).

L'augmentation de l'intensité de fluorescence est couplée à la consommation d'éthanol, seul substrat disponible pour les cellules. Dans le même temps, la concentration en biomasse reste constante, suggérant que la consommation de substrat carboné conduit à la synthèse de nouvelles protéines, et pas seulement à une activation du pool existant.

Ces résultats semblent indiquer que la synthèse des protéines Gfp suit des voies purement cataboliques découplées des voies de synthèse de biomasse. La souche a été construite en utilisant le promoteur fort ADH1 devant la séquence codant pour la synthèse de la protéine Gfp. Ce promoteur contrôle l'expression de l'alcool déshydrogénase et permet donc une expression forte du gène placé en aval en présence de glucose. Chez *S. cerevisiae* parmi les quatre gènes codant pour des isoenzymes de l'alcool déshydrogénase, les rôles des gènes ADH1 et ADH2 ont pu être déterminés : ADH1 sert d'inducteur à ce gène et code pour une isoenzyme catalysant la réaction acétaldéhyde  $\rightarrow$  éthanol au cours de fermentations sur glucose (Denis *et al.*, 1982). Pendant la croissance, l'enzyme ADH1 est présente en quantité importante dans la cellule. Il semble donc normal de trouver, en culture aérobie ou anaérobie, une production de protéine Gfp (et donc une augmentation de l'intensité de fluorescence) couplée à la phase de croissance. Le niveau de fluorescence atteint est, lui, fonction de la quantité d'oxygène dissous disponible. Lorsque la concentration en glucose devient limitante, la répression des autres isoenzymes de l'alcool déshydrogenase est levée et l'éthanol peut être utilisé par la levure comme nouvelle source de carbone via la respiration oxydative et la

gluconéogenèse (culture diauxique). Dans cette configuration, l'enzyme ADH2 réprimé jusqu'alors par le glucose est synthétisée et devient fonctionnelle pour la réaction inverse de conversion de l'éthanol en acétaldéhyde (Lutstorf & Megnet, 1968, cité par Denis *et al.*, 1983).

Nos expériences montrent alors que sur éthanol, peu ou pas de biomasse est synthétisée, mais l'intensité de fluorescence de la Gfp augmente, suggérant une nouvelle synthèse de protéines, ce qui pourrait indiquer une spécificité relative du promoteur ADH1 ou sa fonctionnalité sur substrat éthanol aussi bien que sur substrat glucose.



Figure 36 : Culture de la souche *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp avec une pO<sub>2</sub> régulée à 90 %. Evolutions temporelles des concentrations en éthanol (■) et de l'intensité de fluorescence (▲), et évolution temporelle du débit d'aération (●), et de l'agitation (●),

Afin de prendre en compte l'évolution de l'activité des levures au cours de la culture liée aux modifications de l'environnement biochimique, les intensités de fluorescence brutes mesurées ci-dessus ont été ramenées à la concentration en biomasse. Les évolutions des intensités de fluorescence spécifique pour les deux cultures sont présentées sur le même graphe pendant les trente premières heures de culture pour une meilleure comparaison (Figure 37).



Figure 37 : Evolution temporelle de la fluorescence spécifique *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp cultivée avec une pO<sub>2</sub> régulée à 90 % (▲) et avec une pO<sub>2</sub> régulée à 1 % puis 50 % à 25 h (▲).

L'intensité de fluorescence spécifique apparaît 2,5 fois plus élevée pour la culture réalisée à une pO<sub>2</sub> régulée à 90 % que pour celle régulée à 1 %. Le facteur d'augmentation dû à la pO<sub>2</sub> obtenu lors de l'étude de l'influence de la pO<sub>2</sub> sur des levures en suspension dans du liquide physiologique (donc sans croissance), en soumettant des levures à une pO<sub>2</sub> de 100 % avait été de 1,5 (voir paragraphe I. 1.1.4) sachant que dans cette expérience, néanmoins, l'aération pendant la culture préalable n'avait pas été limitante, ce qui explique que le facteur est plus faible que le facteur obtenu entre nos cultures réalisées à une pO<sub>2</sub> de 1 % et une pO<sub>2</sub> de 90 %.

Néanmoins, la fluorescence spécifique finale atteinte dans le réacteur dont la  $pO_2$  régulée à 1 % puis augmentée à 50 % donne une valeur d'environ 90 UA/g de biomasse, ce qui traduit une activation de la protéine à un niveau quasi-équivalent à celui atteint dans l'expérience 1 (environ 90 % de la valeur), lorsque la  $pO_2$  est régulée à 90 %.

Ces résultats témoignent de l'influence importante des conditions en oxygène sur la fluorescence des levures. Pour étudier l'influence d'autres paramètres comme la concentration en glucose, d'autres expériences ont été réalisées, à des  $pO_2$  régulées à 1 % ou 90 %, avec des concentrations en glucose variables.

#### 1.5.2. Influence de la concentration en glucose

Dans cet objectif, des cultures discontinues en réacteur ont été réalisées avec des régulations de la température à 30°C, du pH à 5 et de la  $pO_2$  (voir matériel et méthodes, paragraphe II-2.1). La pression partielle en oxygène dissous qui est régulée à 90 % de la concentration de saturation à l'air à pression atmosphérique dans certaines expériences et à 1 % dans d'autres expériences.

Le milieu de culture utilisé est le milieu minéral adapté à la levure *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp, avec des concentrations en glucose variant de 16 g/L à 50 g/L.

Les expériences 3, 5 et 6, sont réalisées dans des conditions proches de celles utilisées pour l'expérience 1 et 2, afin de vérifier la répétabilité des résultats obtenus. Les expériences 4 et 7 sont réalisées à des concentrations en glucose de 50 g/L, pour étudier l'influence de la concentration en sucre sur l'intensité de fluorescence. Pour s'affranchir de l'effet biomasse et pouvoir comparer ces expériences entre elles, l'intensité de fluorescence est ramenée à la biomasse, afin d'obtenir une fluorescence spécifique.

Le tableau ci-dessous donne les conditions expérimentales (concentration glucose et  $pO_2$ ) ainsi que les fluorescences spécifiques atteintes en phase stationnaire pour les différentes expériences. Les expériences 1 et 2 présentées ci-dessus sont rappelées également (Tableau 11).

Expérience	[glucose] g/L	pO2 %	Fluorescence spécifique
			max ou phase stat
			$(UA/(g.L^{-1}))$
Exp 1	20	90 %	100 (+/- 5)
Exp 2	20	1 %	40 (+/- 5)
Exp 2 suite	20	1% puis 90 %	40 (+/- 5) puis 90
Exp 3	21	1 %	45 (+/- 5)
Exp 4	50	1%	85 (+/- 5)
Exp 5	16,5	90 %	93 (+/- 7)
Exp 6	20	90 %	95 (+/- 5)
Exp 7	50	90 %	120 (+/- 10)

Tableau 11 : Activité spécifique de fluorescence des levures à la fin de l'expérience

Les expériences 3 et 6, réalisées dans des conditions proches de celles utilisées respectivement pour les expériences 1 et 2 montrent que les résultats obtenus sont répétables, il n'y a pas de différences significatives dans les valeurs de fluorescence spécifique obtenues.

L'expérience 5, réalisée avec une concentration en glucose de 16,5 g/L, montre une fluorescence spécifique similaire à celle obtenue dans l'expérience 1, menée avec une concentration en glucose initiale de 20 g/L.

Par contre, pour les expériences 4 et 7, réalisées respectivement à des  $pO_2$  régulées à 1% ou 90 %, mais avec 50 g/L de glucose initial, les résultats obtenus pour la fluorescence spécifique montrent des valeurs plus élevées de fluorescence :

- la fluorescence spécifique a doublé entre les expériences 2 et 4, réalisées à des  $pO_2$  régulées à 1%, mais avec respectivement 20 et 50 g/l de glucose initial.

- la fluorescence spécifique est 1,2 fois plus élevée dans l'expérience 7 que pour l'expérience 1, réalisées à des  $pO_2$  régulées à 90%, mais avec respectivement 20 et 50 g/l de glucose initial.

Ces résultats montrent que l'oxygène n'est pas l'unique paramètre influençant la fluorescence des levures, mais que le glucose peut également avoir une influence non négligeable, notamment dans la culture réalisée à une pO<sub>2</sub> régulée à 1%, pour laquelle la fluorescence spécifique obtenue atteint 85 % de la valeur obtenue pour la culture réalisée à une pO<sub>2</sub> régulées à 90% mais avec seulement 20 g/L de glucose.

Ceci est extrêmement intéressant, car ceci implique que pour des procédés reposant sur des cultures de levures agrégées pour laquelle la  $pO_2$  doit être maintenue faible, la fluorescence des levures pourrait être amplifiée en augmentant la concentration en sucre.

# 2. Escherichia coli autofluorescentes

#### 2.1. Construction des souches procaryotes Escherichia coli autofluorescentes

Des souches d'*E. coli* compétentes ont été préparées selon la méthode SEM (cf paragraphe I-2 du matériel et méthodes). Cette méthode repose sur l'utilisation de cellules dites chimio-compétentes dont la membrane cellulaire a été fragilisée et perméabilisée afin de pouvoir faire pénétrer une ou plusieurs copies d'un plasmide dans les cellules sous l'effet d'un choc thermique. De nombreuses méthodes existent pour la transformation d'*E. coli* (Hanahan *et al.*, 1985). Parmi ces méthodes, la technique SEM pour « Simple and Efficient

Method » est couramment utilisée et bien maîtrisée au laboratoire. Sa mise en œuvre ne nécessite pas d'équipement ni de produits très particuliers et son efficacité de transformation est élevée (1 à 3 x  $10^9$  cfu/µg d'ADN plasmidique (Inoue *et al*, 1990).

Les plasmides utilisés ont été choisis par rapport à des propriétés d'induction bien précises, à savoir :

- ils portent une séquence codant pour une protéine fluorescente choisie en fonction de la longueur d'onde d'émission souhaitée (cyan, jaune ou rouge). L'expression de ces protéines est sous contrôle du promoteur *lac*, qui peut être induit par la présence de lactose ou d'IPTG, un analogue structural du lactose non métabolisé par la cellule, et inhibé par la présence de glucose dans le milieu de culture.

- ils portent une séquence codant pour un facteur de résistance à un antibiotique (l'ampicilline). Les cellules qui intègrent ce plasmide suite au choc thermique acquièrent alors une résistance à cet antibiotique et donc la capacité de se développer sur un milieu dans lequel il a été ajouté. Les cellules ayant incorporé le plasmide, dites souches recombinantes, seront par la suite toujours cultivées en présence de l'antibiotique pour s'assurer de la persistance à un même facteur de sélection qui est l'ampicilline, des cultures mixtes avec les différentes souches recombinantes peuvent-être réalisées sur un seul et même milieu.

Un exemple de l'organisation des gènes portés par l'un des plasmides utilisé est donné sur la figure suivante (Figure 38).



Figure 38 : Carte du plasmide pDsRed-express, portant le gène codant pour la protéine fluorescente DsRedexpress (Clontech)

# 2.2. Cinétique de croissance de la souche <u>Escherichia coli</u> sauvage et de son recombinant

La cinétique de croissance de la souche *E. coli* BL21 (DE3) star a été comparée à la cinétique de croissance d'un de ses mutants exprimant la protéine fluorescente rouge DsRedexpress (en présence de lactose).

Les cultures sont menées en parallèle en mode discontinu dans des fermenteurs en verre protégés de la lumière et contenant 4 L de milieu minéral (cf matériel et méthodes paragraphe II-1.2. et II-2.2). Le lactose constitue la source de carbone et l'ampicilline, facteur de sélection, est ajouté dans le réacteur contenant la souche recombinante.

La croissance des bactéries est quantifiée au cours du temps par la mesure des masses sèches et les concentrations des produits et du substrat (lactose) sont mesurées par HPLC. Les données expérimentales sont lissées (traits pleins et pointillés) grâce au logiciel LIREC et sont représentées sur la figure ci-dessous (Figure 39).



Figure 39 : Courbes de croissance de la souche *E. coli* BL21 (DE3) star (▲) et de son recombinant *E. coli* BL21 (DE3) star pDsRed-express (♦) et de consommation du lactose par la souche sauvage (●) et la souche recombinante (■).

Pour la souche sauvage et la souche modifiée le temps nécessaire pour la consommation respective de 10,96 et 10,72 g/L de lactose est de 6 heures, la biomasse formée (masse sèche) correspondante est de 2,97 g/L et 2,87 g/L.

Dans les conditions expérimentales de ces essais, les taux de croissance maximaux de la souche sauvage et de son mutant exprimant la protéine fluorescente sont similaires et atteignent  $0,45 \pm 0,05$  h<sup>-1</sup>.

Un co-produit apparaît également pour la souche sauvage et la souche modifiée, il s'agit du pyruvate, dont la cinétique de production est présentée sur la figure ci-dessous (Figure 40). Les données expérimentales sont lissées (traits pleins et pointillés) grâce au logiciel LIREC et sont représentées sur la figure ci-dessous (Figure 40).



Figure 40 : Courbes de croissance de la souche *E. coli* BL21 (DE3) star (▲) et de son recombinant *E. coli* BL21 (DE3) star pDsRed-express (♦) et de production de pyruvate par la souche sauvage (●) et la souche recombinante (■).

La cinétique de production du pyruvate est couplée à la cinétique de croissance. La production pour la souche sauvage atteint 6,03 g/L et pour la souche modifiée 5,88 g/L, correspondant à un rendement  $Y_{P/S}$  de 0,55 g de pyruvate produit par g de lactose consommé dans les deux cas.

Les rendements  $Y_{X/S}$  peuvent être calculés pour les deux souches à partir des vitesses de production de biomasse  $r_x$  et de consommation du substrat  $r_s$  en traçant la courbe  $r_x = f(r_s)$ , présentée sur la figure ci-dessous (Figure 41).



Figure 41 : Courbes représentant la vitesse de production de biomasse  $r_x$  en fonction de la vitesse de consommation du substrat  $r_s$  pour la souche modifiée ( $\blacksquare$ ) et la souche sauvage ( $\bullet$ ).

La pente de la courbe correspond au rendement  $Y_{X/S}$  pour chaque souche, et apparaît très proche dans les deux cas, respectivement de 0,21 g et 0,20 g de biomasse produite par gramme de lactose consommé. Ce résultat est tout à fait cohérent avec la littérature où le rendement de production de biomasse sur lactose pour *E. coli* a été trouvé à 0,22 g<sub>X</sub>/g<sub>S</sub> (Wong & Liao, 2009).

Les taux de croissance  $(0,45 \text{ h}^{-1})$  et les rendements restent très proches pour *E. coli* BL21 (DE3) sauvage et son recombinant. La transformation n'a donc pas modifié de façon significative les comportements cinétiques et métaboliques de la souche ayant intégré le plasmide par rapport à la souche sauvage.

Afin de vérifier que les trois souches modifiées exprimant les protéines fluorescentes cyan (AmCyan), jaune (ZsYellow) ou rouge (DsRed-express) ont le même comportement cinétique, différentes cultures ont été réalisées en parallèle sur milieu riche avec ampicilline, en Erlenmeyer de 1 L, avec 100 mL de volume utile. La souche sauvage a également été cultivée dans les mêmes conditions, le milieu n'ayant pas été complété avec de l'ampicilline. La biomasse a été évaluée par lecture de l'absorbance à 600 nm, plutôt que par détermination de la masse sèche qui nécessite un volume de culture plus important pour l'analyse. Les données expérimentales sont représentées sur la figure ci-dessous (Figure 42). Afin de s'affranchir des différences de biomasse initiales, on trace le graphe Ln(X/Xo) en fonction du

temps avec X la biomasse à l'instant t et Xo la biomasse initiale. Cette représentation permet de comparer les taux de croissance moyen des souches.



Figure 42 : Logarithme népérien de X/Xo pour la souche sauvage *E. coli* BL21 (DE3) star (▲) et pour ses recombinants *E. coli* BL21 (DE3) star pDsRed-express (♦), *E. coli* BL21 (DE3) star pAmCyan (●) et *E. coli* BL21 (DE3) star pZsYellow (■).

Toutes les souches recombinantes montrent des profils de croissance relativement semblables à celle de la souche sauvage. Les cinétiques de croissance sont similaires et les taux de croissance maximum ont été calculés à 1 h<sup>-1</sup> (+/-0,1) pour chacune des souches, démontrant ainsi que l'insertion des différents plasmides ne modifie pas le comportement dynamique par rapport à la souche sauvage. Ces souches recombinantes pourront donc être utilisées en remplacement de la souche sauvage.

# 2.3. Caractérisation de l'expression de la protéine DsRed-express par Escherichia coli pDsRed-express dans des cultures discontinues

Dans la construction réalisée pour obtenir une bactérie auto fluorescente, l'expression de la protéine fluorescente par *E. coli* BL21 DE3 star pDsRed-express est sous contrôle du promoteur lactose. L'étude bibliographique a montré que différents éléments pouvaient induire ou réprimer son expression. Ainsi, le lactose ou une molécule analogue (IPTG) induisent son expression tandis que le glucose l'inhibe.

Le glucose étant la source de carbone utilisée pour la culture de *S. cerevisiae* Gfp, dans l'objectif de réaliser une co-culture levure-bactérie, il est donc apparu important d'étudier

l'impact de leurs substrats respectifs, glucose et lactose, sur l'expression de la protéine DsRed-express et de quantifier l'intensité de fluorescence émise par *E. coli*.

Dans ce but des cultures discontinues en réacteurs ont été réalisées avec des régulations de la température à 37°C, du pH à 7. La  $pO_2$  est contrôlée entre 20 % et 100 % de la concentration de saturation à l'air, afin de ne pas être en limitation en oxygène. La nature de la source de carbone est l'unique paramètre qui diffère d'une fermentation à l'autre. Le milieu de culture minéral adapté à la bactérie *E. coli* est utilisé avec 20 g/L de glucose dans un cas et 20 g/L de lactose dans l'autre cas.

Les évolutions temporelles de la biomasse, des concentrations du substrat et des métabolites ainsi que de l'intensité de fluorescence brute sont analysées par des prélèvements réguliers au cours des deux fermentations. Les résultats sont présentés sur les graphes cidessous correspondant aux cultures réalisées avec comme substrat le glucose (Figure 43) et le lactose (Figure 44). La croissance des bactéries au cours du temps est quantifiée par la mesure de la masse de matière sèche par unité de volume, les concentrations des produits et du substrat sont mesurées par HPLC et l'intensité de fluorescence est déterminée par lecture de la fluorescence dans un lecteur à microplaques. Les données expérimentales sont lissées (traits pleins) grâce au logiciel LIREC et présentées sur les figures ci-dessous.



Figure 43 : Culture sur glucose d'*E. coli* BL21 DE3 star pDsRed-express : Evolution temporelle des concentrations en biomasse, (●), en glucose (◆) et de l'intensité de fluorescence (▲).



Figure 44 : Culture sur lactose d'*E. coli* BL21 DE3 star pDsRed-express : Evolution temporelle des concentrations en biomasse (●), en lactose (♦) et de l'intensité de fluorescence (▲).

Pour la souche cultivée sur glucose le temps nécessaire pour consommer la totalité du substrat (26,2 g/L) est d'environ 15 heures. La biomasse finale est alors de 6,2 g/L. Pour la souche cultivée sur lactose le temps nécessaire pour épuiser le substrat (25 g/L) est d'environ 10 heures, la biomasse finale est alors de 5,2 g/L. Cette différence peut résulter en partie de l'existence d'une courte phase de latence pour la souche cultivée sur glucose, certainement dû à une aération trop importante au début de la culture, alors qu'il n'y a pas eu de phase de latence pour la culture sur lactose.

Indépendamment de cette phase de latence, les profils sont globalement similaires et les rendements de croissance par rapport à la source de carbone restent proches, respectivement de 0,22 et 0,20 grammes de masse sèche par gramme de substrat pour les cultures sur glucose et sur lactose.

Dans les conditions expérimentales de ces essais, les taux de croissance maximaux des bactéries sont de 0,3 h<sup>-1</sup> (+/-0,05) pour les deux conditions de culture.

La principale différence entre ces deux cultures concerne l'intensité de fluorescence émise par les bactéries. En effet, lors d'une culture sur glucose, la fluorescence est très faible et à peine détectable en microcopie à épifluorescence. En revanche, elle est six fois supérieure lorsque la souche est cultivée sur lactose. Ce résultat confirme les rôles inhibiteur ou inducteur de ces composés qui n'affectent cependant que la production de la protéine et ne modifient pas la croissance de la bactérie.

Il ressort de ces essais que le milieu qui devra être utilisé pour une co-culture de la levure et de la bactérie ne devra pas comporter le glucose comme seule source de carbone, mais devra également contenir du lactose afin d'induire la fluorescence de la bactérie.

Une culture d'*E. coli* BL21 DE3 star pDsRed-express a donc été réalisée sur un milieu contenant un mélange en quantités égales de glucose et de lactose en tant que sources de carbone, afin de caractériser l'induction de la fluorescence dans ces conditions.

Les évolutions temporelles de la biomasse et des substrats, ainsi que de l'intensité de fluorescence brute sont présentées sur les graphes ci-dessous (Figure 45). Les données expérimentales sont lissées (traits pleins) grâce au logiciel LIREC.



Figure 45 : Culture d'*E. coli* BL21 DE3 star pDsRed-express sur un mélange lactose/glucose : concentrations en biomasse (●), en glucose (♦), en lactose (♦), et intensité de fluorescence (▲).

Les concentrations initiales en glucose et lactose sont respectivement de 16,1 g/L (soit 0,537 Cmoles/L) et 17,9 g/L (soit 0,628 Cmoles/L). Les résultats obtenus montrent une coassimilation des deux substrats avec des profils dynamiques similaires. L'épuisement des deux substrats est rapide (7 heures). La concentration en biomasse formée est de 10,6 g/L (0,417 Cmole/L) soit un rendement Yx/s = 0,358 Cmole<sub>X</sub>/Cmole<sub>S</sub>, calculé sur l'ensemble du substrat carboné disponible.

La consommation simultanée des deux sources de carbone est particulièrement intéressante ; en effet, si la souche avait consommé d'abord le glucose puis ensuite le lactose, deux sous-populations présentant des expressions de fluorescence différentes selon la source de carbone consommée pour leur croissance auraient pu être observées. Dans le cas présent, les deux substrats étant indifféremment et simultanément consommés, la fluorescence de l'ensemble des bactéries apparaît homogène et tout à fait satisfaisante lors de l'observation au microscope à épifluorescence.

Afin de pouvoir comparer l'expression de fluorescence obtenue au cours de la culture menée avec substrat mixte avec celles obtenues sur glucose ou lactose, les intensités spécifiques de fluorescence (ramenées à la quantité de biomasse produite au cours de chaque expérience) ont été calculées. Les dynamiques de consommation du substrat étant différentes, les résultats sont présentés en fonction de la quantité de substrat consommé exprimée en équivalents de carbone (Cmoles/L) c'est-à-dire en fonction de l'avancement de la réaction (Figure 46).



**Figure 46 :** Evolution de la fluorescence spécifique *E. coli* BL21 DE3 star pDsRed-express cultivée sur glucose (**a**), sur lactose (**a**) ou sur un mélange glucose-lactose (**b**) en fonction de la consommation du ou des substrats.

La figure précédente (Figure 46) montre que quelle que soit la quantité de glucose consommé, l'intensité spécifique de fluorescence est constante et relativement faible (100 UA/ (g biomasse.L<sup>-1</sup>)). Sur lactose, et conformément à ce qui était attendu, l'intensité spécifique de fluorescence est la plus importante, le promoteur étant activé par le lactose. L'intensité spécifique augmente fortement dès que le lactose est consommé, puis sa valeur se stabilise à 710 +/- 10 UA/ (g biomasse.L<sup>-1</sup>). La synthèse de protéines semble alors couplée à la phase de croissance, puis découplée dans un deuxième temps lorsque les cellules sont en phase stationnaire. Sur substrats mixtes, on trouve des valeurs d'intensité spécifique de fluorescence intermédiaires (350 +/- 10 UA/ (g biomasse. L<sup>-1</sup>)). La présence du glucose inhibe

la dynamique de production de protéines et vraisemblablement le rendement de synthèse luimême.

Par ailleurs, des cultures en tubes ont été réalisées et ont confirmé que la levure *S. cerevisiae* PJ69-4A n'était pas capable de consommer le lactose. Au vu de ces résultats, le milieu de culture qui sera retenu pour développer des biofilms mixtes levures/bactéries sera donc basé sur le milieu minéral de *S. cerevisiae*, complété par du lactose.

#### 3. Conclusion et perspectives

Les souches de *S. cerevisiae* et *E. coli* modifiées ont des comportements cinétiques et des métabolismes similaires à leurs homologues sauvages, et apparaissent comme de bons substituts d'étude des souches sauvages, présentant en outre l'avantage de pouvoir être visualisées *in vivo* et parfois *in situ* de par les constructions réalisées.

Au-delà des souches de E. coli et de S. cerevisiae recombinantes construites pour être utilisées comme substituts des souches sauvages pour analyser les caractéristiques d'agrégats cellulaires, des modifications génétiques identiques avaient été envisagées sur d'autres microorganismes d'intérêt. Cependant, différentes contraintes techniques et temporelles ont notamment été rencontrées dans cette étude pour la transformation de souches de Nitrosomonas europeae, bactérie nitrifiante majoritairement rencontrées dans les étapes de nitrification lors de traitement d'eaux usées. Le temps de croissance très faible s'est avéré fortement rédhibitoire pour l'obtention de souches compétentes. Par ailleurs la construction de souches du genre Pseudomonas (Pseudomonas fluorescens) et du genre Bacillus (Bacillus cereus) ont également été envisagées, mais les protocoles de transformations se sont avérés longs et difficiles à mettre en place ; dans le cas du genre Bacillus, cette bactérie Gram positif, possédant une paroi épaisse, elle nécessite un protocole d'électroporation pour l'étape d'insertion du plasmide ; la souche utilisée a de plus présenté une résistance naturelle à l'antibiotique adapté au plasmide à insérer, rendant difficile la sélection des souches recombinantes. Le protocole utilisé pour la transformation de *Pseudomonas* était un protocole dit « par conjugaison », qui nécessite la mise en œuvre de deux autres souches de E. coli, l'une apportant le plasmide à transmettre et l'autre censée aider à la transmission du plasmide grâce à un système de pilis. Ce protocole, lourd à mettre en place du fait du nombre de boîtes nécessaire pour le screening des colonies, n'a pas abouti.

Aussi, les micro-organismes autofluorescents nous paraissent être des outils pertinents pour des études dynamiques *in vivo* et dans certains cas in *situ* de structures microbiennes complexes sous contraintes environnementales. Néanmoins, il convient de préciser que la conception et la construction de ces micro-organismes sont souvent difficiles car les souches compétentes ou les plasmides souhaités ne sont pas commercialisés, certaines n'ont d'ailleurs jamais été transformées, et les protocoles de transformation sont à développer, ce qui peut nécessiter un temps relativement long. Ces contraintes temporelles dans le cadre de ce projet de thèse ont été les plus fortes nous contraignant à nous focaliser sur 2 genres microbiens différents (procaryote et eucaryote) : *E. coli* et *S. cerevisiae*.

Les résultats obtenus lors des cultures de ces deux souches recombinantes nous ont permis de préciser les conditions expérimentales (milieu, aération) pour obtenir une expression satisfaisante de fluorescence lors de la mise en œuvre de cultures mixtes. La levure *S. cerevisiae* PJ69-4A n'étant pas capable de consommer le lactose, le milieu de culture qui sera retenu pour développer des biofilms mixtes levures/bactéries sera donc basé sur le milieu minéral de *S. cerevisiae*, complété par du lactose.

Sur la base des résultats obtenus concernant l'effet de la teneur en oxygène dissous et de la concentration en substrat sur l'expression de la fluorescence (cf paragraphe I-1.5.), les études de caractérisation de biofilms mixtes contenant des levures seront réalisées dans des conditions non limitantes en oxygène (Chapitre III des résultats). Les expériences seront menées en mode continu et le glucose sera choisi comme facteur limitant pour la croissance. Pour cela le glucose sera fourni en entrée à débit infèrieur aux capacités maximales d'assimilation de la souche, et la concentration en glucose résiduel dans le réacteur devrait être quasiment nulle.

#### **II** - Observations microscopiques des micro-organismes fluorescents construits

L'étude bibliographique des caractéristiques d'excitation et d'émission des protéines fluorescentes (cf étude bibliographique II.1.) couplée aux contraintes techniques des microscopes disponibles nous ont amené à choisir quatre protéines fluorescentes différentes. Sachant qu'un plasmide de levure répondant à nos critères pour une expression importante de la protéine Gfp chez *S. cerevisiae* était disponible au laboratoire (le gène codant pour la protéine Gfp est présent et sous le contrôle d'un promoteur inductible et permettant une expression forte), les autres protéines ont été choisies de façon à exprimer des couleurs différentes pouvant permettre la séparation de deux à trois micro-organismes cultivés ensemble sans qu'il n'y ait d'interférence entre elles.

Les spectres d'excitation et d'émission des protéines retenues dans cette étude sont présentés suivante (Figure 47).



Figure 47 : Spectres d'excitation (à gauche) et d'émission (à droite) des protéines AmCyan, YEGfp, ZsYellow et DsRed-express.

En comparant ces spectres et leurs recouvrements partiels, aussi bien en excitation qu'en émission, on peut facilement comprendre les difficultés qui peuvent être rencontrées quant à la séparation des signaux émis par les protéines et, en conséquence, la difficulté pouvant apparaître dans la distinction des micro-organismes contenant ces protéines.

La séparation des différents signaux nécessite une intervention fine du manipulateur lors des réglages des microscopes à l'acquisition. Mais les caractéristiques techniques des appareils ne permettent pas toujours d'éviter un recouvrement des spectres. Comme indiqué dans la bibliographie, Andersen *et al*, 2006 ont réussi à séparer des protéines du type AmCyan, ZsYellow et DsRed-express, sans pouvoir toutefois séparer les protéines du type Gfp et ZsYellow.

Le tableau ci-dessous (Tableau 12) reprend les caractéristiques des souches construites ainsi que les longueurs d'ondes maximales d'excitation et d'émission correspondant aux protéines fluorescentes choisies. Les plasmides de *E. coli* ont été choisis suite à une étude bibliographique car ils permettent un contrôle aisé de l'expression des protéines fluorescentes, grâce notamment à l'existence de molécules inductrices (lactose ou un analogue structural tel que l'IPTG).

Souches	Protéine	Longueur d'onde	Longueur d'onde
	fluorescente	maximale	maximale d'émission
	associée	d'excitation (nm)	(nm)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	AmCyan	453	486
star	(cyan)		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	ZsYellow	531	540
star	(jaune)		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	DsRed-express	557	579
star	(rouge)		
S. cerevisiae PJ69-4A	Gfp	488	510
	(verte)		

Tableau 12 : Souches transformées et longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission des différentes protéines exprimées par les plasmides insérés.

La possibilité de mettre en évidence séparément différents fluorochromes dépend à la fois de leurs caractéristiques spectrales respectives, aussi bien en excitation qu'en émission (largeur des spectres, maxima, ...), mais également des potentialités de l'appareil utilisé pour les visualiser : type de lumière d'excitation, puissance et précision de la lumière d'excitation, caractéristiques des filtres d'excitation et des filtres d'émission disponibles...

La capacité à séparer de façon satisfaisante des micro-organismes exprimant ces protéines a été étudiée en microscopie à épifluorescence (2D) et en microscopie confocale (2D/3D).

# 1. Etude de systèmes modèles complexes en microscopie à épifluorescence 2D

Le microscope à épifluorescence utilisé dans cette étude est équipé de filtres destinés plus particulièrement à l'observation de composés émettant dans le vert et dans le rouge. Il sera donc particulièrement adapté à la détection des protéines dites « verte » et « rouge », comme les protéines Gfp et DsRed-express.

Le bloc optique FITC (cf matériel et méthode VI-1.) permet une excitation à une longueur d'onde de 480 +/- 40 nm. Il est donc particulièrement adapté à l'excitation de la protéine Gfp choisie. Néanmoins en cas de culture mixte et en vue d'une quantification rigoureuse des ratios de populations des souches *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp et *E. coli* BL21 (DE3) star pAmCyan ou pZsYellow, des interférences sur les spectres d'excitation et d'émission sont à évaluer. De même, le bloc filtre optique Cy3 du microscope à épifluorescence permet une excitation à une longueur d'onde de 545 +/- 30 nm et est particulièrement adapté à l'excitation de la protéine DsRed-express choisie ou de colorant fluorescent tel l'IP. Néanmoins en cas de culture de souche exprimant la protéine ZsYellow, des interférences sont également à évaluer.

Ces paramètres opératoires sont résumés dans le tableau ci-dessous (Tableau 13).

<u>**Tableau 13 :**</u> Blocs-filtres disponibles et gammes de longueurs d'ondes d'excitation et d'émission correspondantes.

Bloc-filtre	Filtre d'excitation	Filtre d'émission
FITC	480 (+/- 40) nm	505 (+/- 30) nm
Cy3	545 (+/- 30) nm	610 (+/- 75) nm

Lorsqu'on superpose les bandes des filtres d'excitation et d'émission des filtres FITC (hachuré en vert) et Cy3 (hachuré en rouge) aux spectres d'excitation et d'émission des protéines fluorescentes, on obtient la figure ci-dessous (Figure 48) :





Quatre cultures pures ont été réalisées en fiole d'erlenmeyer pour les quatre souches présentées dans le tableau 12, dans des conditions permettant l'expression des protéines fluorescentes. Des observations ont été réalisées sur des cultures pures ou en mélange et les résultats obtenus avec les bloc-filtres FITC et Cy3 sont présentés ci-dessous.

#### 1.1. Bloc-filtre FITC

La superposition des filtres d'excitation et d'émission FITC sur les spectres d'excitation et d'émission des quatre protéines fluorescentes AmCyan, ZsYellow, Gfp et DsRed-express, montre que les longueurs d'onde d'excitation sélectionnées par le bloc filtre FITC peuvent exciter les quatre protéines à la fois, en étant néanmoins plus adapté à l'excitation de la protéine Gfp (recouvrement du spectre plus important). Si le deuxième filtre à l'émission n'existait pas, on peut alors supposer que les micro-organismes exprimant les quatre protéines pourraient être visualisés.

Or, à l'émission, le bloc-filtre FITC sélectionne des longueurs d'onde entre 475 et 535 nm, ce qui permet de visualiser seulement les micro-organismes exprimant les protéines AmCyan, Gfp et ZsYellow. Néanmoins, les protéines AmCyan et ZsYellow n'étant pas excitées à leur maximum, et le filtre d'émission ne laissant pas passer l'intégralité de leur spectre d'émission, leur émission, et donc la visualisation des micro-organismes les exprimant, ne seront pas optimales.

# 1.2. Bloc-filtre Cy3

La superposition des filtres d'excitation et d'émission Cy3 sur les spectres d'excitation et d'émission des quatre protéines fluorescentes AmCyan, ZsYellow, Gfp et DsRed-express, montre que le filtreCy3 ne permet l'excitation que des deux protéines fluorescentes ZsYellow et DsRed-express, en étant néanmoins plus adapté à l'excitation de la protéine DsRed-express (recouvrement du spectre plus important). Néanmoins, la protéine ZsYellow n'étant pas excitée à son maximum, et le filtre d'émission ne laissant pas passer l'intégralité de son spectre d'émission, son émission, et donc la visualisation du micro-organisme l'exprimant, ne seront pas optimales.

# 1.3. Temps d'exposition

Le temps d'exposition de la caméra est un paramètre réglable qui permet également de modifier le niveau de séparation des protéines fluorescentes. En effet, malgré le fait que les blocs-filtres ne permettent pas toujours la séparation des protéines fluorescentes ayant des spectres d'excitation et/ou d'émission proches, le temps d'exposition peut pallier ce problème lorsque le niveau d'émission de fluorescence captée par la caméra est différent, car plus
l'émission d'un fluorophore est important, plus le temps d'exposition de la caméra peut être faible, et inversement.

Si l'on prend l'exemple des deux micro-organismes produisant les protéines ZsYellow et DsRed-express avec le bloc filtre Cy3, l'excitation et l'émission de la protéine ZsYellow ne sera pas optimale. En posant l'hypothèse que les protéines ont les mêmes rendements de fluorescence et sont produites en quantité équivalente, la fluorescence émise par le micro-organisme exprimant la protéine ZsYellow et captée par la caméra sera plus faible que celle émise par le micro-organisme exprimant la protéine DsRed-express et captée par la même caméra. On peut donc trouver un temps d'exposition de la caméra suffisant pour visualiser les micro-organismes exprimant la protéine DsRed-express mais insuffisant pour visualiser les micro-organismes exprimant la protéine ZsYellow, permettant ainsi la séparation des micro-organismes.

La même approche a été réalisée avec le bloc filtre FITC et les bactéries exprimant les protéines fluorescentes AmCyan ou ZsYellow et la levure exprimant la protéine Gfp. Néanmoins il n'a pas été possible de séparer le signal des trois micro-organismes en modifiant le temps d'exposition car bien que les filtres d'excitation et d'émission soient plus adaptés à la protéine Gfp, l'intensité de fluorescence émise par la levure exprimant cette protéine apparaît beaucoup plus faible que celle émise par les bactéries et nécessite un temps d'exposition (d'environ 6 s minimum), supérieur à celui nécessaire pour visualiser les protéines AmCyan et ZsYellow.

Les images des deux souches exprimant les protéines Gfp et DsRed-express obtenues avec les blocs filtres FITC et Cy3 adaptés respectivement aux protéines citées précédemment sont présentées sur la figure suivante (Figure 49).



**Figure 49 :** Photos prises en lumière blanche (1) avec le bloc-filtre FITC (2a) et le bloc-filtre Cy3 (2b) au microscope à épifluorescence. Une image composite des images 1, 2a et 2b a été réalisée grâce au logiciel ImageJ.

Pour résumer, avec le microscope à épifluorescence disponible, il est possible de séparer la bactérie produisant la protéine DsRed-express des trois autres micro-organismes exprimant les protéines AmCyan, Gfp ou ZsYellow, en utilisant de façon adéquate les blocs-filtres et/ou le temps d'exposition. Ces trois dernières protéines ne pouvant pas être séparées avec le microscope utilisé, des expériences en microscope confocale ont été réalisées, afin de voir si l'on pouvait améliorer les conditions d'excitation et d'émission, et ainsi augmenter le nombre de couleurs pouvant être séparées.

# 2. Visualisation et distinction des différents micro-organismes fluorescents en microscopie confocale

Le microscope confocal présente plusieurs avantages pour la visualisation des microorganismes exprimant des protéines fluorescentes.

Le premier avantage est lié à la présence d'un système de balayage de la source lumineuse (laser d'excitation) en mode axial (en profondeur dit en « z ») et radial (sur un plan dit en « xy ») sur l'échantillon qui permet de n'exciter qu'un plan focal à la fois, et de limiter à la fois l'interférence des plans supérieurs et inférieurs contrairement à ce qui est subit en microscopie 2D et une exposition trop intense des micro-organismes limitant ainsi d'éventuels phénomènes de bleaching (cf étude bibliographique paragraphe I.2.).

De plus, les lasers destinés à l'excitation des molécules fluorescentes peuvent être utilisés à des longueurs d'ondes très précises et la puissance du laser émis peut-être modulé permettant ainsi d'adapter l'intensité du laser en fonction du rendement ou de la quantité de fluorescence émise par les micro-organismes. Le microscope confocal utilisé pour nos études dispose de plusieurs lasers, ce qui permettra l'utilisation d'un plus grand nombre de fluorochromes. Les longueurs d'onde d'excitation pouvant être choisies avec précision, les phénomènes d'interférence dus au recouvrement des spectres pourront être minimisés (Tableau 14).

La largeur de la bande d'émission, également appelée fenêtre de récupération, peut aussi être modulée, élargie si le fluorochrome émet peu, ou rétrécie pour affiner le signal et limiter les superpositions des spectres d'émission si on utilise plusieurs fluorochromes. Ceci permet en quelque sorte d'avoir un filtre d'émission ajustable par l'utilisateur, ce qui n'est pas possible sur les blocs-filtres d'un microscope à épifluorescence 2D.

<u>**Tableau 14 :**</u> Longueurs d'onde optimales pour l'excitation des différentes protéines fluorescentes (données par le fournisseur Clontech) et laser et raies spectrales correspondantes disponibles sur le microscope confocal utilisé (LEICA SP2).

Fluorochrome	Longueurs d'onde optimales d'excitation	Lasers et raies employés
Protéine AmCyan	453	Argon 458 nm
Protéine EGfp	488	Argon 488 nm
Protéine ZsYellow	531	Argon 514 nm
Protéine DsRed-express	557	Helium- Néon 543 nm

L'interface disponible pour le réglage des paramètres pour l'excitation et l'émission des fluorochromes sur le microscope confocal LEICA SP2 est présentée sur la figure ci-dessous (Figure 50).



Figure 50 : Exemple de définition et réglages des paramètres pour l'excitation et l'émission des fluorochromes sur le microscope confocal LEICA SP2.

En microscopie confocale, deux modes d'acquisition peuvent être utilisés lorsque plusieurs fluorochromes sont présents :

- une acquisition « simultanée », c'est-à-dire que les différentes raies lasers correspondant aux composés fluorescents sont utilisées en même temps lors du balayage de l'échantillon en xyz,
- une acquisition séquentielle, où dans un premier temps, l'une des raies laser correspondant à l'un des fluorochromes balaye l'échantillon, qui ensuite sera balayé par une autre raie laser correspondant à un autre fluorochrome. Ce mode permet une meilleure séparation des fluorochromes si ceux-ci ont des spectres d'excitation et d'émission proches. Cependant cette procédure implique aussi un temps d'acquisition plus long, ce qui peut poser problème lors de l'observation de phénomènes dynamiques : le temps d'acquisition devra être très inférieur au temps caractéristique du phénomène ou du processus biologique à observer.

### 2.1. Systèmes complexes associant différentes bactéries

Des essais ont tout d'abord été réalisés sur les trois bactéries fluorescentes cyan, jaune et rouge. Ces trois souches recombinantes ont été cultivées séparément en Erlenmeyer dans un milieu riche (avec de l'ampicilline comme facteur de sélection et de l'IPTG, analogue structural du lactose, pour induire l'expression des protéines fluorescentes), puis mélangées et observées par microscopie confocale. Dans un premier temps, les souches ont été observées séparément afin de choisir les paramètres opératoires à l'excitation et à l'émission pour une bonne visualisation de la souche correspondante sans interférence avec les protéines fluorescentes des deux autres. Les images obtenues pour chaque souche soumise successivement aux lasers de longueurs d'onde 458, 514 et 543 nm sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 15).

		Culture E. coli	Culture E. coli	Culture E. coli
		pAmCyan	pDsRed-express	pZsYellow
Raie laser 458 nm	Fenêtre d'émission de 468 à 508 nm			
Raie laser 514 nm	Fenêtre d'émission de 524 à 537 nm			
Raie laser 543 nm	Fenêtre d'émission de 553 à 650 nm			

Tableau 15 : Images obtenues après l'excitation des trois cultures aux différents lasers (Objectifs X40 zoom3).

Les images obtenues confirment la pertinence des longueurs d'onde d'excitation et des fenêtres d'émission choisies, elles permettent d'une part la visualisation nette des souches exprimant les différentes protéines fluorescentes, et d'autre part la distinction sans aucune ambigüité des trois souches, constituant LE critère recherché dans notre étude. En effet, la plupart des études reportées dans la littérature sont qualitatives et l'un des objectifs principaux de ce travail vise à avoir des outils de quantification pertinents.

Ainsi, alors qu'en microscopie à épifluorescence, les bactéries cyans et jaunes ne pouvaient être distinguées les unes des autres, en microscopie confocale, grâce à une excitation laser fine et une fenêtre de récupération de l'émission mieux focalisée sur la zone appropriée, la distinction entre ces deux bactéries devient possible.

La qualité de la détection et de l'observation de chaque cellule a été confirmée en réalisant des observations sur lames de verre de mélanges plus ou moins denses, en 2D et en 3D des trois souches d'*E. coli* exprimant respectivement les protéines AmCyan, DsRedexpress et ZsYellow (Figure 51).



**Figure 51 :** Visualisation en microscopie confocale d'un mélange des 3 souches *d'E. coli* codant pour les trois protéines de fluorescence, observation à l'objectif X40 avec un zoom 3X sur un seul plan Z (image 2D) puis à l'objectif X40 avec un zoom 3X sur plusieurs plans Z cumulés (image 3D) pour l'image de droite.

Les images en 2D ou 3D de la figure ci-dessus, grâce à un objectif X40, et un zoom X3, a permis une observation fine des bactéries bien séparées les unes des autres.

Les trois souches recombinantes de *E. coli* exprimant les trois protéines fluorescentes sont bien visualisées et distinctes les unes des autres. L'observation des bactéries fluorescentes dans trois couleurs différentes en microscopie confocale de 2D et/ou 3D est tout à fait pertinente, sans qu'il n'y ait d'interférence entre les signaux fluorescents des différentes protéines exprimées par nos micro-organismes.

#### 2.2. Système complexe associant levures et bactéries

Dans le cadre de ce travail qui a pour objectif l'étude de systèmes microbiens complexes pluri-espèces, des essais ont été réalisés en associant la levure modèle exprimant la protéine Gfp et des bactéries fluorescentes exprimant respectivement dans les protéines cyan, rouge ou jaune. Ces différentes souches recombinantes ont été cultivées séparément en Erlenmeyer dans un milieu riche pour les souches de *E. coli* (avec ampicilline et IPTG) et un milieu YNB sans tryptophane pour *S. cerevisiae*, puis mélangées et observées par microscopie confocale.

Ces expériences ont permis de démontrer une très bonne distinction entre la levure verte et les bactéries rouges ou cyan en jouant sur les raies d'excitation disponibles et la puissance du laser (Figure 52). Ce paramètre de puissance est particulièrement important dans différentes configurations car c'est en modifiant ce dernier qu'il est possible de séparer sans nul doute les micro-organismes les uns des autres. Par exemple, il est ainsi possible de séparer la protéine cyan produite par la bactérie, de la protéine Gfp de la levure alors que les spectres d'excitation se recouvrent en partie.



**Figure 52 :** Dépôt de *S. cerevisiae* exprimant la protéine Gfp avec *E. coli* exprimant la protéine AmCyan (à gauche, 1 unité :  $37,6 \mu$ m) ou avec *E. coli* exprimant la protéine DsRed-express (à droite, 1 unité 15,1  $\mu$ m).

En revanche les expériences ont mis en évidence des difficultés à séparer la levure « verte » des bactéries « jaunes », et ce, même en modifiant la puissance du laser et en se plaçant en mode séquentiel. Ce résultat peut être expliqué par l'excitation simultanée des deux protéines avec la raie laser à 488 nm due au recouvrement partiel trop important de leurs spectres d'excitation, et de par le recouvrement également partiel de leurs spectres d'émission. Les deux signaux émis n'ont donc pas pu être séparés correctement, même en définissant des fenêtres étroites à l'émission. Ces deux souches ne devront donc pas être utilisées en mélange.

Néanmoins, comme pour le dépôt bactérien du paragraphe 2.2, la levure exprimant la protéine Gfp pouvant être combinées aux bactéries exprimant les protéines AmCyan et DsRed-express, ces bactéries ne présentant pas d'interférences entre elles, il est envisageable de coupler jusqu'à deux micro-organismes exprimant les protéines AmCyan et DsRed-express à la levure ou à tout autre micro-organisme exprimant la protéine Gfp.

# 3. Couplage des micro-organismes auto-fluorescents avec d'autres marqueurs d'activité

Différents marqueurs d'activité ou de viabilité sont couramment utilisés en microbiologie pour étudier l'état physiologique des micro-organismes. Certains ne fluorescent pas, par exemple le bleu de méthylène, utilisé comme marqueur d'activité métabolique chez certaines levures. D'autres fluorescent, comme le Syto9<sup>®</sup> (qui fluorescence dans le vert) ou l'Iodure de Propidium (IP, fluoresçant dans le rouge). Le Syto 9 est un marqueur d'actides

nucléiques présents dans la molécule d'ADN qui va marquer la totalité des cellules (mortes et vivantes). L'IP qui pénètre dans les cellules dont la membrane est altérée est un intercalant de l'ADN, on le considère ainsi souvent comme un marqueur de cellules mortes. L'utilisation conjointe de ces deux fluorochromes permet donc de quantifier le nombre de cellules totales, le nombre de cellules altérées (mortes), et par différence, le nombre de cellules dites métaboliquement « actives ».

Une autre molécule fluorescente, couramment utilisée comme marqueur d'activité métabolique est la Fluorescéine DiAcétate (FDA). La FDA est une molécule qui, lors de sa réduction par des enzymes type estérases fonctionnelles va donner un composé réduit fluorescent.

Lors du suivi dynamique de la formation d'agrégats biologiques et surtout si on s'intéresse à l'influence de l'environnement local sur le comportement des micro-organismes, la possibilité de coupler des micro-organismes autofluorescents à des marqueurs d'activité ou de viabilité comme la FDA et l'IP présente un intérêt majeur.

Des expériences ont donc été réalisées afin d'évaluer les couplages les plus pertinents et leur condition de mise en œuvre.

#### 3.1. Couplage FDA/micro-organismes fluorescents rouges

Avant d'utiliser les micro-organismes modifiés, un premier essai a été réalisé avec une culture de *S. cerevisiae* PJ69-4A sauvage, mais présentant une pigmentation rouge importante due à une culture en condition d'adénine limitante. Le pigment produit par la levure émet dans la même gamme de longueur d'onde que les micro-organismes exprimant la protéine DsRed-express. Des levures PJ69-4A sauvages ont été cultivées pendant 48h sur milieu riche YPD et laissées 4 à 5 jours à 4°C pour induire une limitation en adénine contribuant à la synthèse et l'accumulation du pigment rouge. Un dépôt de levures est réalisé par filtration (membrane Sartorius Sortolon Polyamid 0,45  $\mu$ m), et observé par microscopie confocale après marquage à la FDA. Les images 3D ont été reconstruites grâce au logiciel Volocity<sup>®</sup> (Figure 53).



**Figure 53 :** Visualisation en microscopie confocale d'un dépôt sur membrane de *S. cerevisiae* PJ69 marquée au FDA: objectif X20 (1 unité=28,9μm). Des zooms ont été réalisés sur certaines zones du dépôt.

Bien que les cellules marquées à la FDA soient peu nombreuses, du fait de l'âge de la culture (6 jours), la coloration des cellules actives en vert est très nettement différenciable de la coloration rouge des autres cellules. La FDA peut donc être utilisée comme marqueur d'activité sur des micro-organismes recombinants émettant dans le rouge.

# 3.2. Couplage IP /micro-organismes fluorescents verts

Une culture de *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp a été réalisée en Erlenmeyer. Après 40 h de culture, les cellules étant limitées en substrat, on constate une hétérogénéité de population, deux classes vivante et morte qui peuvent être mise en évidence par un marquage à l'IP, selon le protocole décrit dans la partie matériel et méthode. L'échantillon est observé au microscope à épifluorescence à l'aide des blocs-filtres précédemment décrits, la protéine Gfp émettant dans le vert et l'IP émettant dans le rouge. Une des images obtenues est présentée sur la figure suivante (Figure 54).



Figure 54 : Cellules S. cerevisiae PJ69-4A pYGfp marquées à l'IP.

La coloration des cellules mortes en rouge (IP) est très nettement différenciable de la coloration verte des levures exprimant la Gfp. Ce marqueur de mortalité peut donc être couplé à des micro-organismes émettant dans le vert.

#### 3.3. Couplage Bleu de méthylène/micro-organismes fluorescents verts

Bien que le bleu de méthylène, marqueur d'activité chez certains genres de levures, ne soit pas un colorant fluorescent, son utilisation sur *S. cerevisiae* permet d'avoir rapidement une estimation de l'état physiologique des levures exprimant la protéine fluorescente Gfp, les levures inactives ou mortes apparaissant en bleu sur une image en fond clair (Figure 55). Il a été vérifié auparavant que l'utilisation du bleu de méthylène ne modifiait pas la fluorescence des levures Gfp.



**Figure 55 :** Cellules de *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp marquées au bleu de méthylène et observées en épifluorescence en fond clair (1) et avec le filtre FITC (2). Une image composite a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (3).

L'observation des images de la figure ci-dessus (Figure 55) montre que le couplage bleu de méthylène – levures exprimant la protéine Gfp est possible.

## 4. Taux de marquage des micro-organismes

Dans un but de quantification et compte-tenu des recommandations formulées jusqu'ici, les rendements de marquage des différents micro-organismes autofluorescents construits ont été évalués.

#### 4.1. Escherichia coli

Différentes observations ont été réalisées pour estimer le pourcentage de marquage des bactéries exprimant les différentes protéines fluorescentes AmCyan, ZsYellow et DsRedexpress. Les différentes observations réalisées et ont montré un marquage total des bactéries. Un exemple est donné ci-dessous pour la bactérie *E. coli* exprimant la protéine DsRed-express (Figure 56).



Figure 56 : Image en épifluorescence, objectif X100, avec le bloc-filtre Cy3 (1) et l'image composite en fond clair associé (2).

Sur ces images, toutes les bactéries émettent une fluorescence rouge. L'intensité de fluorescence semble différente chez certaines bactéries par rapport à d'autres, en réalité, ces différences viennent du fait qu'elles ne sont pas sur le même plan focal.

#### 4.2. Saccharomyces cerevisiae

Nous avons pu remarquer sur plusieurs expériences que le taux de marquage des levures exprimant la protéine Gfp apparaît hétérogène et pas total. Ce taux de marquage semble varier en fonction de différents paramètres comme la composition du milieu, l'aération et l'état physiologique des levures. L'influence de ce paramètre a été quantifiée sur plusieurs observations, réalisées en couplant l'IP ou le bleu de méthylène à des cultures de levures.

Un exemple est donné sur la figure suivante (Figure 57), les ronds bleus ci-dessous identifient des levures non fluorescentes marquées au bleu de méthylène et les ronds rouges identifient des cellules qui ne sont ni marquées à la Gfp, ni marquées au bleu de méthylène.



Figure 57 : Image en épifluorescence, objectif X40, avec le bloc-filtre FITC (1) et l'image composite en fond clair associé (2).

Sur cette observation microscopique grâce à des marquages au bleu de méthylène, on peut voir que sur 246 cellules observées, 220 présentes un marquage à la Gfp, 12 sont colorées en bleu de méthylène mais ne présentent pas de fluorescence (entourées en bleu), et 14 ne sont ni marquées par la Gfp, ni marquées au bleu de méthylène (entourées en rouge). Ceci semble indiquer que les cellules mortes ou inactives ne présentent plus de fluorescence. Par contre, cet état physiologique ne peut pas être le seul facteur influençant le marquage, car certaines cellules, non marquées au bleu de méthylène, donc vivantes, ne présentent pas la fluorescence verte de la « Gfp ».

D'autres essais réalisés avec de l'IP ont montré la même tendance, avec « trois » populations cellulaires, à savoir des cellules marquées à la Gfp, des cellules mortes marquées à l'IP mais non marquées à la Gfp, et des cellules n'étant ni marquées à la Gfp, ni marquées à l'IP. Sur l'exemple ci-dessous (Figure 58), des ronds bleus identifient des levures non fluorescentes marquées à l'IP et les ronds rouges identifient des cellules qui ne sont ni marquées à la Gfp, ni marquées à l'IP.



Figure 58 : Images en épifluorescence, objectif X40, avec le bloc-filtre FITC (1), le bloc filtre Cy3 (2) et l'image composite en fond clair associé (3).

Les trois populations de cellules peuvent être visualisées. Il semble bien que les cellules mortes ou inactives ne présentent plus de fluorescence verte due à la Gfp. Néanmoins, ce paramètre « viabilité » ne peut pas expliquer à lui seul les différences rencontrées ; en effet, sur d'autres observations où les taux de marquage étaient relativement faibles, les levures n'étaient pas, ou très peu, marquées au bleu de méthylène.

D'autres facteurs semblent donc influencer la synthèse de la protéine Gfp, comme la composition du milieu, et notamment la source de carbone, ou la maturation de la protéine, liée à l'aération comme montré précédemment.

#### 5. Conclusion

Nos expériences réalisées en couplant les micro-organismes auto-fluorescents construits entre eux et/ou avec des marqueurs d'activité d'intérêt tels que l'IP, la FDA et le bleu de méthylène montrent :

- qu'il est possible de coupler et de visualiser jusqu'à trois micro-organismes fluoresçant dans trois couleurs différentes parmi les quatre testées :
  - \* soit en utilisant la levure Gfp avec les bactéries exprimant les protéines AmCyan et DsRed-express;
  - \* soit en utilisant les bactéries exprimant les protéines AmCyan, ZsYellow et DsRed-express ;
- qu'il ne sera pas possible de coupler la bactérie exprimant dans le jaune avec la levure exprimant dans le vert, où tout marqueur fluorescent dans le vert, comme la FDA.
- que le bleu de méthylène et l'IP peuvent être couplés à la levure Gfp pour marquer les cellules mortes. L'IP fluoresçant dans le rouge, il peut être également envisageable d'utiliser l'IP dans une culture mixte avec nos bactéries exprimant les protéines AmCyan ou ZsYellow, ou dans une culture mixte avec une bactérie exprimant la protéine AmCyan et la levure exprimant la protéine Gfp.
- que la FDA peut être utilisée avec des micro-organismes fluoresçant dans le rouge pour marquer les cellules actives.

D'autres chercheurs ont pu étudier ou exploiter la compatibilité des différentes molécules fluorescentes ou des protéines fluorescentes. L'exemple le plus connu est l'utilisation combinée de l'IP et le Syto9 fluoresçant respectivement dans le vert et le rouge et marquant les cellules mortes et vivantes (cf revue bibliographique paragraphe I-2.2 p 19). Concernant l'utilisation des protéines fluorescentes, Tolker-Nielsen *et al.* 2000 ont réussi à visualiser le développement d'un biofilm modèle composé de deux souches de *Pseudomonas* exprimant les protéines fluorescentes Gfp et DsRed grâce à l'utilisation d'un microscope confocal (LEICA TCS4D) équipé de filtres et détecteurs adaptés à la visualisation des protéines Gfp et DsRed.

Andersen et *al.*, 2006, quand à eux, ont inséré des gènes codant pour cinq protéines fluorescentes différentes : la protéine cyan « Cfp », verte « Gfp », jaune « Yfp », rouge « DsRedExpress » et rouge sombre « HcRed ». Ils ont ensuite évalué la possibilité de discriminer les micro-organismes produisant ces protéines fluorescentes en réalisant des

observations à l'aide d'un microscope confocal (LEICA SP1) équipé de laser argon Néon (raies d'excitation disponibles à 458 nm, 476 nm, 488 nm et 514 nm) et de deux lasers Hélium Néon (raies d'excitation à 543 nm et 633 nm). Les résultats obtenus sont similaires aux nôtres quant à une discrimination possible des protéines exprimant dans le cyan, le jaune et le rouge avec les lasers d'excitation à 456, 488 or 543 nm et des fenêtres de récupération respectivement de 500 à 510 nm, 555 à 583 nm or 592 à 640 nm. Dans notre étude, pour l'excitation de la protéine jaune, le laser utilisé n'avait pas été celui à 488 nm mais celui à 514 nm. Ils ont également observé une difficulté à discriminer la protéine Gfp exprimant dans le vert de la protéine Yfp exprimant dans le jaune, du fait du recouvrement trop important de leurs spectres. Ils ne donnent par contre aucune information concernant la discrimination des trois protéines exprimant dans le cyan, le vert et le rouge.

Un fois tous les paramètres d'acquisition définis, l'étape suivante est celle de l'analyse d'images, et des mesures ou calculs pouvant être réalisés à l'aide des logiciels disponibles au laboratoire.

## III - Analyse d'images quantitative 2D/3D

A partir des images acquises en microscopie, différents éléments de caractérisation des agrégats microbiens peuvent être déterminés grâce au module de quantification du logiciel Volocity®; il s'agit principalement d'informations relatives à la géométrie de l'agrégat, à sa densité, au taux de vide et à la répartition des espèces présentes.

Pour aboutir à ces informations, une étape de recalibration des images est nécessaire afin que les résultats des différents calculs réalisés à partir des acquisitions soient exprimés dans le système métrique. En effet, pas défaut, le logiciel considère que la taille d'un voxel est de 1 unité arbitraire que ce soit en x, y ou z. Pour recalibrer les images, une fois les images transférées sur le logiciel de traitement d'images, la taille du pixel (2D) ou du voxel (3D) doit être redéfinie d'après la taille réelle du pixel ou voxel définie selon les conditions d'acquisition, exprimée dans notre cas en  $\mu$ m (Figure 59).



**Figure 59 :** Exemple de recalibration de la taille d'un voxel. A gauche, taille initiale par défaut, à droite : taille réelle après recalibration.

Les logiciels de traitement d'images choisis pour cette étude permettent d'accéder à de multiples outils de traitement et d'analyse. Il s'agit des logiciels ImageJ et Volocity<sup>®</sup>. Il convient de noter que, malgré l'ensemble des fonctions disponibles dans les logiciels, aucun traitement des images n'est pré-programmé et disponible « clé en main » dans ces logiciels.

Une grande partie du travail méthodologique a donc consisté à s'approprier les outils disponibles via ce logiciel et de tester leurs limites et potentialités pour aboutir, à partir de dépôts réalisés de manière contrôlée, à des choix et des précautions d'usage des outils de traitement des données (seuillage de l'intensité des pixels/voxels, filtrage du bruit, définition des zones de mesures axiales et radiales etc...) afin de garantir des mesures et des quantifications les plus correctes possibles (mesures des taux de vide, évaluation des ratios de populations etc...). Cette partie méthodologique liée au traitement des imagesest nécessaire afin de bien poser les bases d'une quantification rigoureuse par une démarche méthodologique claire.

## 1. Caractéristiques géométriques de l'agrégat ou du dépôt

Grâce au module de quantification du logiciel, des données relatives à la taille peuvent être mesurées directement sur l'image 3D reconstituée à partir des fichiers acquis. Par exemple dans le cas d'un dépôt de bactérie *E. coli* exprimant la protéine rouge (Figure 60), le système de traitement permet de mesurer l'épaisseur en un point donné ou sur la globalité de l'objet. Le tracé du trait bleu clair sur la figure ci-dessous (Figure 60) représente l'épaisseur (50  $\mu$ m pour l'image présentée ici) et le tracé du trait vert permet d'obtenir la longueur du dépôt (217  $\mu$ m). D'autres repères bornant la zone que l'on souhaite mesurer peuvent ainsi être tracés pour mesurer les dimensions à différents endroits.



**Figure 60 :** Reconstruction d'un dépôt en 3 D et mesure de l'épaisseur. 1 unité = 1 côté de petit carré  $\approx 22 \ \mu m$ . Surface observée  $\approx 220 \ x \ 220 \ \mu m$ .

#### 2. Détermination du volume occupé par un groupe d'objets

Le module de quantification de Volocity® permet également la mesure du volume d'un objet, ou d'un ensemble d'objets, ce qui dans notre cas d'étude, présente l'intérêt de pouvoir faire des ratios de volume de couleur représentatif des ratios de quantité de microorganismes auto-fluorescents.

Mesurer un volume en trois dimensions passe en réalité par l'analyse de chaque plan z, dont l'épaisseur correspond à la hauteur du voxel. Pour chaque plan z, la surface du ou des objets d'intérêt est mesurée, puis grâce à la connaissance de la hauteur du voxel, le volume de l'objet d'intérêt peut être calculé pour chaque coupe optique z. Le logiciel Volocity® permet ensuite l'addition des volumes de chaque plan z, et ainsi une analyse dans l'intégralité du dépôt. Si l'on souhaite réaliser cette étude seulement dans une partie de l'épaisseur du dépôt, ceci est également possible, en sélectionnant les plans z que l'on souhaite analyser.

Différents critères peuvent être définis lors de l'analyse d'un volume, notamment des critères de taille, de distance minimale entre objets, ou de choix de filtres... Ces critères seront illustrés dans l'exemple ci-dessous pour l'application à la détermination du ratio de population. L'appréciation et la sélection de ces paramètres qui bornent l'analyse est réalisée manuellement par l'utilisateur et de ce fait, elle est assez délicate car elle peut comporter une part de subjectivité liée aux choix et à la sensibilité de l'opérateur. Ainsi, une analyse comparative sera plus précise si elle est toujours réalisée par la même personne qui sélectionnera les mêmes conditions de traitement des images.

# 2.1. Détermination du ratio de population dans le cas d'un système complexe

En évaluant dans un agrégat les volumes occupés respectivement par des populations d'objets fluoresçant dans des longueurs d'ondes différentes, il est possible d'atteindre le ratio de ces populations. Par exemple dans l'image ci-dessous (Figure 61) correspondant à un dépôt mixte levures/bactéries, il est possible de calculer le ratio entre les volumes occupés par les levures exprimant la protéine verte et les bactéries exprimant la protéine rouge.



Figure 61 : Dépôt mixte levure exprimant la protéine verte / bactérie exprimant la protéine rouge. Le côté d'un petit carré correspond à 15,1 μm. Surface observée 151 x 151 μm.

Le traitement, effectué sur des plans successifs du dépôt (Figure 62) est illustré cidessous. Un seul plan est considéré dans cet exemple, mais les critères définis pour ce dernier sont identiques sur toute l'épaisseur du dépôt, garantissant ainsi une homogénéité du traitement du signal.

Pour le plan considéré, il conviendra en premier lieu d'analyser la surface recouverte par un signal dans l'exemple suivant celui issu de la protéine verte (Figure 62).



**Figure 62 :** Etapes du traitement de l'image acquise pour un dépôt mixte de levures exprimant la protéine verte et de bactéries exprimant la protéine rouge. A gauche (Figure 62a):image d'un plan z donné, au centre : critères d'analyse et choix du seuil permettant de sélectionner les levures; a droite (Figure 62c):résultat du traitement appliqué.

Sur la Figure 62a, l'image correspond au signal acquis en microscopie confocale sur un plan z donné. Le tableau au centre de la figure regroupe les critères de traitement appliqués au signal issu des levures vertes afin de sélectionner la surface qu'elles recouvrent. L'objectif est de déterminer manuellement le niveau de seuillage qui permettra de détecter l'ensemble des individus identifiables comme « levures » c'est-à-dire « objets fluoresçant en vert ».

Les valeurs d'intensité de fluorescence des différents pixels issus de l'acquisition sont comprises entre 0 et 255. La détermination d'un seuil sur ces valeurs va, pour le logiciel, permettre de binariser ces valeurs, c'est-à-dire donner la valeur 0 aux pixels ayant une valeur n'entrant pas dans les bornes fixées par l'utilisateur et une valeur de 1 aux pixels dont la valeur est comprise dans les bornes fixées par l'utilisateur. Le logiciel va ensuite comptabiliser la surface des objets dont la valeur binaire est 1. Ceci illustre bien l'importance et la délicatesse du seuillage, car deux pixels de valeurs proches pourront subir la loi du « tout ou rien » définie par l'utilisateur.

L'image de droite (Figure 62c) illustre le résultat du traitement appliqué ; sur ce traitement, le seuil bas a été fixé à une valeur d'intensité de pixel de 5 (sur la gamme de 0 à 255 issues de l'acquisition) et la borne supérieur à été fixée à 255. La zone apparaissant en rouge (Figure 62c) correspond à la gamme d'intensité des pixels que l'on considère comme signal issu des levures, que le logiciel va convertir en valeur binaire « 1 » pour l'analyse de la surface des objets. Les levures qui sont reconnues comme autant d'objets individuels, apparaissent alors dans des couleurs différentes. Le code couleur donné par le logiciel sert seulement à différencier les différents objets les uns des autres, mais ne correspond à aucune donnée quantitative.

A partir de cette étape, le traitement de ces données permet en additionnant les surfaces des différents objets colorés identifiés d'obtenir, sur l'exemple précédent, une surface totale de 7791  $\mu$ m<sup>2</sup>. Cette surface correspond donc pour le plan considéré à la surface totale recouverte par les levures.

Ci-dessous, pour exemple, deux autres seuils inférieurs ont été fixés pour analyser à nouveau l'image précédente (Figure 62), sur l'image de gauche (Figure 63a), la borne inférieure a été fixée à 1 (la borne supérieure à 255). Sur l'image de droite (Figure 63b) la borne inférieure est fixée à 60 (la borne supérieure à 255).



Figure 63 : Différents seuillages appliqués à une même image acquise pour un dépôt mixte de levures exprimant la protéine verte et de bactéries exprimant la protéine rouge.

Une borne inférieure fixée trop bas (Figure 63a) entraîne une surévaluation du signal issu des levures, notamment du fait de l'implication du bruit de fond dans le signal compté comme issu des levures. Une borne inférieure fixée trop haute (Figure 63b) va à l'inverse, entraîner une sous-évaluation du signal issu des levures, les levures reconnues dans la borne apparaissant comme différents objets de différentes couleurs sur l'image ci-dessus, mais des levures, bien identifiables restent exclues de l'analyse.

La définition de la borne inférieure permet dans ce cas d'éliminer le bruit de fond lors de l'analyse. La borne supérieure est laissée fixée à la valeur maximale de 255 dans ces analyses, car ces valeurs correspondent bien à des pixels représentant des levures.

Dans un deuxième temps, le traitement doit s'intéresser à la surface recouverte par le signal rouge correspondant dans le cas présenté aux bactéries. Le même principe que précédemment est appliqué.



**Figure 64 :** Etapes du traitement de l'image acquise pour un dépôt mixte de levures exprimant la protéine verte et de bactéries exprimant la protéine rouge. A gauche (Figure 64a)): image d'un plan z donné, au centre : critères d'analyse et choix du seuil permettant de sélectionner les bactéries; à droite (Figure 64b): résultat du traitement appliqué.

Dans cet exemple, les critères et les seuils pour la reconnaissance des bactéries sont plus délicats à définir du fait de leur taille (nettement inférieure à la taille des levures) et de leur proximité les unes des autres (organisation particulière des bactéries du fait de leur encombrement stérique et de leur déformabilité). La borne inférieure du seuil a été fixée à 80 et la borne supérieure à 255.

Avec la résolution des images, liés aux paramètres d'acquisition (longueur d'onde, objectifs, ...), les bactéries sont alors reconnues comme un seul objet, représenté en jaune-vert sur la Figure 64b) et l'opérateur doit être à même avec son expertise de définir les critères qui ne biaisent pas l'analyse de l'image. La zone de vide (en bas à droite de l'image Figure 64a) ne doit pas être comptabilisée comme un dépôt bactérien mais bien comme une zone non-colonisée. Ceci souligne l'importance de la sélection des critères de reconnaissance et l'intérêt d'un seul et unique opérateur pour réaliser le traitement d'un ensemble d'expériences afin d'être sûr de pouvoir comparer et quantifier les données pertinentes pour une analyse de l'évolution des structures.

Dans le cas illustré ici et compte-tenu des conditions de traitement sélectionnées, la surface recouverte par les bactéries pour le plan considéré est de 16809  $\mu$ m<sup>2</sup>.

A partir de l'évaluation des surfaces recouvertes par les bactéries et les levures, respectivement de 16809  $\mu$ m<sup>2</sup> et 7791  $\mu$ m<sup>2</sup>, il est alors facile de calculer un ratio des deux surfaces et de voir que la surface recouverte par les bactéries est 2,16 fois plus importante que celle recouverte par les levures.

En élargissant l'analyse sur toute l'épaisseur du dépôt (Figure 62), grâce à la création d'une « séquence d'images », c'est-à-dire un fichier cumulant tous les plans z du dépôt sur lequel les mêmes paramètres de seuillage que pour le traitement 2D seront appliqués, on trouve un volume couvert par les bactéries de 269349  $\mu$ m<sup>3</sup> et un volume couvert par les levures de 87822  $\mu$ m<sup>3</sup>.

Dans cette expérience, le volume occupé par les bactéries est donc 3 fois plus important que le volume occupé par les levures.

Comme on peut le remarquer, ce ratio est supérieur à celui évalué sur le plan z considéré comme modèle. Les critères d'analyse pour les bactéries et les levures étant identiques pour tous les traitements, cela permet de supposer une distribution hétérogène des deux espèces dans le dépôt. Ce résultat était déjà entrevu de manière qualitative sur l'image globale du dépôt Figure 62.

#### 2.2. Evaluation du taux de vide d'un agrégat

Le taux de vide peut être évalué en considérant les zones non recouvertes par des objets fluorescents, analysés comme dans l'exemple ci-dessus, c'est-à-dire correspondant à des zones noires sur les images. On peut donc définir le taux de vide comme suit :

Taux de vide = 
$$(1 - \frac{\sum \text{ volumes objets fluorescents}}{\text{volume total}}) \times 100$$

Il convient néanmoins de délimiter avec précision le dépôt pour ne pas comptabiliser comme « vide » des zones situées au dessus et au dessous du dépôt ce qui induirait une erreur sur le calcul du taux de vide interne à la structure. Cette étape peut s'avérer délicate lorsque l'on s'intéresse à l'ensemble de la structure et que cette dernière à des contours irréguliers. Pour plus de rigueur sur le résultat annoncé, le calcul devra être réalisé sur un volume sélectionné dans l'épaisseur de la structure.

En outre dans le cas des couplages de fluorochromes marqueurs d'activité et/ou avec des micro-organismes auto-fluorescents, les signaux pourront être co-localisés c'est-à-dire que deux fluorochromes différents peuvent émettre sur le même élément de volume. Dans le cas par exemple d'une bactérie exprimant la protéine DsRed-express, marquée à la FDA, on ne prendra pas en compte le volume issu du signal de la FDA mais seulement le volume issu de la protéine DsRed-express, pour ne pas comptabiliser deux fois l'objet.

#### 3. Discussion sur la quantification d'agrégats biologiques par analyse d'images

La caractérisation d'un agrégat biologique implique l'analyse de sa structure et de son organisation. Selon les techniques mises en œuvre, l'acquisition et l'analyse d'images peuvent permettre d'analyser non seulement la structure globale mais apportent aussi des éléments d'information sur l'organisation locale. Les structures de ces agrégats pouvant être très variables, la définition et la quantification de différents paramètres caractéristiques tels que les dimensions globales (épaisseur, largeur), le taux de vide, la surface ou le volume, sont nécessaires pour les comparer en fonction des conditions environnementales. Les potentialités et limites des techniques de microscopie ont précédemment été discutées. En ce qui concerne le traitement d'images, les logiciels que nous avons utilisés (ImageJ ou Volocity®) se sont avérés pertinents pour quantifier la plupart de ces paramètres (dimension, taux de vide, surfaces, volumes), que nous appellerons paramètres « de surface » ou « de volume », et ce en 2 D comme en 3D.

D'autres chercheurs se sont intéressés à la quantification des caractéristiques de biofilms par analyse d'images en 2D ou 3D en utilisant d'autres logiciels, comme le logiciel ISA (Yang *et al.*, 2000 ; Beyenal *et al.*, 2004a) ou les logiciels COMSTAT (Heydorn *et al.*, 2000) ou PHLIP (Mueller *et al.*, 2006). Cependant, quel que soit le logiciel utilisé, le seuillage est une étape nécessaire pour passer d'une image en niveau de gris à une image binaire. Ainsi, les analyses quantitatives réalisées dans cette étude sur des dépôts ou des biofilms ont reposé sur la binarisation des images initialement acquises en niveau de gris, dont les valeurs sont comprises entre 0 et 255 (8 octets). Comme nous avons pu le préciser, et comme l'indiquent également d'autres chercheurs (Yang *et al.*, 2000, Heydorn *et al.*, 2000), le seuillage lors de l'analyse d'image est une opération qui peut apparaître subjective. Le seuil fixé par l'opérateur est lié à l'appréciation de celui-ci, tout comme les réglages des paramètres lors de l'acquisition de l'image en microscopie confocale (gain, offset, puissance du laser...).

Le choix du seuil est délicat en raison des caractéristiques tridimensionnelles des objets et de la densité des micro-organismes dans des agrégats, c'est cependant l'étape initiale requise pour aboutir à une quantification (III-2.1). Ainsi, l'analyse d'un même biofilm par plusieurs opérateurs susceptibles de sélectionner des valeurs de seuils différentes, peut conduire à des mesures différentes et induire des biais dans l'interprétation (Beyenal *et al.*, 2004b). Dans cette étude un seul opérateur a mené toutes les étapes depuis la définition des paramètres d'acquisition jusqu'à l'analyse des images, ce qui a permis de s'affranchir de ce

problème ou du moins de le limiter. Les quantifications des images d'une même expérience ont été également réalisées sur une durée courte (quelques jours au maximum) afin de limiter ces variabilités. Cependant, l'ensemble des opérations étant long et fastidieux, il serait particulièrement intéressant de pouvoir développer une automatisation du seuillage afin de multiplier les opérateurs et les analyses. Plusieurs équipes ont fait des propositions en ce sens et ont envisagé diverses méthodes de seuillage automatique (Xavier et al., 2001 ; Yerly et al., 2007). A titre d'illustration, Beyenal et al., 2004b, ont comparé plusieurs méthodes pour l'analyse de biofilms. Certaines de ces méthodes semblent pertinentes sur des objets séparés, car elles sont basées sur la détermination des contours des objets de formes connues; cependant leur application sur des biofilms ou des groupes de cellules de formes non définis n'est pas parue pertinente, leur morphologie étant trop variable. D'autres méthodes basées sur l'analyse de l'histogramme d'intensité des niveaux de gris ont été testées, et l'une d'entre elles, la méthode dite « itérative » a été estimée pertinente, en aboutissant à un seuil proche de celui qui aurait été fixé manuellement. Le principe de cette méthode repose sur le calcul d'une valeur moyenne, qui serait le seuil, qui se base sur le calcul de deux moyennes : la moyenne des valeurs d'intensité des pixels du fond et la moyenne des valeurs des pixels des objets. Néanmoins, bien que le seuillage automatique permette d'éliminer la variabilité due aux différents utilisateurs, il est difficile de définir une procédure valide quelle que soit l'image, du fait de la trop grande variabilité entre les différentes applications en biologie.

Une fois le seuillage et la binarisation réalisés, nous avons pu montrer la possibilité de quantifier des paramètres de surface ou de volume grâce aux logiciels Volocity<sup>®</sup> ou Image J. Nous avons notamment déterminé la porosité (taux de vide). Pour ce paramètre, le calcul s'effectue globalement de façon similaire aux travaux de Yang *et al.* 2000, à la seule différence que ces auteurs mesurent directement les zones considérées comme étant du vide (valeur binaire 0), tandis que nous obtenons cette valeur en soustrayant pour une surface donnée les pixels représentant les objets (micro-organismes) au nombre total de pixels. Les autres paramètres que nous avons analysés concernent les dimensions (épaisseur de dépôts ou de biofilms) et, pour une zone de référence (volume ou surface), les volumes et surfaces occupés par les objets ou par les différentes espèces microbiennes présentes, tel que par exemple le « bio-volume » utilisé par Heydorn *et al.*, 2000, et défini comme étant le rapport du volume des objets (micro-organismes) sur la surface qu'ils occupent.

D'autres paramètres dits de volume ou de surface décrits dans la littérature n'ont pas été étudiés, mais pourraient être approfondis et quantifiés en implémentant le logiciel. Il s'agit par exemple de la distance de diffusion qui est déduite de la distance entre les pixels/voxels situés au centre d'un objet et ceux représentants les contours extérieurs de l'objet. Cette donnée permet de déterminer pour un groupe de cellules, la distance entre des cellules au cœur d'un agrégat et la source de nutriment située dans le milieu extérieur.

Les analyses réalisées dans cette étude ont été centrées sur des paramètres de surface ou de volume destinées à caractériser la morphologie des dépôts et biofilms. Néanmoins, il aurait été intéressant de compléter cette approche en quantifiant des paramètres dits « texturaux » qui permettent quant à eux d'évaluer l'homogénéité d'une structure en comparant la taille, la position et/ou l'orientation de ses composants (Beyenal *et al.*, 2004a). Le calcul de ces paramètres ne nécessite pas de binarisation des images car il repose directement sur l'exploitation de données matricielles issues de l'image traduite en niveau de gris (Beyenal *et al.*, 2004a et 2004b) Cependant, pour la réalisation de ces calculs, comme pour le calcul de certains paramètres de surface ou de volume avec les logiciels utilisés dans notre étude, il serait nécessaire d'implémenter le logiciel ImageJ avec des modules adaptés (le logiciel commercial Volocity® ne pouvant pas être implémenté), et, le cas échéant, de les développer.

# IV- Contraintes, limites et optimisation

Les paragraphes précédents ont permis d'entrevoir que l'utilisation de microorganismes auto-fluorescents pour analyser *in-vivo* et *in-situ* les caractéristiques physiques et biologiques d'agrégats biologiques complexes devait prendre en compte à la fois les différentes contraintes liées à des paramètres biologiques ainsi que les limites techniques lors de l'acquisition ou du traitement des images. Ces différents éléments seront tour à tour détaillés dans cette partie.

#### 1. Limites, contraintes et optimisation liées à l'acquisition

#### 1.1. Temps d'acquisition

La durée requise pour l'acquisition d'une image tridimensionnelle va dépendre de plusieurs paramètres comme l'épaisseur de l'agrégat ou dépôt, le pas sélectionné entre chaque plan z, la vitesse de balayage du laser, le mode d'acquisition (séquentiel ou simultané). Selon les conditions d'acquisition retenues pour obtenir une image de qualité optimale et les caractéristiques de la structure observée, cette durée peut devenir limitante pour l'étude de phénomènes dynamiques (notamment pour l'étude des transferts de matière au sein des structures biologiques).

Différentes stratégies peuvent permettre de réduire ce temps d'acquisition :

- la réduction de la zone analysée,
- l'augmentation du pas entre chaque plan z, ou de la vitesse de balayage par exemple.

Mais ces modifications seront en défaveur de la qualité des images entraînant de fait des difficultés de traitement par la suite.

Dans le cas de systèmes évolutifs (transfert de matière, réorganisation des structures, compression...) dont l'étude cinétique requiert l'obtention d'une succession d'images à une cadence suffisamment élevée par rapport au phénomène, l'opérateur doit donc réaliser un compromis entre des conditions d'acquisition qui permettront d'obtenir des images précises et un temps d'acquisition minimal.

# 1.2. Réglage du gain et de l'offset

Parmi les paramètres d'acquisition, le gain (qui correspond à l'amplification du signal lors de la conversion des photons en électrons) et l'offset (qui sert à régler le seuil bas lors de la détection) sont particulièrement importants car leur réglage est indispensable pour obtenir un rapport signal/bruit optimal. De la qualité de ces réglages dépendra la qualité de l'image et en conséquence les données obtenues après traitement ultérieur. Le réglage de ces paramètres est en général effectué sur un échantillon de suspension cellulaire entre lame et lamelle, avec des micro-organismes bien séparés les uns des autres, que l'on peut observer en fond clair ou en fluorescence. L'image en fond clair des micro-organismes est utilisée pour créer un composite (addition de l'image en fond clair et la même image en fluorescence) qui sert à la fois à estimer l'adéquation entre les contours des objets fluorescents et ceux des objets en fond clair et à vérifier le taux de marquage des micro-organismes. Des codes couleurs permettent de vérifier que la puissance du laser utilisé est suffisamment élevée tout en évitant les problèmes de saturation de l'objet. Ces paramètres, définis sur un échantillon représentatif des micro-organismes contenus dans l'agrégat, peuvent généralement être conservés lors de l'analyse en 3D.

Néanmoins lors de l'analyse de dépôts de bactéries, l'utilisation des paramètres définis à partir d'une suspension conduit à un signal trop intense. La saturation qui en résulte recouvre les zones adjacentes qui devraient apparaître noires puisque correspondant à du vide. Ce phénomène pourrait être dû au tassement (« compaction ») des bactéries, qui entraînerait une fluorescence émise pour chaque voxel beaucoup plus élevée que lors du réglage des paramètres sur lame simple. Le taille du voxel dépend de plusieurs facteurs comme le grossissement de l'objectif utilisé, mais est toujours inférieure à la taille des microorganismes. Pour pallier ce problème et éviter la saturation, différents réglages ont été établis sur plusieurs dépôts de caractéristiques différentes (épaisseur, compaction, densité de bactéries..), afin de réduire la puissance du laser par rapport à celle requise pour l'observation de suspensions. En contre partie, la diminution de la puissance laser entraînera une réduction de l'intensité du signal émis par les bactéries en particulier celui des cellules isolées ou situées en surface de l'agrégat qui pourront ne pas être prises en compte dans le calcul.

D'autres contraintes ou limites liées à des paramètres biologiques sont également à prendre en compte de notre point de vue lorsque l'on souhaite travailler avec des microorganismes auto-fluorescents. Ces contraintes ou limites sont présentées ci-dessous.

#### 2. Limites, contraintes et optimisations liées aux micro-organismes auto-fluorescents

#### 2.1. Cas de métabolisme aérobie

Nos études dans le paragraphe précédent en adéquation avec les données de la bibliographie indiquent que l'O<sub>2</sub> joue un rôle important dans la maturation des protéines fluorescentes, notamment la Gfp. Heim *et al*, 1994, ont en effet montré que la transformation des micro-organismes anaérobies leur permettait de produire la protéine mais que celle-ci ne fluoresçait pas en l'absence d'oxygène. La fluorescence de ces micro-organismes apparaissait

néanmoins progressivement lorsqu'ils étaient soumis à un flux d'air. Nos propres expériences corroborent ce résultat et une étude spécifique de l'impact de l'oxygène sur la protéine Gfp ou sur les levures produisant la protéine Gfp a par ailleurs été menée dans ce travail.

Néanmoins, si l'aération de cultures de micro-organismes modifiés en suspension peut permettre d'activer la protéine Gfp, cette méthode est difficilement envisageable dans le cas d'agrégats, qui risqueraient alors d'être déstructurés.

Compte tenu de ces résultats, la méthodologie basée sur l'expression de protéines fluorescentes dans des micro-organismes comme marqueur d'une population ou rapporteur de l'expression d'un gène serait donc plus adaptée à des micro-organismes aérobies ou à des procédés dans lesquels l'oxygène n'est pas ou peu limitant.

# 2.2. Taux marquage levure

Lors des différentes cultures des levures recombinantes il est apparu que le marquage fluoresçant des levures n'était pas total. Il est compris entre 40 et 90 % en fonction des conditions de culture. Ce phénomène peut résulter de la diminution du nombre de copies du plasmide ou de sa perte, même lors de cultures dans des conditions qui devraient permettre son maintien. Le phénomène de perte de plasmide par les levures a déjà été mis en évidence (Guillán A *et al*, 1998). Il a aussi été mis en évidence précédemment que l'O<sub>2</sub> joue un rôle sur la fluorescence des levures, ceci a été mis en évidence lors de cultures sur milieu solide, pour lesquelles l'intensité de fluorescence et le taux des levures fluorescentes sont apparus plus élevés.

Une des solutions envisagées pour éviter la perte du fragment codant porté par le plasmide, consisterait à réaliser une transformation intragénomique. La méthode repose sur l'insertion d'une petite séquence d'ADN, appelée « cassette » directement dans le génome du micro-organisme d'intérêt.

Pour *E. coli*, nous avons observé ce phénomène sur certaines souches (notamment *E. coli* JM109), mais nous avons contourné cette difficulté par l'utilisation d'une autre souche plus stable *E. coli* BL21 (DE3) star.

Néanmoins, une construction intragénomique peut être intéressante si l'on souhaite mettre en œuvre ces souches en culture mixte avec d'autres souches bactériennes et s'affranchir ainsi des facteurs ou pression de sélection une fois les souches transformées et isolées.

#### V – Discussion sur la construction et la caractérisation des souches recombinantes

L'objectif de notre étude était de pouvoir analyser la structure et l'organisation d'agrégats biologiques mixtes *in-vivo* et parfois *in-situ* et de suivre leur évolution au cours du temps et en fonction des conditions environnementales.

Pour répondre à cet objectif, notre choix s'est porté sur l'utilisation de micro-organismes qui ont été spécifiquement modifiés pour exprimer des protéines fluorescentes.

Différentes problématiques se posent alors :

- La modification génétique a-t-elle induit une modification du comportement cinétique des souches modifiées par rapport aux souches parentales ?
- Les facteurs environnementaux sont ils susceptibles de moduler l'expression de ces protéines fluorescentes en fonction de la construction et des spécificités métaboliques des micro-organismes hôtes ? Quels sont les temps caractéristiques de la maturation de ces protéines et les cinétiques d'expression des protéines fluorescentes en fonction de la construction génétique et des spécificités des micro-organismes hôtes ?

L'impact de la modification génétique sur le comportement cinétique et le métabolisme est généralement analysé au travers de paramètres clés que sont le taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ) et les rendements de biomasse ou de métabolites produits par rapport au substrat consommé ( $Y_{X/S}$ ,  $Y_{P/S}$ ), ceci afin de valider l'utilisation du micro-organisme modifié comme modèle du micro-organisme sauvage.

Les expériences réalisées dans notre étude ont montré que la modification génétique choisie (plasmidique) et l'expression de protéines fluorescentes n'ont pas entraîné de différences significatives ni sur les taux de croissance maximaux, ni sur les rendements, ceuxci étant similaires à ceux des souches sauvages quel que soit le modèle microbien choisi (levure ou bactérie). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres équipes s'intéressant à l'expression de protéines fluorescentes par des organismes modifiés (Vialette *et al.*, 2003 pour des souches d'*E. coli* ou De Wulf *et al.*, 2000, dans le cas de *S. cerevisiae*). Ces auteurs se limitent néanmoins à la comparaison des taux de croissance maximum ( $\mu_{max}$ ) mais ne précisent aucun résultat sur les rendements. Ainsi, Vialette *et al.*, 2003, ont montré que, dans un milieu riche et pour différentes conditions environnementales (température de pré-culture et de culture), les taux de croissance maximum de *E. coli* O157:H7 recombinants exprimant la protéine Gfp (plasmides réplicatifs) étaient similaires à ceux des souches sauvages parents (à +/- 5% selon les conditions environnementales). Ils observent également des phases de latence de durées identiques chez la souche sauvage et les trois souches recombinantes.

De Wulf *et al.*, 2000, ont également obtenu des taux de croissance maximum similaires pour la souche sauvage de *S. cerevisiae* MVY49.35 et la souche recombinante exprimant la protéine Gfp (à partir de différents plasmides réplicatifs dont le nombre de copies était variable), mais les valeurs obtenues de ces taux de croissance ne sont pas précisées dans l'article. Des résultats similaires ont pu être observés sur d'autres souches, comme des souches de *Pseudomonas* qu'elles aient été modifiées par insertion plasmidique (valeurs non précisées) (Bloemberg *et al.*, 1997) ou par insertion du gène de la Gfp dans le génome microbien (taux de croissance maximum similaires de 0,99 h<sup>-1</sup> pour les souches sauvages et modifiées) (Tombolini *et al.*, 1997).

Outre la conservation du potentiel de croissance des souches traduit par le taux de croissance maximal, certains auteurs indiquent également que la modification génétique n'a pas d'impact sur la morphologie des souches recombinantes, que ce soit sur l'aspect de colonies cultivées sur milieu gélosé (Tombolini *et al.*, 1997 ; Vialette *et al.*, 2003) ou sur la taille et la forme des cellules étudiées respectivement en cytométrie de flux (Tombolini *et al.*, 1997) ou en microscopie (De Wulf *et al.*, 2000).

Néanmoins, d'autres auteurs ont montré que des souches recombinantes ne présentant pas de différences significatives sur les cinétiques de croissance (durée de phase de latence, temps de génération) avec les souches sauvages parentes, pouvaient avoir un comportement physiologique différent, comme par exemple au niveau de leur sensibilité aux antibiotiques (Allison & Sattenstall, 2007). En effet, dans cette étude, deux souches de E. coli dans lesquelles a été inséré un plasmide réplicatif, et une souche de E. coli ainsi qu'une souche de Pseudomonas transformées par insertion du gène de la Gfp directement dans le génome, sont apparues moins sensibles que les souches sauvages aux antibiotiques de la famille des βlactames. Ce résultat a été justifié par le fait que les souches avaient été construites avec l'incorporation d'un gène de résistance à l'ampicilline (l'ampicilline appartenant aux  $\beta$ lactames), ce qui a diminué leur sensibilité à ce type d'antibiotique. Néanmoins, ces mêmes souches recombinantes ont présenté une sensibilité accrue aux antibiotiques appartenant à d'autres familles que les β-lactames, tels que la gentamicine, la tobramycine ou la ciprofloxacine. Bien que les auteurs n'apportent pas d'explications précises, ils suggèrent que la réplication du gène de la protéine ou du plasmide pourrait créer un stress ou perturber les fonctions métaboliques, ou encore que les protéines Gfp formeraient des corps d'inclusion insolubles qui altèreraient la membrane cellulaire, facilitant ainsi la pénétration et l'action de molécules antimicrobiennes comme les antibiotiques.

Dans notre étude, l'ampicilline étant le seul antibiotique utilisé dans le milieu de culture, il n'y aura pas de phénomène d'interférence avec d'autres antibiotiques pouvant être mis en évidence comme dans les travaux de Allison & Sattenstall, 2007.

Cependant, même si dans la majorité des cas le comportement des souches modifiées reste identique, certains auteurs ont mis en évidence que l'expression de protéines fluorescentes entraînait une diminution du taux de croissance ou du rendement de biomasse des souches recombinantes. Cette diminution pourrait être liée à une expression importante de protéine, à la construction plasmidique (taille de plasmide, nombre de copies...) qui seraient consommateur d'énergie (augmentant ainsi artificiellement le rendement Y<sub>ATP/X</sub>, avec X pour la biomasse par rapport à la stœchiométrie chez la souche sauvage), et/ou à une sensibilité importante des souches à la production de protéines fluorescentes (Lissemore *et al.*, 2000 ; Rang *et al.*, 2003 ; Oscar *et al.*, 2006). Dans ce type d'approche, il est donc indispensable avant toute utilisation de la souche modifiée de vérifier son comportement par rapport à la souche native.

La stratégie de construction de micro-organismes auto-fluorescents mise en œuvre nous a également amené à évaluer l'impact de facteurs environnementaux sur la modulation de l'expression des protéines fluorescentes en fonction de la construction et des spécificités métaboliques des micro-organismes hôtes. Les facteurs environnementaux auxquels nous nous sommes intéressés sont liés à la concentration en oxygène dissous et aux substrats (type de substrat, concentration), ces derniers étant corrélés à la construction génétique (promoteurs) et aux spécificités métaboliques des souches.

Ainsi, le rôle essentiel de l'oxygène dissous aussi bien sur l'intensité de fluorescence de la protéine Gfp extracellulaire qu'intracellulaire, que se soit pour des levures dans de l'eau physiologique ou en culture a été mis en évidence.

La bibliographie rapporte de façon générale un effet lié à l'oxygène, cependant il pourrait s'agir également de l'action sur les protéines intracellulaires de formes actives dérivées de l'oxygène. Dans tous les cas, nos essais ont notamment mis en évidence que l'aération était nécessaire à la maturation de la protéine Gfp, puisque les expériences ont montré que même si elle ne fluoresçait pas ou peu pour des levures cultivées en conditions d'oxygène limitant, la protéine était tout de même produite, puisqu'un environnement aéré permet d'induire leur fluorescence, c'est-à-dire leur maturation. Ces résultats sont en accord

avec ceux de Heim, et *al.*, 1994, Scott *et al.*, 1998 et Zhang *et al.*, 2005, qui ont mis en évidence qu'en absence d'oxygène, la protéine Gfp ne fluoresçait pas, qu'elle soit intracellulaire ou extraite de la cellule. Ces chercheurs ont en effet démontré la présence de la Gfp par la réalisation de gel d'électrophorèse (Heim *et al.*, 1994 ; Zhang *et al.*, 2005) ou par la méthode dite AFR, que nous avons utilisée, afin de démontrer et/ou quantifier la présence de la protéine Gfp (Scott *et al.*, 1998 ; Zhang *et al.*, 2005).

Pour des levures en culture, nous avons quantifié l'intensité de fluorescence des cellules en fonction des conditions d'aération maîtrisées et quantifiées. Il a été mis en évidence que les suspensions de levures présentent une fluorescence 2,5 fois plus élevée lorsque la pression partielle en oxygène dissous correspond à 90 % de la valeur de la saturation (à l'air) par rapport à une culture conduite à une pO<sub>2</sub> fixée à 1%. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Perez-Arellano & Perez-Martinez, 2003, chez un autre micro-organisme, une souche de *Lactococcus casei*, pour laquelle les quantités de protéine Gfp mature fluorescente mesurées en conditions dites « aérées » étaient 4,5 fois supérieures aux quantités de protéines matures fluorescentes en conditions dites « non-aérées » (quantifiée par fluorimétrie d'après une gamme étalon de concentration connue en protéine Gfp purifiées matures). Néanmoins, les conditions dites « aérées » et « non aérées » correspondent à des cultures réalisées en fiole d'Erlenmeyers agités ou non agités et la valeur de la pression en oxygène dissous n'est pas mesurée. On peut supposer que l'oxygène est non limitant lorsque le milieu est agité et limitant dans l'autre cas.

Par ailleurs, les valeurs de fluorescence et les observations microscopiques réalisées sur les levures cultivées à une  $pO_2$  de 1 % montrent une fluorescence faible, mais non nulle, qui témoigne d'une certaine maturation des protéines, même si celle-ci n'est pas maximale. Très peu d'oxygène semble donc suffire pour permettre la maturation d'une partie des protéines Gfp.

Les auteurs cités précédemment, Perez-Arellano & Perez-Martinez, 2003, ont également observé que dans des conditions non-agitées, limitantes en oxygène, 12 % des protéines Gfp produites (quantifiées sur gel d'électrophorèse d'après une gamme de concentration connue) pouvaient être matures et ainsi fluorescer. Néanmoins, l'aération n'étant pas quantifiée, un lien direct entre le taux de protéines matures (protéines matures) et une teneur en oxygène dissoute est difficilement quantifiable.

Hansen *et al.*, 2001, à l'inverse, bien qu'ils n'aient pas quantifié l'intensité de fluorescence, ont quantifié les teneurs en oxygène dissous, et ont également montré sur des souches de *Streptococcus gordinii* que la fluorescence pouvait être détectée à de faibles

teneurs en oxygène dissous. En effet, à une concentration en oxygène dissous de 0,025 mg/L ( $pO_2$  d'environ 0,35 %), la souche ne présentait pas de fluorescence détectable en microscopie confocale, alors qu'à 0,1 mg/L ( $pO_2$  de 1,4 %), une augmentation progressive de l'intensité de fluorescence des bactéries était observée et se stabilisait après 40 minutes. Le facteur d'augmentation de la fluorescence n'était cependant pas quantifié, et les auteurs ne précisent pas si une valeur encore plus élevée de la  $pO_2$  aurait permis d'augmenter d'avantage la fluorescence.

La quantification à la fois de l'intensité de fluorescence et de la teneur en oxygène dissous a permis de mieux cibler la sensibilité de la souche aux conditions d'aération dans des conditions limitantes (micro-aérobiose) et non limitantes. Cette approche permet de définir des conditions optimales pour obtenir une expression et une maturation de la protéine permettant de visualiser les levures à l'échelle de la cellule.

L'aération étant donc apparue comme un élément intervenant dans la maturation des protéines fluorescente, nous avons évalué les temps caractéristiques de maturation des protéines fluorescentes intracellulaires ou extraites en fonction des conditions d'aération. Pour cela, nous avons caractérisé et quantifié la cinétique de maturation de la protéine Gfp extraite de levure ou intracellulaire (chez la levure) dans un environnement aéré, c'est-à-dire en présence d'oxygène ou de formes réactives de l'oxygène.

Les essais ayant été réalisés dans de l'eau physiologique à pH7, les phénomènes liés à la croissance cellulaire (dans le cas de la protéine intracellulaire) qui modifieraient la quantité d'oxygène dissous sont ainsi limités.

Les résultats obtenus dans le cas de la protéine extraite ont montré que la maturation de la protéine Gfp suivait une cinétique d'ordre 1, avec une constante de temps  $k_1 = 0,28 \text{ h}^{-1}$ . Ce résultat apparaît en accord avec les travaux d'Heim *et al.*, 1994 qui décrit lui aussi une cinétique d'ordre 1 avec une constante de temps  $k_1 = 0,24 \text{ h}^{-1}$  (+/- 0,06)).

Dans le cas de levures en suspension, la cinétique obtenue s'est avérée plus lente. En effet, le temps de maturation de la protéine alors intracellulaire semble être de quelques heures, avec une phase de latence d'environ 10 heures (pour rappel le temps de maturation pour la protéine extracellulaire était de l'ordre de quelques minutes). Ce résultat est en accord avec celui de De Wulf *et al.*, 2000, qui ont observé un temps de maturation de trois heures environ pour des levures en culture, mais diffère néanmoins des observations d'Heim *et al.*, 1994. Ces auteurs ont en effet obtenu des cinétiques de maturation identiques que la protéine Gfp chez *E. coli* soit intra ou extracellulaire. On peut supposer que le mécanisme de maturation serait différent selon l'espèce microbienne considérée et pourrait être liée aux

spécificités des enveloppes cellulaires et à leur propriété de transfert. Cette hypothèse semble renforcée par les résultats de Scott *et al.*, 1998, qui ont constaté une augmentation de la fluorescence plus rapide et plus homogène au niveau de la répartition des cellules fluorescentes au sein d'une colonie de *E. coli* (Gram -) sur milieu gélosé. Après 3h 50 % des bactéries ont présenté une fluorescence qualifiée de « normale » par les auteurs, tandis que 5h ont été nécessaire pour obtenir le même résultat pour une souche de *Lactococcus lactis* (Gram +). Dans cette étude, les souches cultivées sur milieu solide sous hotte anaérobie avaient été exposées à l'air pendant des temps variables et la fluorescence.

L'étude de la cinétique de maturation de la protéine fluorescente chez *S. cerevisiae* (extraite ou en intracellulaire sur des cellules non cultivées) a permis de mettre en évidence et de quantifier un temps minimum nécessaire à la maturation de la protéine Gfp. Partant de ce constat qui met en évidence le rôle fondamental de l'environnement sur la fluorescence, et connaissant les spécificités des promoteurs présents sur les plasmides permettant l'expression de protéines fluorescentes chez la levure et chez la bactérie, nous nous sommes attachés à mieux comprendre le fonctionnement de ces promoteurs. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au fonctionnement des promoteurs *ADH1* et *lac* en aérobie. Pour cela, l'influence de la source carbonée (nature, concentration), susceptible d'agir au niveau de la modulation de l'induction des promoteurs et donc de l'expression des protéines fluorescentes, a été étudiée lors de cultures en réacteurs en mode discontinu (batch).

L'analyse de la cinétique de l'expression des protéines fluorescentes sous le contrôle du promoteur *ADH1* chez les levures *S. cerevisiae* en culture discontinue sur glucose à 20 g/L a permis de mieux comprendre le fonctionnement de ce promoteur en mode aérobie. La culture réalisée en conditions d'aération non limitantes montre une augmentation de la fluorescence spécifique des levures pendant la phase de croissance, correspondant à une induction du promoteur *ADH1*, puis une stabilisation en phase stationnaire, correspondant à l'arrêt de l'induction du promoteur, permettant d'atteindre une fluorescence spécifique d'environ 100 UA/(g.L<sup>-1</sup>) de biomasse (masse sèche). Cette valeur traduit un niveau d'expression relativement important de protéines qui permet de bien visualiser les levures individuellement. D'un point de vue qualitatif, ces résultats sont en adéquation avec les travaux de Park *et al.*, (2006) et Edwards & Wandless (2009) qui ont pu visualiser en microscopie à épifluorescence des levures recombinantes exprimant des protéines

fluorescentes sous le contrôle du promoteur ADH1. Les résultats ont montré. Ces résultats sont également en accord avec la bibliographie qui indique que lors de cultures sur glucose, le promoteur ADH1 est activé en phase exponentielle de croissance, et inhibé en phase stationnaire (Denis et al., 1983; Ruohonen et al., 1995). Ainsi, Ruohonen et al., 1995, montrent que l'arrêt de l'induction du promoteur ADH1, qui se traduit par un arrêt de la synthèse de la protéine sous le contrôle de ce promoteur, est atteint six à huit heures avant la fin de la phase de croissance. Les auteurs suggèrent alors que la présence d'éthanol, plus encore qu'un épuisement de la concentration en glucose, est responsable de la diminution de l'activité du promoteur. Ces résultats corroborent nos propres résultats, puisque l'augmentation de la fluorescence spécifique s'arrête après sept à huit heures avant la fin de la phase de croissance. Nos résultats montrent également qu'après environ 10 heures en limitation totale de glucose, l'intensité de fluorescence augmente à nouveau, traduisant une reprise de l'activité du promoteur ADH1. Cette augmentation semble couplée à la consommation de l'éthanol produit, et est associée à une augmentation de la consommation en oxygène (augmentation des niveaux d'aération et d'agitation pour maintenir la  $pO_2$  à 90%). Ces résultats vont cependant à l'encontre des postulats de certains chercheurs quant à la régulation du promoteur ADH1 présent chez la levure. En effet, le promoteur natif ADH1 chez la levure serait réprimé en phase stationnaire de croissance (Denis et al., 1983 ; Ruohonen et al., 1991), un autre gène serait alors induit, codant pour une autre alcool déshydrogénase (ADH2), qui convertit l'éthanol en acétaldéhyde. Ruohonen et al., 1991 ont étudié la séquence du promoteur natif ADH1 de la levure et ont montré qu'en délétant certaines parties en début de séquence de ce promoteur, l'induction pouvait avoir lieu en phase stationnaire de croissance lors de la re-consommation de l'éthanol produit, de manière similaire à celle observée dans notre étude. Selon ces auteurs, la séquence délétée correspondrait à un site de fixation de l'ADR1 (Alcohol Dehydrogenase Regulator) (Shunter et al., 1986). Cet inducteur ADR1 est réprimé sur glucose et actif en limitation de glucose, induisant ainsi le gène ADH2 (Denis et al., 1981; Shunter et al., 1986). Cet élément (ADR1) pourrait donc également jouer un rôle de répresseur au niveau du promoteur natif ADH1 présent dans le génome de la souche, en se liant sur le site de fixation mis en évidence par Shunter et al., (1986).

L'induction du promoteur *ADH1* par le glucose étant usuellement admise, quelle peutêtre l'influence de la concentration en glucose du milieu sur l'expression de la protéine fluorescente. Pour répondre à cette question, deux concentrations initiales en glucose du milieu, 20 et 50 g/L, ont été étudiées. Ces expériences ont montré que la fluorescence spécifique des levures augmentait avec la concentration initiale en substrat. En conditions d'aération limitante (pO<sub>2</sub> 1%), le facteur multiplicatif atteint 1,6 à 2 entre la culture réalisée à 20 g/L de glucose et celle réalisée à 50 g/L. En conditions d'aération non limitante (pO<sub>2</sub> 90%), ce facteur multiplicatif n'est que de 1,2 entre des cultures réalisées à 20 g/L et à 50 g/L de glucose. Cette différence peut être due à un métabolisme variable en fonction des conditions d'aération (aérobie ou micro-aérobie), qui se traduit par une production d'éthanol plus importante à une pO<sub>2</sub> de 1 % (rendement  $Y_{EtOH/S} \approx 0.38$  g d'éthanol produit par g de glucose consommé) qu'à une pO2 de 90 % (rendement  $Y_{EtOH/S} \approx 0.25$  g d'éthanol produit par g de glucose consommé). L'augmentation de l'induction du promoteur ADH1 observée dans notre étude lorsqu'on augmente la concentration en glucose a également été observée par d'autres chercheurs. Ainsi, Ruohonen et al., 1995, ont mis en évidence l'influence de la concentration en glucose sur l'activité du promoteur ADH1 chez S. cerevisiae. Ces auteurs ont évalué l'activité spécifique du promoteur pour deux concentrations initiales de glucose de 20 et 130 g/L, grâce à la quantification de la production d'une enzyme, l' $\alpha$ -amylase, dont la séquence était placée en aval du promoteur. Bien que ces valeurs soient différentes de celles utilisées dans notre étude, les tendances obtenues semblent similaires. En effet, leurs expériences menées en fioles d'Erlenmeyer agitées (supposées donc en conditions aérobies), ont montré une production spécifique maximale de l'enzyme (mesurée par l'activité de l'enzyme produite/ g de biomasse) de 1,3 à 1,4 fois supérieure pour la culture réalisée à 130 g/L de glucose par rapport à celle réalisée à 20 g/L (Ruohonen et al., 1995). L'effet « stimulateur » de la concentration initiale du glucose est donc bien retrouvé et l'hypothèse avancée par les auteurs pour expliquer ce résultat est la présence d'un site de fixation de l'GCR1p. Cet élément est un activateur transcriptionnel de gènes glycolytiques. Il est régulé positivement par le glucose (Hiromi et al., 2005) et est connu pour permettre une transcription efficace du gène ADH1 (Santangelo & Tornow, 1990).

L'étude des conditions environnementales ( $0_2$  dissous et concentrations en substrat glucose ou produit (éthanol)) sur la production et la maturation de la protéine Gfp chez *S. cerevisiae* nous a conduit à identifier des paramètres clés qui influencent l'expression et/ou la maturation des protéines fluorescentes et de proposer des explications aux résultats obtenus.

Dans l'objectif d'étudier et d'analyser la structure et l'organisation d'agrégats biologiques mixtes levures-bactéries, ainsi que leur évolution au cours du temps, l'influence de certains facteurs clés doit être étudiée et quantifiée chez la bactérie *E. coli*. Ainsi, compte tenu des résultats obtenus chez la levure (induction de l'expression de la Gfp sur glucose, et
importance des conditions d'aération pour la maturation de la protéine) et en fonction de la construction réalisée chez la bactérie *E. coli* (promoteur lactose), l'influence de la nature de la source carbonée sur l'expression de la protéine fluorescente a été évaluée en réalisant des cultures discontinues (batch) sur substrat glucose, lactose ou sur un mélange glucose-lactose en aérobie.

Lors de la culture de la souche *E. coli* recombinante pDsRed-express, l'induction de l'expression de la protéine fluorescente est environ sept fois supérieure sur lactose que sur glucose comme seules sources de carbone. Ces résultats sont en adéquation avec les observations de Inada *et al.*, 1996 et Kuo *et al.*, 2003, qui montrent le rôle inhibiteur du glucose sur le promoteur *lac*, donc l'induction devient très faible en présence de glucose (ces auteurs ont pour la plupart quantifié la synthèse de  $\beta$ -galactosidase, enzyme sous le contrôle du promoteur *lac* dans le génome de la bactérie).

Dans notre étude, lors de la culture réalisée sur glucose seul, une intensité de fluorescence faible mais non nulle est mesurée, la valeur de fluorescence spécifique atteignant 100 UA/(g.L<sup>-1</sup>) de biomasse contre 700 UA/(g.L<sup>-1</sup>) de biomasse pour la culture réalisée sur lactose seul. Inada et al., 1996, comme Kuo et al., 2003, ont quantifié l'expression de la βgalactosidase chez des souches de E. coli et ont également montré une expression de l'enzyme faible mais non nulle lors de cultures sur glucose. Ainsi Inada et al., 1996, ont obtenu une augmentation de l'expression de la β-galactosidase d'un facteur d'environ 70 lorsque la souche est cultivée sur un milieu contenant du lactose comme seule source de carbone par rapport à une culture sur glucose seul. Dans notre étude, le facteur obtenu n'est que de sept. On peut alors supposer que la répression catabolique par le glucose serait moins forte ou efficace pour notre souche. L'observation en épifluorescence de la bactérie modifiée cultivée sur glucose seul vient renforcer cette hypothèse car dans les mêmes conditions d'acquisition (temps d'exposition au laser) que pour une culture sur lactose seul, la fluorescence induite est plus faible. Cependant, en augmentant le temps d'exposition, on peut tout de même visualiser les bactéries, même si le signal reste faible, ce qui montre que le promoteur lac n'est pas totalement inhibé lors d'une culture sur glucose comme seule source de carbone.

La souche de *E. coli* utilisée dans ce travail présente donc une fluorescence plus forte lorsqu'elle est cultivée sur le lactose comme seule source de carbone que lorsque la source de carbone est le glucose, même si elle apparaît moins sensible au phénomène de répression par le glucose que d'autres souches de la même espèce.

Le glucose étant cependant nécessaire pour l'induction du promoteur *ADH1* de la levure, et l'expression de la protéine fluorescente chez *E. coli* étant plus importante lorsque le lactose est utilisé comme source de carbone, nous nous sommes intéressées à l'expression de la protéine fluorescente chez *E. coli* en présence des deux sources de carbone glucose et lactose.

L'étude de la croissance de notre souche recombinante de *E. coli* lors de cultures sur substrat mixte glucose-lactose (glucose à 16,1 g/L soit 89 mM et lactose à 17,9 g/L, soit 52 mM) a montré une consommation simultanée des deux substrats, se traduisant par une croissance continue. La bibliographie mentionne pourtant que pour des cultures de *E. coli* réalisées sur substrat mixte glucose et lactose, on observe généralement un phénomène de diauxie : le glucose est consommé préférentiellement, la consommation du lactose nécessitant la synthèse de différentes enzymes supplémentaires (lactose perméase,  $\beta$ -galactosidase) ; ceci se traduisant par une croissance en deux temps (diauxie) (Monod J., 1965).

La consommation simultanée des deux sources de carbone et la croissance continue observées dans notre étude ont également été observées chez certaines souches de E. coli. Ainsi Loomis & Magasanik, 1967, ont isolé une souche insensible à la répression catabolique de l'opéron *lac* par le glucose du fait d'une mutation dans un gène de régulation du répresseur (lac I). Inada et al., 1996, ont observé le même phénomène sur une autre souche de E. coli mutée sur le même gène. Le génotype de la souche commerciale E. coli BL21 DE3 star ne mentionne pas ce type de modification, pourtant son comportement sur substrat mixte (croissance et consommation simultanée des substrats) semble correspondre à celui des souches de *E. coli* pour lesquelles la répression catabolique n'est pas totalement efficace. Une autre hypothèse peut être que la concentration en lactose dans le milieu a permis de lever en partie la répression du promoteur lac par le glucose. En effet, différentes équipes ont pu montrer qu'une concentration élevée en inducteur par rapport au glucose pouvait lever la répression catabolique lors de culture sur substrats mixtes glucose-lactose (Loomis & Magasanik, 1967 ; Inada et al., 1996). Loomis & Magasanik, 1967, ont observé cette levée de la répression pour des concentrations en glucose de 1 mM (soit environ 0,18 g/L) et lactose à 80 mM (soit environ 27 g/L), alors que le phénomène de diauxie avait été observé pour des cultures réalisées avec une concentration de glucose identique, mais avec une concentration de lactose de 10 mM. Les concentrations utilisées dans notre étude sont de 52 mM pour le lactose et 89 mM pour le glucose, ce qui donne une concentration de glucose plus élevée que celle utilisée par Loomis & Magasanik, 1967, mais un ratio d'environ 0,58/1 (lactose/glucose) beaucoup plus faible que celui nécessaire pour lever la répression catabolique dans l'étude de

ces derniers auteurs (80/1 pour lactose/glucose), ce qui amènerait à penser que notre souche est peu sensible à la répression catabolique par le glucose.

Inada *et al.*, 1996, ont montré que l'ajout de 0,5 mM d'IPTG, un analogue structural du lactose, mais non métabolisable par *E. coli*, permettait également de lever de la répression catabolique par le glucose sur une souche de ces souches non modifiée (milieu contenant 2,2 mM de glucose et 5,8 mM de lactose), le phénomène de diauxie n'étant ainsi plus observable, alors qu'il l'était dans les mêmes conditions sans IPTG. Ce composé n'a cependant pas été utilisé pour nos cultures en réacteurs, mais les résultats observés par Inada *et al.*, 1996 illustrent le fait que l'inhibition par le glucose particuliers.

Une autre conséquence de la levée de la répression catabolique est visible également sur la cinétique de production de la protéine fluorescente. En effet, son expression sous contrôle du promoteur lac ne semble pas inhibée par la présence de glucose, et est induite dès le début de la culture. Ainsi, l'intensité de fluorescence spécifique obtenue, comprise entre 300 et 400 UA/(g.L<sup>-1</sup>) de biomasse en phase de croissance, et 800 à 900 UA/(g.L<sup>-1</sup>) de biomasse en phase stationnaire, permet de visualiser les cellules individuellement. Ces résultats vont à l'encontre des travaux de Perez-Arellano & Perez-Martinez, 2003, qui ont montré qu'une souche de Lactobacillus casei, transformée par un plasmide portant le gène de la Gfp sous contrôle du promoteur lactose et cultivée sur substrat mixte glucose-lactose, ne présentait pas d'expression détectable de la protéine Gfp. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la répression catabolique n'a pas lieu, et que l'expression de la protéine fluorescente, comme la consommation du lactose, débute dès le début de la croissance. Inada et al., 1996, ont montré une cinétique de production similaire à celle de notre protéine fluorescente pour une enzyme sous le contrôle du promoteur lactose (β-galactosidase) chez des souches cultivées sur un mélange glucose-lactose. L'une de ces bactéries présentait une mutation sur le gène du répresseur (Lacl) et pour l'autre ne présentant pas de mutation, l'ajout d'IPTG a permis la levée de la répression catabolique.

Nos résultats illustrent que sur substrat mixte lactose-glucose dans un ratio molaire de 0,58/1 (52 mM lactose/ 89 mM glucose), l'induction de la protéine fluorescente (DsRedexpress) est possible et se traduit par une synthèse de protéine permettant une visualisation des bactéries individuellement. Par rapport à la littérature, ces résultats suggèrent une levée de la répression catabolique du promoteur *lac* pour notre souche en présence des deux sucres dans les conditions opératoires utilisées. Ainsi, les cultures de nos souches de *E. coli*  recombinantes pourront être réalisées sur substrat mixte sans qu'un effet inhibiteur du glucose ne bloque l'expression de la protéine sous le contrôle du promoteur lactose lors de la consommation du glucose, comme c'est le cas chez des souches présentant le phénomène de diauxie (Monod, 1965 ; Inada *et al.*, 1996).

# **VI-** Conclusions et Perspectives

Les différentes étapes nécessaires de notre point de vue pour l'analyse quantitative d'agrégats biologiques mixtes mettant en œuvre des micro-organismes fluorescents sont représentées sur le logigramme suivant (Figure 65):



en œuvre des micro-organismes fluorescents

Une fois toutes ces étapes réalisées et les paramètres définis, la conception de systèmes pour la réalisation d'agrégats biologiques mixtes et leurs analyses qualitative et quantitative pertinente *in vivo* et/ou *in situ* dans des conditions maîtrisées ont pu être réalisée et fera l'objet du chapitre suivant.

# Résultats Chapitre II : Etude d'agrégats biologiques de type dépôts

#### I – Contexte, objectifs et conditions expérimentales

Cette partie, en s'appuyant sur l'étude d'un dépôt de filtration, s'est plus particulièrement attachée à analyser l'influence d'une contrainte hydrodynamique sur la structure et l'organisation de micro-organismes.

La filtration, très largement utilisée en industrie pour retenir sélectivement des particules et / ou des micro-organismes, peut être réalisée en mode tangentiel ou frontal. Dans ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la filtration frontale de suspensions de micro-organismes dans laquelle l'écoulement moyen est unidirectionnel, perpendiculaire à la membrane. Au cours de cette opération, l'accumulation des micro-organismes entraine la formation d'un dépôt qui peut se traduire par une diminution du flux de perméation ou une augmentation de la pression transmembranaire selon les conditions opératoires imposées (pression constante ou débit constant).

Afin d'apporter des éléments permettant de mieux comprendre les mécanismes de colmatage de la membrane liés à cette accumulation de micro-organismes, l'objectif a été d'analyser conjointement les caractéristiques morphologiques du dépôt (épaisseur, porosité, organisation...) et la vitesse de filtration moyenne.

L'approche choisie qui repose sur la visualisation directe des micro-organismes vivants dans le dépôt s'avére originale et permet d'envisager une étude *in situ* et *in vivo* de la structure globale (macroscopique) ainsi que de l'organisation locale (microscopique) du dépôt. En effet, les spécialistes de filtration membranaire utilisent classiquement des argiles, des nanoparticules, des particules calibrées ou des suspensions levuriennes en milieu non prolifératif pour simuler un milieu biologique et sa clarification par séparation membranaire. Néanmoins, peu de travaux font état de l'évolution des caractéristiques de filtration pendant une réelle culture biologique.

Deux micro-organismes modèles (*S. cerevisiae* et *E. coli*) ont donc été choisis pour cette étude en raison de leurs différences de taille, de morphologie et de structuration de leur enveloppe cellulaire, pouvant les rendre plus ou moins déformables sous contraintes.

Pour visualiser et étudier la morphologie des dépôts et l'organisation des microorganismes, les techniques optiques classiques reposant sur des colorations spécifiques, fluorescentes en particulier, présentent différentes limites et des biais qui ont été décrits dans l'étude bibliographique (II-2). En particulier, les préparations et les traitements nécessitent une « manipulation » des dépôts pouvant entrainer une modification de leur structure initiale (modification des conditions hydrodynamiques, étapes de coloration, efficacité de marquage...). La stratégie proposée dans ce travail qui repose sur l'utilisation des microorganismes auto fluorescents précédemment construits, présenterait de nombreux avantages :

- elle ne nécessite ni manipulation du dépôt, ni traitement chimique pour son marquage et elle permet une analyse directe non-destructrice *in vivo*, *in situ*. La possibilité de faire des acquisitions à des temps différents pourrait également permettre d'étudier la dynamique de formation du dépôt.
- elle permettrait d'étudier à la fois la structure globale du dépôt (épaisseur, porosité), mais également dans le cas d'un dépôt mixte, la répartition spatiale des espèces au sein de ce dernier en fonction de l'épaisseur (z).

Afin d'évaluer la pertinence de la stratégie et d'étudier principalement l'impact de la morphologie des microorganismes sur le procédé de microfiltration, des conditions modèles simplifiées ont été choisies :

- L'influence de la croissance a été limitée en centrifugeant les suspensions cellulaires en phase stationnaire de croissance (après prodution des protéines fluorescentes, la persistance de la fluorescence sur toute la durée des expériences ayant été vérifiée) et en remettant en suspension les culots dans de l'eau physiologique (NaCl 0,9 %) pour éliminer les substrats résiduels.
- L'influence de composés exopolymériques dans l'environnement des cellules microbiennes a été limitée grâce au rinçage (les exopolymères étant connus pour être des composés excrétés par *E. coli,* mais pas chez *S. cerevisiae*)
- L'hydrodynamique a été simplifiée grâce à l'utilisation d'un mode de filtration frontale, pour limiter les phénomènes de cisaillement impliqués dans l'érosion des dépôts, qui peut être observée en filtratino tangentielle.

Les différentes expériences qui ont été menées sont présentées ci-dessous, et dans le tableau 16 :

- Expériences A : Filtration d'une suspension mono-espèce de levures S. cerevisiae
  PJ69-4A pYGfp exprimant la protéine Gfp (green fluorescent).
- Expériences B : Filtration d'une suspension mono-espèce de bactéries *E. coli* BL21
  DE3 star pDsRed-express, exprimant la protéine DsRed-express.
- Expériences C : Filtration d'une suspension mixte de bactéries et de levures, contenant les souches *S. cerevisiae* PJ69-4A pYGfp exprimant la protéine Gfp et *E. coli* BL21 DE3 star pDsRed-express, exprimant la protéine DsRed-express.

Expérience	Le	evures	Bactéries		
	Masse déposée Taux de marquage		Masse déposée	Taux de marquage	
	(mg)	(%)	(mg)	(%)	
A1	24,96 +/- 0,21	84,7 % +/- 0,9	0	-	
A2	27,8 +/- 0,4	75,6 % +/- 2,5			
B1	0	-	24,87 +/- 0,09	100 %	
B2	0	-	26,2 +/- 0,08	100 %	
C1	12,38 +/- 0,39	31,1 % +/- 3,2	12,74+/- 0,09	100 %	
C2	13,81 +/- 0,47	83 % +/- 2	13,1 +/- 0,04	100 %	

<u>**Tableau 16 :**</u> Masses de micro-organismes déposées et taux de marquage au cours des différentes expériences réalisées

Un échantillon de suspension cellulaire est également prélevé pour réaliser les étalonnages préliminaires nécessaires au réglage des paramètres d'acquisition du microscope confocal (gain et offset) afin d'optimiser la visualisation des micro-organismes fluorescents à partir d'observations sur lames (micro-organismes individualisés) et dans des dépôts « étalons » réalisés avec ces mêmes micro-organismes.

Des exemples de paramètres d'acquisition sont déterminés pour différents échantillons témoins et présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 17).

		Réglages à		Réglages à l'acquisition sur	
		l'acquisition sur lames		dépôts	
Expérience		Gain	Off set	Gain	Off set
A1	levures	777,5	-0,5	777,5	-0,5
B1	bactéries	652,7	0	424,1	-19,6
C1	levures	853,46	-39,1	853,46	-39,1
	bactéries	652,7	0	424,1	-19,6

Tableau 17 : Exemple de réglage des paramètres d'acquisition

Les essais mettent en évidence l'existence de variations dans les réglages sélectionnés pour l'observation des levures qui s'expliquent par le fait que ces expériences ont été réalisées à partir de différentes cultures de levures pour lesquelles les taux de marquage sont très variables ; de 31% à 85%, selon les conditions opératoires. Notamment lors de cultures en fioles d'Erlenmeyer, l'aération ne peut pas être correctement contrôlée et maîtrisée, or,

comme cela a été vu au chapitre précédent (cf chapitre I résultats paragraphe I-1.1.4.), l'oxygène joue un rôle important sur la maturation des protéines Gfp et donc sur l'intensité du signal de fluorescence, rendant plus difficile la visualisation des levures lorsque ce composé est limitant.

De plus, la densité parfois très importante de certains dépôts, essentiellement dans le cas des dépôts bactériens, nécessite une modification de ces conditions d'acquisition afin de maintenir une bonne visualisation des micro-organismes au sein des structures. Les paramètres d'acquisition seront ainsi systématiquement précisés pour chaque expérience. Néanmoins, afin de pouvoir suivre l'évolution d'un dépôt soumis à différentes pressions transmembranaires, les paramètres sont maintenus identiques pour toutes les acquisitions qui seront effectuées au cours de la même expérience à des pressions croissantes.

Pour une même série d'expériences, les dépôts sont tous examinés dans les mêmes conditions d'observation (objectif X40 et zoom X2) et le bruit est réduit lors de l'acquisition en moyennant deux images pour chaque plan z. Le choix de l'objectif est limité par la profondeur de la cellule (distance entre membrane et lamelle). Ainsi, certains objectifs, bien que permettant un plus fort grossissement ou une meilleure résolution, ne peuvent être utilisés dans cette configuration expérimentale.

## II - Etude des caractéristiques morphologiques et des propriétés des dépôts

#### 1. Epaisseur

Les potentialités de cette méthode d'analyse de l'épaisseur ont été évaluées à partir de dépôts modèles générés avec des masses croissantes de bactéries en suspension déposées sur des membranes de filtration Minisart 0,2  $\mu$ m (Sartorius) par filtration sous vide. Les conditions d'observation des dépôts ainsi réalisés sont les suivantes (Tableau 18).

	Gain (V)	Offset (%)
bactéries	601	-9,1

Tableau 18 : Valeurs des paramètres d'acquisition gain et offset.

Des dépôts correspondant à des masses sèches de bactéries comprises entre 9 et 60 mg (9, 15, 24, 45 et 60 mg) ont ainsi été constitués, leurs épaisseurs théoriques (en supposant qu'un gramme de biomasse sèche donne lieu à 5 grammes de biomasse humide (4 g d'eau et 1 g de biomasse sèche) et que le taux de vide est de 26%) allant d'environ 25  $\mu$ m à 170 $\mu$ m. Le traitement des images acquises pour ces structures a montré que, quelle que soit la masse déposée, dans les conditions d'acquisition et d'analyse qui sont apparues optimales, aucune épaisseur supérieure à 25  $\mu$ m n'a pu être mesurée. Dans ces essais, il semble donc qu'au-delà d'une certaine épaisseur, il n'y ait pas proportionnalité entre la masse déposée et la mesure réalisée. Néanmoins, en augmentant le gain à 650 V au lieu de 601V, des profondeurs supérieures de 25 à 30  $\mu$ m ont pu être détectées. Cependant, dans ces conditions une saturation du signal apparaît dans le cœur du dépôt.

Les différents dépôts de levures, de bactéries ou mixtes (tableau 16) réalisés dans la cellule de filtration à différentes pressions transmembranaires ont été observés directement dans le dispositif. La reconstitution en trois dimensions de ces dépôts à partir des images acquises en direct permet d'avoir une vue d'ensemble des structures formées. Les paramètres d'acquisition sont ceux définis dans le tableau 17, sur les dépôts des expériences A1 et B1 et C1. L'épaisseur de la coupe optique (pas en z) sélectionnée lors de l'acquisition est de 0,6  $\mu$ m, ce niveau de définition est satisfaisant pour les levures mais il est moins précis pour l'analyse des bactéries compte-tenu de leur taille. En outre, la précision des mesures d'épaisseur est de l'ordre de 1,2  $\mu$ m (2 plans) soit l'ordre de grandeur de la dimension des bactéries. Un exemple de reconstitution d'images en 3D des dépôts de l'expérience A1 et B1 est présenté sur la figure suivante (Figure 66).



**Figure 66 :** Reconstructions en trois dimensions de dépôts de levures (à gauche) et de bactéries (à droite) lors de filtrations réalisées à une pression transmembranaire de 30 mbars (1 unité = 1 coté de petit carré = 18,7 µm)

Les conditions de traitement d'images (valeur d'intensité seuil minimal du voxel) sont données dans le tableau ci-dessous (Tableau 19).

	Valeurs seuil minimal du voxel
levures	39
bactéries	80

Tableau 19 : Valeurs d'intensité seuil minimal des voxels analysés

Différents facteurs peuvent affecter la justesse des mesures réalisées :

- les conditions d'observation, qui ont été sélectionnées pour permettre d'étudier l'organisation interne des dépôts formés (tous les micro-organismes étant déposés), peuvent induire une sous estimation des épaisseurs,
- le réglage du gain, choisi pour minimiser la saturation à l'intérieur du dépôt, peut pénaliser la détection des cellules encore en suspension au dessus du dépôt,
- pour les levures, l'épaisseur peut être sous estimée lorsque le taux de marquage n'est pas suffisamment important.

Néanmoins, les conditions de réglage ne varient pas au cours de l'acquisition lorsque les conditions de pression varient, et les micro-organismes ne présentent pas de phénomènes de « bleaching », les images peuvent donc être utilisées pour comparer certaines caractéristiques des dépôts en fonction de la pression transmembranaire, ou PTM, appliquée.

L'acquisition est réalisée sur une zone sélectionnée sur la base d'un « repérage » rapide réalisé au préalable. Les épaisseurs « mesurables » des dépôts sont estimées en considérant la distance entre les zones pour lesquelles un signal de fluorescence correspondant à l'une ou l'autre des espèces microbiennes peut être détecté. Ces seuils correspondent donc aux plans supérieurs et inférieurs limites pour lesquels la surface recouverte détectée passe d'une valeur nulle (pas de signal = pas de micro-organisme) à une valeur non-nulle (signal = présence de micro-organismes).

Un exemple de la méthode d'estimation de l'épaisseur pour un dépôt mixte à une pression transmembranaire de 150 mbars est illustré dans le tableau suivant (Tableau 20). Les cases grisées représentent les plans focaux supérieurs ou inférieurs pour lesquels un signal de fluorescence issu de l'une ou de l'autre des souches a été détecté dans les conditions de réglage utilisées. Lors de l'analyse d'image, les valeurs d'intensité seuils inférieurs pour les pixels/voxels sont celles indiquées dans le Tableau 19.

		Surface recouverte par le	Surface recouverte par le
Numéro de		signal « rouge » issu des	signal « vert » issu des
plan focal	Epaisseur	bactéries	levures
z	correspondante en $\mu m$	μ <b>m</b> 2	μ <b>m</b> 2
5	3	0	0
10	6	0	0
14	8,4	0	0
15	9	0	7,5
20	12	6,03	118,3
21	12,6	19,45	246,3
55	33	26701,7	48,2
58	34,8	1159,3	16,6
59	35,4	173,8	0
60	36	21,7	0
61	36,6	4,9	0
62	37,2	0	0

Tableau 20 : Surfaces recouvertes par les différents signaux de fluorescence en fonction du plan z analysé

A partir des images acquises pour trois expériences A1, B1 et C1, les épaisseurs qui peuvent être analysées pour les trois dépôts ont été évaluées à différentes valeurs de pression transmembranaire comprises entre 15 et 334 mbars (Tableau 21).

Levures		Bactéries		Mélange levures/bactéries	
Pression transmembranaire (mbars)	Epaisseur (µm)	Pression transmembranaire (mbars)	Epaisseur (µm)	Pression transmembranaire (mbars)	Epaisseur (µm)
15	31,2	20	27	28	30
155	30,6	135	30,6	116	27,6
319	31,2	334	30	296	25,8

**Tableau 21 :** Evaluation des épaisseurs mesurables pour les trois dépôts à différentes PTM à partir de l'analyse d'images réalisé à l'aide du logiciel Volocity®: levures (A1), bactéries (B1), mélange levure/bactéries (C1)

Quelles que soient les expériences, lorsque la pression transmembranaire (PTM) augmente, les variations des épaisseurs mesurables estimées à partir de l'analyse des images sont peu importantes. L'épaisseur maximale qui peut être analysée est de l'ordre de 30µm.

Qu'il s'agisse du dépôt de levures (expérience A) ou de celui de bactéries (expérience B), les variations d'épaisseurs accessibles lorsque la pression augmente n'apparaissent pas significative compte tenu de l'erreur de mesure expérimentale  $(1,2 \ \mu m)$ .

Dans le cas de la bactérie, l'épaisseur mesurée à la valeur de pression transmembranaire la plus faible est cependant inférieure à celles mesurées à des pressions supérieures. On peut supposer que pour cette première prise d'image, la totalité des bactéries n'est pas encore déposée et que les bactéries en suspension ne peuvent pas être détectées dans les conditions d'acquisition qui ont été sélectionnées. En effet, dans les premières minutes de l'expérience (réglage des paramètres opératoires), les micro-organismes doivent principalement être soumis à des phénomènes de décantation et, compte tenu des différences de tailles des micro-organismes, les levures sont susceptibles de décanter à une vitesse 10 fois supérieure à celle des bactéries (loi de Stokes en régime laminaire et permanent).

Si peu de différences sont observées pour les suspensions pures, les résultats obtenus pour le dépôt mixte, dans les conditions expérimentales de l'essai, semblent indiquer une diminution modérée mais progressive de l'épaisseur qui peut être analysée pour ce dépôt. La variation globale de l'épaisseur mesurée, évaluée à environ 15%, pourrait être attribuée à une modification de sa structure (réarrangement des deux espèces ou compaction).

Les épaisseurs sur lesquelles une analyse de la structure est possible apparaissent donc dans tous les cas bien inférieures à celles des dépôts réalisés évaluées à partir de la masse sèche de micro-organismes déposés. Ce calcul théorique effectué en supposant que les cellules hydratées contiennent 4g d'eau par g de masse sèche, permet d'estimer le volume occupé par les micro-organismes. En supposant un taux de vide minimal de l'ordre de 26 %, (empilement le plus compact de sphères monodisperses), une densité moyenne de 1,12 et compte tenu de la surface de filtration de 0,00159 m<sup>2</sup>, l'ordre de grandeur de l'épaisseur des dépôts peut être approché (Tableau 22).

	Masse	Masse humide	Volume	Taux	Volume	Epaisseur	Epaisseur
	sèche	mg	μl	de vide	total	théorique	mesurée
	mg			%	$\mu m^3$	μm	μm
Levures	25	125	119	26	150	94	31,2
(A1)							
Bactéries	25	125	119	26	150	94	30
(B1)							
Levures	12,4	62	59	26	74,4	47	-
(C1)							
Bactéries	12,8	64	61	26	76,8	48	-
(C1)							
Mélange	25,2	-	-	-	-	95	25,8
(total)							

Tableau 22 : Epaisseurs théoriques et mesurées des dépôts des expériences A1, B1 et C1.

Qu'il s'agisse des essais préliminaires d'évaluation de dépôts de bactéries ou des dépôts réalisés dans la cellule, les écarts entre les épaisseurs observables et les épaisseurs estimées des dépôts peuvent être liés à différents phénomènes engendrant des biais ou des limites lors de l'acquisition ou l'exploitation des images en microscopie confocale. En effet certains auteurs ont mis en évidence des difficultés lors de l'analyse de structures denses de plusieurs dizaines de microns (Hughes et al, 2006). Ces chercheurs, dans une approche similaire à la nôtre, se sont intéressés en microscopie bi-photonique à des dépôts de levures colorées chimiquement ayant des épaisseurs plus importantes que dans cette étude. Malgré une capacité théorique de pénétration en microscopie bi-photonique d'environ 1 mm (Dufour et al, 2006), les auteurs ont montré une limite dans la visualisation en profondeur d'environ 45 µm sur des dépôts estimés à 160 µm au total. Ils ont émis l'hypothèse que les dépôts de levures, beaucoup plus denses que les tissus humains limitaient la pénétration du laser et donc le phénomène de fluorescence (Hughes et al, 2006). La densité des dépôts pourrait également limiter l'émission. De façon similaire, dans les expériences que nous avons réalisées, il apparaît que même lorsque le marquage de la suspension de levure est optimal, ces dernières sont plus difficiles à visualiser, leur fluorescence étant moins intense, lorsqu'on descend vers le fond du dépôt, d'autant plus lorsque ce dernier est dense, ce qui est ici le cas (Figure 67).



**Figure 67 :** Images de plans focaux observés à l'objectif X40, zoom3, obtenus pour l'expérience C2 tableau 16, dans la partie supérieure du dépôt (1) et inférieure du dépôt, côté membrane (2). Images 125 μm x 125 μm.

Bien que le phénomène d'atténuation avec la profondeur soit apparu plus clairement pour les dépôts mixtes dans lesquels les levures sont plus distantes les unes des autres et entourées de bactéries, il est également visualisable dans les dépôts de bactéries pures ou de levures pures. Dans les essais réalisés uniquement avec des bactéries, la densité des dépôts est telle qu'elle semble absorber l'intensité du laser et donc limite sa pénétration en profondeur ; seules les couches supérieures seraient donc excitées. De la même façon, l'émission de fluorescence des micro-organismes situés plus en profondeur, au cœur du dépôt, pourrait être en partie absorbée par les couches supérieures, et n'est donc pas visualisée. Ces phénomènes constituent donc une limite majeure à cette technique d'analyse dans le cas de l'étude de dépôts épais ou très denses.

En conclusion ces expériences ont mis en évidence que la caractérisation globale (épaisseur) et locale (organisation des micro-organismes) d'agrégats biologiques « denses » peut être limitée à une certaine profondeur selon les caractéristiques propres des particules ou des micro-organismes et la densité de la structure obtenue. La limite d'analyse devra ainsi être évaluée dans chaque cas expérimental. Cette méthodologie permet néanmoins d'avoir des informations pertinentes pour des dépôts d'épaisseur modérée, elle serait donc mieux adaptée pour des situations dans lesquelles les dépôts seraient de faible épaisseur (par exemple étude d'un dépôt fortement cisaillé en filtration tangentielle).

Par ailleurs cette méthode pourrait également être utilisée pour étudier la formation graduelle d'un dépôt. Dans ce cas, il serait intéressant de pouvoir au préalable localiser la membrane et repérer sa position, en la colorant par exemple, avant l'injection des microorganismes. La limite supérieure ne présentant pas de phénomène d'atténuation du signal, elle peut être précisément définie, et la différence entre les deux positions peut permettre d'avoir une épaisseur avec une précision d'environ 2  $\mu$ m. Néanmoins, l'observation locale de l'organisation des différentes espèces dans un dépôt compact resterait limitée aux couches supérieures si celui-ci dépasse une épaisseur donnée (environ 30  $\mu$ m, mais dépendant de la densité du dépôt).

Dans les expériences de filtration réalisées afin de comparer les comportements d'un dépôt bactérien pur, d'un dépôt de levures pur ou d'un dépôt mixte, nous nous sommes néanmoins placés à des quantités de micro-organismes filtrés d'environ 25 mg, correspondant à une épaisseur théorique de 80-90  $\mu$ m, afin d'obtenir un impact significatif du colmatage de la membrane par ces dépôts. Dans ces conditions, l'analyse de la structure se limitera aux 25-30 micromètres supérieurs des dépôts.

### 2. Détermination du taux de vide des dépôts par analyse d'image

Les images obtenues dans les expériences A1 et B1 montrent des dépôts très homogènes dans les deux cas. Sur la base de cette simple observation, en première approche, le dépôt bactérien apparait plus compact que le dépôt de levures. En effet, la définition des images permet de distinguer des vides entre levures dont la morphologie et les contours sont très nets ce qui n'est pas le cas pour les bactéries plus petites.



Figure 68 : Images de plans focaux observés à l'objectif X40, zoom2, à mi-hauteur pour un dépôt de levures (gauche) et un dépôt de bactéries (droite) obtenus à une pression transmembranaire de 30 mbars. Images 187,5 μm x 187,5 μm.

Le taux de vide peut être estimé par le rapport du volume occupé par les objets fluorescents sur le volume total dans lequel est effectuée la mesure :

Taux de vide = 
$$(1 - \frac{\sum volumes objets fluorescents}{Volume total}) x100$$

Cependant ce mode de calcul repose sur deux hypothèses :

- tous les objets sont fluorescents,
- la fluorescence détectée est strictement limitée aux objets, pour cela il faut que la taille des objets soit nettement supérieure à celle des voxels.

Or dans les expériences réalisées, ces deux hypothèses ne sont pas parfaitement respectées en raison du marquage partiel des levures mais aussi parce que la taille des bactéries (1  $\mu$ m x 2  $\mu$ m) est proche de celle des voxels (0,3  $\mu$ m x 0,3  $\mu$ m x 0,6  $\mu$ m), pouvant entraîner une difficulté à définir leur contour.

Pour améliorer l'estimation du taux de vide, nous avons proposé d'introduire un facteur correctif permettant de prendre en compte le taux de marquage réel des levures. La surface recouverte ainsi que le volume occupé par les levures seront donc corrigés d'un facteur permettant de ramener les valeurs à un taux de marquage de 100 % :

Volume Occupé Corrigé (VOC) =  $\frac{Volume \ Occupé \ Mesuré (VOM)}{Taux \ de \ marquage \ des \ levures} x100$ 

Un exemple de calcul est donné dans le tableau ci-dessous (Tableau 23).

Volume occupé	Taux de marquage (%)
20 000 (VOM)	80
$? \rightarrow 20\ 000\ \text{x}\ 100\ /\ 80\ (\text{VOC})$	100

Tableau 23 : Exemple de calcul du volume occupé corrigé

Pour les différents dépôts, l'évaluation du taux de vide a été réalisée à partir d'une image située au niveau du plan focal central de la zone observée. Par rapport aux plans focaux seuils supérieurs et inférieurs précédemment définis, le plan choisi pour la mesure du taux de vide est situé à égale distance des deux plans seuils.

Cette mesure a été réalisée pour les trois expériences A1, B1 et C1 résumées dans le Tableau 16. Dans les cultures correspondantes, le taux de marquage a varié de 31,1 % (+/-

3,2) pour les levures utilisées pour le dépôt mixte (expérience C) à 84,7 % (+/- 0,9) pour les levures utilisées pour le dépôt de levures pures (Expérience A).

Compte-tenu des dimensions de la zone analysée, fixée lors de l'acquisition (nombre de pixels convertis par la machine en  $\mu$ m<sup>2</sup>), la surface totale d'un plan focal est de 35156  $\mu$ m<sup>2</sup>. La hauteur d'un voxel étant de 0,6  $\mu$ m, le volume de la coupe optique correspondante est de 21093  $\mu$ m<sup>3</sup>. Le taux de vide pour un plan z est calculé comme indiqué dans le chapitre précédent, en soustrayant le volume recouvert pas les différents signaux sur le plan z au volume total du plan z (21093  $\mu$ m<sup>3</sup>).

Pour le dépôt mixte, les fluorescences sont cumulées afin d'estimer le recouvrement du ou des différents signaux issus des micro-organismes. Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant (Tableau 24).

	Pression	V occupé en $\mu$ m <sup>3</sup>	Taux de vide
	transmembranaire	(VOC pour les levures, VOM	(%)
	(mbars)	pour les bactéries)	
Expérience A :	28	18718	11 %
levures seules	116	18375	13%
	296	18568	12 %
Expérience B :	20	21086	0 %
bactéries seules	135	21091	0 %
	334	21091	0 %
Expérience C :	15	20885 (dont 16006 pour les	Co-
mélange		bactéries)	localisation
levures-	155	23552 (dont 18444 par les	Co-
bactéries		bactéries)	localisation
	319	24424 (dont 19993 par les	Co-
		bactéries)	localisation

Tableau 24 : Résultats de l'analyse d'image réalisé à l'aide du logiciel Volocity®

L'analyse du taux de vide sur un plan focal situé au cœur de la zone analysée montre que ce dernier est plus important pour un dépôt de levures que pour des dépôts contenant des bactéries. En effet, les dépôts composés uniquement de bactéries ou d'un mélange bactérieslevures ont des taux de vide apparents inférieurs ou égaux à 0 %. Si les levures étaient assimilées à des sphères, le taux de vide de leur empilement compact serait théoriquement de 26 %. Cette hypothèse apparait éloignée de la réalité physique puisque les valeurs expérimentales indiquent des taux de vide d'environ 12 %. Cette différence pourrait être en partie expliquée par la répartition de taille des levures ; de jeunes levures issues du bourgeonnement, plus petites que des levures matures, sont en effet observées dans les interstices (Figure 69).



**Figure 69 :** Image d'un plan z pris dans la partie supérieure d'un dépôt de levure exprimant la Gfp. Entourées en blanc : zones où différentes tailles de levures sont visibles. Images 187,5 µm x 187,5 µm.

Les observations qui ont été réalisées mettent clairement en évidence une dispersion de taille des levures (Figure 70) avec des cellules ayant un rayon moyen de 4,96  $\mu$ m, une médiane à 4,93  $\mu$ m (valeur pour laquelle 50 % de la population a un diamètre inférieur et 50 % à un diamètre supérieur). Ces dimensions peuvent varier du simple au double voir au triple, avec les rayons inférieurs à 3,5-4  $\mu$ m correspondant sur l'image à des bourgeons ou à de petites levures, certainement tout juste détachées des levures mères. Ceci conforte l'hypothèse d'un arrangement lié à la morphologie et évolutif selon la pression subie.



Figure 70 : Répartition du diamètre moyen de levures (mesure réalisée sur un échantillon de suspension de solution à filtrer, contenant environ 200 cellules)

L'analyse des images relatives au dépôt mixte, montre que la somme des surfaces recouvertes par les deux signaux fluorescents (expérience C) dépasse la surface totale de l'image. Ceci peut résulter d'un léger recouvrement des deux signaux (co-localisation). Pour les dépôts obtenus aux pressions de 155 et 319 mbars, des recouvrements respectivement de 12 % et 16 % sont observés. Cependant, ils peuvent également résulter du réglage des seuils de détection des différents signaux. En augmentant ce seuil, le volume évalué serait plus faible sur les plans focaux, mais en contre partie les micro-organismes seraient moins bien détectés. L'augmentation du volume recouvert pourrait également traduire un volume plus élevé de micro-organismes détectés, indiquer un tassement ou une réorganisation du dépôt dans sa partie centrale et une modification de sa porosité.

Dans la littérature, de nombreuses études ont été dédiées à l'analyse de la porosité dans l'objectif de comprendre l'influence des conditions opératoires, en particulier de la contrainte de pression, sur les caractéristiques des dépôts et leur évolution. La plupart des méthodes sont basées sur des approches globales, certaines utilisent notamment des mesures d'épaisseur du dépôt (Hamashi & Mietton-Peucheot, 1999a et 2002). En faisant des hypothèses sur son homogénéité, et à partir de la connaissance de la morphologie des particules (taille, forme), elles permettent d'obtenir une information sur la porosité globale du dépôt. Cependant, nous avons montré que notre approche expérimentale ne permettait pas, par les observations réalisées en microscopie confocale, de mesurer l'épaisseur totale des dépôts. D'autres méthodes globales basées sur les mesures de flux, peuvent néanmoins être utilisées pour évaluer la porosité sans connaître l'épaisseur totale du dépôt. Nous allons donc chercher à estimer les porosités des différents dépôts à partir des résultats expérimentaux obtenus en chambre de filtration.

#### 3. Evaluation de la porosité à partir des résultats expérimentaux de filtration

Les expériences répétées plusieurs fois avec des masses de micro-organismes déposées du même ordre de grandeur, ont été précédemment décrites (Tableau 16). Pour chaque essai, une membrane neuve a été utilisée et sa perméabilité au solvant a été mesurée. Les vitesses de filtration en fonction des pressions transmembranaires appliquées ont été relevées pour les différentes suspensions filtrées (Figure 71), les observations microscopiques étant réalisées simultanément.



**Figure 71 :** Flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire lors des filtrations d'une suspension de levures (trait plein vert, expérience A1 : masse déposée : 24,96 +/- 0,21 mg); d'une suspension de bactéries (trait plein rouge, expérience B1 : masse déposée : 24,87 mg +/- 0,09 mg) et d'un mélange levures/ bactéries (trait plein rose, expérience C1 : masse totale déposée : 25,12 mg +/- 0,48 mg). Les courbes pointillées correspondent aux résultats obtenus lors de la filtration du solvant seul (NaCl 0,9%).

Ces expériences illustrent l'impact des dépôts colmatants sur les performances de filtration. Il existe une différence notable entre les flux de perméat obtenus pour la membrane seule (flux mesuré avec une solution de NaCl 0,9 % seule) et lorsqu'un dépôt microbien y est déposé. La comparaison des flux de perméat pour des pressions transmembranaires croissantes, met en évidence le colmatage consécutif au dépôt des micro-organismes et l'évolution de ce dernier en fonction des conditions opératoires. En outre, d'importantes différences sont observées selon la nature des suspensions filtrées : bactéries pures, levures pures ou mélange levures-bactéries. Pour une masse de micro-organismes déposée identique, quelle que soit la pression transmembranaire appliquée, le flux de perméat reste toujours plus élevé pour la suspension de levures que pour celle de bactéries et est intermédiaire pour le mélange des deux micro-organismes.



Figure 72 : Rapport du flux de perméat pour une suspension de micro-organismes sur le flux pour la membrane propre (J/Jo) en fonction de la pression transmembranaire appliquée et pour différentes suspensions : levures (♦), bactéries (▲), mélange levures/bactéries(■).

L'ampleur du colmatage dû aux dépôts est également illustrée par le flux de perméat normalisé (rapport du flux en présence des micro-organismes (J), sur celui obtenu pour la membrane propre ( $J_0$ )) (Figure 72). Cette représentation confirme que le dépôt de bactéries engendre, dans les conditions de ces essais, la perte de flux la plus importante et ce, dès les plus faibles valeurs de pression appliquée (la première valeur obtenue pour le dépôt bactérien peut-être lié à l'hypothèse posée précédemment d'un dépôt partiel des bactéries). A titre d'illustration, pour une pression transmembranaire de 300 mbars, l'influence globale du dépôt se traduit par une réduction du flux par rapport au solvant de 30 % pour la levure, 80 % pour la bactérie et 60 % pour le mélange levures/bactéries. Par ailleurs, l'influence de la pression transmembranaire sur les propriétés des dépôts diffère selon leur composition. En effet, lorsque la PTM augmente de 50 à 300 mbars, les flux normalisés diminuent de 8%, 14% et 24% respectivement pour la bactérie, la levure et le mélange des deux espèces. L'influence de la PTM apparait donc beaucoup plus marquée dans le cas du dépôt mixte, traduisant probablement une modification de ses caractéristiques (compressibilité, organisation) sous contrainte de pression plus importante que pour des dépôts « purs »

L'hypothèse de caractéristiques propres de chacun de ces dépôts (épaisseurs, organisations, porosité...) liées aux spécificités des micro-organismes présents apparait donc cohérente. Différents facteurs pouvant interagir entre eux sont susceptibles de contribuer à la structuration ou à l'organisation des dépôts leur donnant des propriétés de colmatage et éventuellement des compressibilités différentes. Il s'agit en particulier de l'hydrodynamique locale, des interactions physico-chimiques entre micro-organismes ou entre micro-organismes et membrane ainsi que des caractéristiques géométriques des espèces modèles. Certains de ces facteurs sont étroitement corrélés à la nature et aux spécificités des micro-organismes présents.

Dans les conditions de ces essais, les suspensions étant lavées et les particules étant de tailles très supérieures à celle des pores, on peut supposer que le colmatage est uniquement lié à la formation d'un dépôt particulaire réversible sur la membrane (pas de blocage de pore, ni de colmatage interne). Afin d'évaluer les résistances des différents dépôts, la résistance intrinsèque de la membrane a été déterminée lors de la filtration du solvant en appliquant la loi de Darcy :

$$R_{m} = \frac{PTM}{\mu J_{0}}$$

avec PTM la pression transmembranaire (Pa),  $\mu$  la viscosité du perméat (Pa.s), R<sub>m</sub> la résistance hydraulique de la membrane (m<sup>-1</sup>).

Les résultats expérimentaux ont permis de calculer une résistance de membrane moyenne de  $8,61 \pm 0,18 \times 10^{11} \text{ m}^{-1}$ . La résistance additionnelle liée au dépôt formé à la surface de la membrane peut ainsi être obtenue par :

$$J = \frac{PTM}{\mu(Rm + Rd)}$$

D'où

$$Rd = \frac{PTM}{J\mu} - Rm = \frac{PTM}{\mu} \left(\frac{1}{J} - \frac{1}{J_0}\right)$$



Figure 73 : Résistance du dépôt en fonction de la pression transmembranaire appliquée (en pointillés résistance de la membrane) : résistances calculées à partir des résultats expérimentaux (suspensions de levures (♦), de bactéries (▲), mélange de levures/bactéries(■)) et valeur théorique pour un dépôt mixte levure/bactéries composé de masses égales à la moitié des masses déposées pour les dépôts « purs » (■).

Les résistances des trois dépôts, à masse de particules déposée identique, apparaissent très différentes (Figure 73), tant au niveau de leur ampleur que de leurs évolutions lorsque la pression transmembranaire augmente. Dans tous les cas cependant, l'augmentation de la pression se traduit par un accroissement progressif des résistances suggérant une compression ou une réorganisation des structures. Ainsi, la résistance du dépôt de levures reste faible (à 50 mbars, environ la moitié de celle de la membrane) et varie peu lorsque la pression

transmembranaire augmente. Le dépôt bactérien présente une résistance nettement plus élevée et sa résistance augmente de façon plus marquée (à 300 mbars sa résistance est plus de 3 fois celle de la membrane). La rapide augmentation initiale pourrait être liée à l'accumulation des cellules qui étaient encore en suspension au dessus du dépôt lors de la première mesure (observations microscopiques).

Pour le mélange levure/bactérie, les propriétés du dépôt apparaissent intermédiaires entre celles des deux suspensions pures. Un calcul théorique a été réalisé sur la base des résistances obtenues pour chaque dépôt pur, afin d'évaluer la résistance équivalente qu'aurait un dépôt mixte composé de masses égales à la moitié de celles déposées pour les suspensions pures (Figure 73). La résistance ainsi calculée apparait supérieure à la résistance mesurée expérimentalement. L'association des deux micro-organismes conduit donc à un dépôt de perméabilité supérieure. Plusieurs phénomènes pourraient contribuer à ce résultat, en particulier :

- une organisation spécifique des micro-organismes en mélange,

- une variation de la porosité dans l'épaisseur du dépôt liée à une répartition non homogène des espèces qui pourrait avoir lieu sous influence des contraintes hydrodynamiques,

- l'existence d'interactions physico-chimiques entre particules « levures » et « bactéries » (effets répulsifs) susceptibles d'influer sur la structure du gâteau.

Parmi tous les cas envisagés, à masse déposée égale, le dépôt de levure apparait donc le plus perméable et le moins évolutif.

Dans la bibliographie, les caractéristiques des dépôts sont souvent comparées sur la base de leurs résistances spécifiques α :

$$\alpha = \frac{PTM / \mu J - R_m}{m / A} = \frac{R_d}{m / A}$$

Avec :

PTM la différence de pression transmembranaire (Pa),

 $\mu$  la viscosité du solvant, supposée identique à celle de l'eau (10<sup>-3</sup> Pa.s),

 $R_m$  la résistance de la membrane (m<sup>-1</sup>)

m la masse humide déposée (kg) (Pour des micro-organismes en culture, la masse humide est évaluée en estimant un ratio « masse d'eau / masse sèche » de 4/1, soit masse humide/masse sèche de 5/1).

A la surface de filtration  $(m^2)$  (0,00159 m<sup>2</sup>)

Dans la gamme de pression appliquée (40 à 300 mbars), les valeurs des résistances spécifiques des dépôts obtenues dans cette étude (Figure 74) sont comprises entre  $1 \times 10^{13}$  et  $4 \times 10^{13}$  m/kg pour le dépôt bactérien,  $2 \times 10^{12}$  et  $5,5 \times 10^{12}$  m/kg pour le dépôt de levures et  $5 \times 10^{12}$  et  $2 \times 10^{13}$  m/kg pour le dépôt mixte.

Pour les dépôts purs, ces résultats peuvent être comparés aux données de la bibliographie. Une telle comparaison ne peut cependant être effectuée dans le cas particulier du dépôt mixte.



Figure 74 : Résistance spécifique du dépôt en fonction de la pression transmembranaire appliquée calculées à partir des résultats expérimentaux (suspensions de levures (♦), de bactéries (▲), mélange de levures/bactéries(■)).

Le <u>Tableau 25</u> rassemble quelques valeurs de résistances spécifiques mesurées par différents chercheurs pour des dépôts purs de *S. cerevisiae* et *E. coli* dans des gammes de pression similaires à celle utilisée dans notre étude. Nakanishi *et al.*, 1987, qui ont étudié les caractéristiques de dépôts de même nature entre 2 kPa et 200 kPa, (i.e. 20 mbars à 2 bars), obtiennent des valeurs dix fois supérieures aux nôtres pour le dépôt bactérien de *E. coli*  $(1x10^{14} < \alpha < 4x10^{14} \text{ m/kg})$  mais inférieures pour le dépôt de levures,  $(1x10^{11} < \alpha < 3x10^{11} \text{ m/kg})$ . Dans le cas de *E. coli*, l'écart pourrait s'expliquer par le fait que les expériences réalisées par Nakanishi *et al.*, sont menées en mode tangentiel. En effet, selon Tanaka *et al.*, 1994, la résistance spécifique des dépôts d'*E. coli* serait liée à leur morphologie en bâtonnet. Elle serait ainsi supérieure en mode tangentiel (valeur non spécifiée) par rapport au mode

frontal (2,7x10<sup>13</sup> m/kg à 490 mbars), en raison de l'arrangement différent des bactéries dans les deux modes de filtration : leur organisation serait aléatoire en mode frontal et elles s'orienteraient dans le sens du flux en mode tangentiel. Cette différence de comportement est également observée par les mêmes auteurs pour d'autres types de bactéries en forme de bâtonnets (Tanaka *et al.*, 1996). Dans le cas de la levure, ou de particules considérées comme sphériques, plusieurs auteurs ont conclu que les résistances des dépôts étaient identiques quel que soit le mode de filtration (Geissler & Werner, 1995 ; Tanaka *et al.*, 1993). Les résistances spécifiques reportées dans la bibliographie pour des dépôts de levures présentent cependant des variations importantes. Ainsi, Mc Carthy et *al.*,1998, ont évalué à 300 mbars un  $\alpha$ d'environ 1 x 10<sup>12</sup> m/kg, ce qui apparaît un peu plus élevé que les résulats obtenus par Nakanishi *et al.*, 2009, ont calculé une résistance spécifique de 5x10<sup>12</sup> m/kg à 300 mbars, valeur similaire à la nôtre (Tableau 25).

$\alpha$ m/kg	30-40 mbars	300 mbars	490 mbars	Référence
<i>S</i> .	$1 \times 10^{11} (T)$	$3x10^{11}(T)$		Nakanishi et al., 1987
cerevisiae		$1 \ge 10^{12} (F)$		Mc Carthy et al., 1998
		$5 \times 10^{12} (F)$		Mc Guire et al., 2009
	$2x10^{12}$ (F)	$5,5x10^{12}$ (F)		Cette étude
E. coli	$2x10^{12}$ (F) $1x10^{14}$ (T)	<b>5,5x10<sup>12</sup> (F)</b> 4x10 <sup>14</sup> (T)		<i>Cette étude</i> Nakanishi <i>et al.,</i> 1987
E. coli	<b>2x10<sup>12</sup> (F)</b> 1x10 <sup>14</sup> (T)	<b>5,5x10<sup>12</sup> (F)</b> 4x10 <sup>14</sup> (T)	2,7x10 <sup>13</sup> (F)	<i>Cette étude</i> Nakanishi <i>et al.,</i> 1987 Tanaka <i>et al.,</i> 1994
E. coli	<b>2x10<sup>12</sup> (F)</b> 1x10 <sup>14</sup> (T)	<b>5,5x10<sup>12</sup> (F)</b> 4x10 <sup>14</sup> (T)	2,7x10 <sup>13</sup> (F)	<i>Cette étude</i> Nakanishi <i>et al.,</i> 1987 Tanaka <i>et al.,</i> 1994

Tableau 25 : Résistances spécifiques obtenues en mode frontal (F) ou tangentiel (T) pour des dépôts de *E. coli* et de *S. cerevisiae* 

Bien qu'il y ait des différences parfois importantes avec les données bibliographiques, c'est à partir des valeurs de résistance spécifiques déterminées expérimentalement que la porosité des différents dépôts à été évaluée par l'équation adaptée de Koseny-Carman-en faisant l'hypothèse d'un écoulement de Stokes au travers d'un lit de particules sphériques de diamètre homogène et non compressible. Cette expression relie la résistance spécifique du dépôt et sa porosité et permet de prendre en compte la morphologie des micro-organismes par l'intermédiaire du paramètre S<sub>v</sub>.

$$\alpha = \frac{K(1-\varepsilon)S_v^2}{\varepsilon^3 \rho_c}$$

Avec :

 $\alpha$  la résistance spécifique de dépôt (m/kg)

 $\rho_c$  la masse volumique des cellules (kg/m<sup>3</sup>)

ε la porosité

 $S_v$  le ratio surface/volume de la particule, ici des micro-organismes (m<sup>-1</sup>)

K la constante de Kozeny, considérée par la plupart des auteurs égale à 5

Pour cette estimation, nous avons considéré une constante K de 5, valeur usuellement utilisée, et utilisé les valeurs de  $S_v$  déterminées par Nakanishi *et al.*, 1987 pour des souches d'*E. coli* et de *S. cerevisiae*.

Les porosités ainsi obtenues sont comprises entre 0,09 et 0,13 pour le dépôt de levures et entre 0,14 et 0,17 pour le dépôt bactérien selon la pression appliquée. Même si ces valeurs apparaissent relativement faibles, certains auteurs ont toutefois trouvé des valeurs similaires.

Pour la levure, Shimizu et *al.*, 1993, ont par exemple obtenu en filtration tangentielle à 1 bar une porosité de 0,15. Ces résultats sembleraient conforter l'hypothèse d'un faible taux de vide dans ce dépôt, dû au tassement ou à un arrangement spécifique des cellules lié à leur hétérogénéité de taille (figure 70). Les levures sont toutefois souvent assimilées à des sphères, or la porosité théorique pour des sphères incompressibles de diamètre identique étant de 0,26, un calcul inverse basé sur cette valeur de porosité impliquerait une valeur de K de 36 à 30 mbars, à 86 à 300 mbars. Des valeurs de K élevées ont été décrites dans la bibliographie pour des micro-organismes filamenteux (rapport surface/volume élevé) (Foley, 2006), ce qui n'est pas le cas ici. Les porosités mesurées entre 12 à 15 % pour le dépôt de *S cerevisiae*, en accord avec les valeurs obtenues par le calcul fait à partir des résistances spécifiques, apparaissent donc plausibles, probablement liées à une dispersion des tailles des levures. L'analyse d'images semble donc pertinente dans ce contexte pour évaluer la porosité de dépôts de levures.

Dans le cas du dépôt bactérien, la porosité évaluée par l'analyse d'image est très faible et tend vers zéro. Peu de données bibliographiques existent pour ces dépôts, en particulier en filtration frontale, et les données disponibles apparaissent très variées. Yu *et al.*, 1996, en appliquant une équation basée sur l'empilement de cylindres incompressibles pour simuler un dépôt de *Bacillus subtilis* ont trouvé une porosité de 0,433. Mota *et al.*, 2002, ont estimé cette porosité à 0,251 en modélisant l'empilement de cellules en forme de bâtonnets comme un

empilement « de briques ». Par ailleurs Fane et al., 1991, ont estimé des porosités comprises entre 0,1 et 0,18 pour des  $\Delta P$  de 300 mbars. Dans l'équation de Kozeny Carman, usuellement utilisée pour évaluer la porosité, la valeur de la constante K classiquement considérée est de 5 ce qui est bien adapté pour des particules sphériques. Etant corrélée à la tortuosité T et à la forme du pore  $K_0$  [K = T<sup>2</sup> x K<sub>0</sub>] (Mota *et al.*, 2002), sa valeur est cependant tributaire des caractéristiques morphologiques des particules constituant le dépôt et de leur agencement. Ainsi McCarthy et al., 1998b, après avoir déterminé  $\alpha$ ,  $\varepsilon$  et S<sub>v</sub>, ont trouvé que des valeurs de constante K comprises entre 6 et 12 étaient nécessaires pour expliquer leurs résultats. Oolman & Liu, 1991 ainsi que Patankar et al., 1993, ont étudié des micro-organismes filamenteux et ont évalué des constantes K variant respectivement de 2,2 à 9 et de 3,6 à 7,2 en fonction des souches et de leurs formes. La diversité des données bibliographiques pour la bactérie (Yu et al., 1996, Mota et al., 2002, Fane et al., 1991) nous a ainsi conduit à ré-évaluer une constante K qui serait en accord avec les résistances spécifiques obtenues expérimentalement. Les taux de vide trouvés par Mota et al., 2002 (de 0,251), correspondraient à une valeur de K comprise entre 20 et 32 environ et ceux décrits par Fane et al., 1991 (de 0,1 à 0,18), à des valeurs de K entre 1 et 10. Pour aboutir à des taux de vide très faibles (<0,05), conformes aux observations microscopiques, en considérant toujours la valeur de Sv proposée pour une souche de E coli par Nakanashi et al., 1987, les valeurs de K devraient être plus faibles (<1) que les valeurs évaluées à partir des données de la littérature (Figure 75). Ceci renforcerait l'idée d'une sous estimation du taux de vide par le traitement d'images, tout en confirmant que le choix de K égal à 5 est inapproprié pour un dépôt bactérien. En outre, ces calculs reposent sur une hypothèse d'incompressibilité ce qui, dans tous les cas, limite leur portée.



Figure 75 : Evolution du coefficient K en fonction de la porosité pour deux valeurs de pression appliquées au dépôt bactérien (correspondant à deux valeurs de résistance spécifique)

L'autre explication qui peut être avancée pour justifier l'écart entre les résultats issus du traitement d'image, les calculs et les données bibliographiques pour les dépôts de bactéries est liée à l'acquisition et l'analyse d'image. En effet, le taux de vide obtenu par le traitement des images acquises en microscopie confocale est tributaire des limites de la méthode optique: - la saturation du signal dans le cœur du dépôt : en effet, en profondeur, le signal issu est très intense, les bactéries étant très concentrées, et malgré l'abaissement du gain pour éviter les problèmes de saturation, leur détection individuelle est perturbée.

- la proximité de taille des bactéries  $(1\mu m \times 2\mu m)$  et des voxels  $(0,3 \ \mu m \times 0,3\mu m \times 0,6\mu m)$ limite la résolution lors de l'observation des bactéries et plus exactement la précision de la définition de leurs contours ce qui ne permet pas d'estimer précisément leur volume ; les espaces vides entre bactéries très proches ne sont pas correctement détectés et mesurés.

- la résolution de l'objectif x 40 utilisé est trop faible pour l'observation précise de microorganismes de petites tailles.

Cet objectif longue distance X40 a été choisi pour différentes raisons techniques :

- la compatibilité de sa distance de travail avec la géométrie de la chambre de filtration.
  La distance entre la lamelle et la membrane sur laquelle le dépôt se forme est d'environ 1 à 2 mm, et limite le choix des objectifs, aux dispositifs « longue distance », excluant d'autres objectifs de forts grossissements.
- la possibilité d'observer un champ maximal en x y, sans réaliser de zoom de 375  $\mu$ m x 375  $\mu$ m, ce qui représente une surface de 140 000  $\mu$ m<sup>2</sup> environ conformément à la bibliographie qui recommande, dans le cas des biofilms, qu'une surface minimale de l'ordre de 10<sup>5</sup>  $\mu$ m<sup>2</sup> soit considérée pour être statistiquement représentative (Korber *et al.*, 1992 ; Venugopalan *et al.*, 2005).

Dans une autre configuration, un objectif plus puissant pourrait permettre une meilleure résolution, à condition toutefois que sa distance de travail soit suffisante. En effet, plus le grossissement sera important, plus de détails pourront être observés, comme des petits groupes de cellules ou des petites zones « vides » et pris en compte dans l'analyse qui sera ainsi d'autant plus précise. Ainsi, Beyenal *et al.*, 2004, ont montré sur des billes de diamètre connu (15  $\mu$ m) que le grossissement le plus important (non indiqué) permet la meilleure évaluation du diamètre lors du traitement du signal (ISA3D)(16,7  $\mu$ m). La différence est attribuée au bruit sur les images acquises. Ils ont également calculé grâce au logiciel un

rapport de 1,06, contre 1 théorique entre le rayon des billes sur l'axe des x et le rayon sur l'axe des y, soit une précision d'environ 6 %, que ces auteurs estiment raisonnable.

Néanmoins, afin d'améliorer les observations des dépôts réalisés dans ces conditions, nous avons eu recours à un zoom numérique. La sélection d'une zone d'observation de dimension réduite, en utilisant des zooms X3 et X2 permet d'atteindre des tailles de voxel de 0,6  $\mu$ m en z, et de 0,25 à 0,36  $\mu$ m en xy contre 0,73 en xy  $\mu$ m sans zoom. Ceci conduit à une précision plus importante dans les mesures locales pour des densités de micro-organismes élevées (cas des dépôts). Néanmoins, la taille en longueur, largeur des voxels (xy), et notamment en hauteur (z) reste élevée par rapport aux dimensions des micro-organismes et peut entraîner une erreur d'estimation dans la mesure de paramètres de structure, tel que le taux de vide. En raison du zoom, la surface observée a également été réduite entre 15 600 et 35 000  $\mu$ m<sup>2</sup> selon les zooms réalisés. Cette surface bien qu'inférieure aux recommandations précédemment citées peut cependant être considérée comme suffisamment importante pour apporter des informations pertinentes. En effet, la structure des dépôts obtenus en filtration frontale est beaucoup plus régulière et homogène que celles des biofilms.

Il est cependant important de noter que, comme dans les travaux cités dans la bibliographie, les calculs ont été effectués à partir de mesures globales (flux), les dépôts sont donc considérés homogènes et leurs caractéristiques indépendantes de la profondeur. Cependant quelques références indiquent que l'organisation du dépôt n'est pas forcément homogène et que le taux de vide peut varier dans son épaisseur. Xu-Jiang *et al.*, 1995 ont par exemple montré que les propriétés pouvaient varier en fonction de l'épaisseur, avec dans leur cas une porosité plus élevée et une résistance spécifique plus faible en surface de dépôt qu'en profondeur. Ceci ne peut cependant être étudié uniquement à partir d'une mesure globale telle que la résistance. L'observation locale des structures est donc d'un grand intérêt en combinant des mesures sur plusieurs plans ou même sur toute l'épaisseur du dépôt. Cependant dans la partie supérieure du dépôt, sa délimitation précise peut-être délicate car sa surface n'est pas forcément plane. La prise en compte de zones de vide situées au-dessus du dépôt pourrait ainsi fausser l'analyse. De plus en profondeur, les problèmes d'atténuation du signal précédemment décrits peuvent engendrer des difficultés pour évaluer la surface ou le volume recouvert par les micro-organismes.

#### 4- Compressibilité

Deux relations sont classiquement retrouvées dans la littérature pour modéliser la variation de la résistance spécifique  $\alpha$  en fonction de la différence de pression transmembranaire (tableau X) et traduire la compressibilité des dépôts. Une des relations rencontrées est de type puissance :

$$\alpha = a \ \varDelta P^n$$

où « a » est une constante et « n » est un index qui traduit la compressibilité du gâteau. Il est égal à 0 pour un gâteau incompressible et augmente pour des compressibilités croissantes.

Une relation linéaire est également utilisée pour rendre compte des résultats expérimentaux:

$$\alpha = \alpha_0 \ (l + k_c \, \varDelta P)$$

où «  $\alpha_0$  » est la résistance spécifique du dépôt à la pression zéro et «  $k_c$  » un paramètre traduisant la compressibilité du dépôt. Cette relation illustre également qu'à des valeurs de pression proches de zéro, la résistance du dépôt n'est pas nulle.

	Auteur	pression	relation	n
S. cerevisiae	Mc Carthy et al., 1998a	300 mbars et 5 bars	linéaire	
levures	Tanaka <i>et al.</i> ,1997	300 mbars et 1,2 bars	linéaire	
E. coli	Riesmeier et al., 1990	< 700 mbars	linéaire	
S. cerevisiae	Nakanishi et al., 1987	200 mbars-20 bars	$\alpha = a \Delta P^n$	0,45
E. coli				0,79
S. cerevisiae	Cette étude	30-300 mbars	$\alpha = a \varDelta P^n$	0,39
E. coli				0,36
mixte				0,54

Tableau 26 : relations résistance spécifique – pression et compressibilité déterminées par certains auteurs

Dans notre étude, les valeurs de  $\alpha$  en fonction de la pression sont approchées de façon satisfaisante par une expression de type puissance, ( $\alpha = a \Delta P^n$ ) (Figure 74) et ce, autant dans le cas des deux dépôts purs que pour le dépôt mixte (coefficient de corrélation supérieur à 0,93). Les valeurs de n obtenues par ce modèle sont du même ordre de grandeur, entre 0,36 et

0,39, pour les dépôts de bactéries et de levures et atteint 0,54 pour le dépôt mixte. Elles indiquent que toutes les structures obtenues sont compressibles avec une compressibilité supérieure pour le dépôt mixte. Cette approche corrobore les profils des courbes J/Jo (figure 72).

Nakanishi *et al.*, 1987 ont obtenu une valeur de 'n' du même ordre de grandeur pour le dépôt de levures mais très supérieure pour le dépôt bactérien. Néanmoins, dans ces expériences, le facteur n' est évalué pour des pressions comprises entre 200 mbars et 2 bars, alors que nous l'avons déterminé entre 20 et 300 mbars. On peut supposer que la nature des phénomènes intervenant diffère selon la gamme de pression (tassement, réorganisation...). En effet l'écart entre la valeur de la littérature et la valeur trouvée ici est dans le bon sens si l'effet de la PTM est d'autant plus accentué que la PTM est élevée. De plus, comme cité précédemment, les résistances spécifiques des dépôts de *E. coli* étant plus élevées dans l'expérience de Nakanishi *et al.*, 1987 que dans notre étude (peut être du fait du mode de filtration), le facteur n lié à la résistance du gâteau peut en être affecté. Enfin, la bactérie *E. coli* peut présenter des morphologies différentes (bâtonnets plus ou moins allongés) ce qui peut influer les caractéristiques des dépôts.

De façon générale, les différences dans les caractéristiques globales des dépôts constatées dans ces expériences peuvent dépendre de nombreux facteurs :

- les conditions opératoires, tant biologiques que physiques : état physiologique des micro-organismes lors de l'expérience (phase de croissance), mode de préparation des suspensions cellulaires (lavage), composition du solvant utilisé lors de la filtration (force ionique), pression, mode de filtration...,

- les caractéristiques intrinsèques des micro-organismes (morphologie des cellules, composition et physico-chimie de l'enveloppe) dont certaines découlent également des conditions de culture et de l'environnement.

Ainsi, concernant les conditions opératoires, Mc Carthy *et al.*, 1998 ont pu mettre en évidence l'impact des étapes préliminaires de rinçage de la suspension sur la résistance spécifique d'un gâteau de levures. Celle-ci diminue de 35 % pour les levures non rincées, les auteurs attribuant ce résultat à la présence d'agrégats ou de flocs chez des levures non-rincées.

Des propriétés de surface différentes conduisant à des propriétés d'adhésion différentes sur le support et /ou entre levures selon le mode de préparation (réhydratation ou culture) ont également été caractérisées par Guillemot *et al.*, 2006.

Xu-Jiang *et al.*, 1995, ont montré que pour des suspensions minérales (talc), la salinité de la solution (0,001 M KCl ou eau) avait un impact lors de la filtration des particules en mode tangentiel, mais que le solvant n'influait pas sur la résistance spécifique du gâteau en mode frontal ; l'impact des forces d'interactions entre les particules semblant être négligeable face aux forces hydrodynamiques. Ni-Mhurchu & Foley, 2006, ont quant à eux évalué l'impact du pH, de la salinité du milieu et de la pression sur la résistance de dépôts de levures réalisés en filtration frontale. Ils ont montré que la résistance du dépôt augmentait avec la pression mais l'impact de la salinité et du pH sur la résistance des dépôts étaient variables.

Certains chercheurs ont étudié l'influence des conditions de culture sur les caractéristiques des dépôts microbiens. Le rôle colmatant de macromolécules secrétées au cours d'une culture de *S. cerevisiae* sur le flux de filtration d'un surnageant de culture (sans micro-organismes) a ainsi été mis en évidence (Zhang *et al.*, 1998). Ces auteurs ont notamment montré que le flux de filtration du surnageant de culture était inférieur au flux d'un solvant témoin (flux du surnageant de 21 à 48 % du flux témoin selon le type de membrane), et ont attribué ce phénomène à un effet colmatant de certaines macromolécules présentes dans le surnageant de culture (protéines par exemple) (Zhang *et al.*, 1998).

Les caractéristiques de l'enveloppe des micro-organismes, et en particulier la matrice extracellulaire chez certaines espèces, peuvent également conditionner les interactions entre individus (formation d'agrégats, cohésion entre cellules) et avec la membrane et jouer un rôle important dans les propriétés et la cohésion des dépôts (Hodgson *et al.*, 1993).

L'impact de la taille et de la forme des micro-organismes sur les résistances spécifiques de dépôts microbiens a également été démontrée, notamment au travers du paramètre « surface spécifique », défini par le rapport surface/volume (Nakanishi *et al.*, 1987 ; McCarthy *et al.*, 1993b ; Mota *et al.*, 2002, Gassara *et al.*, 2008).

Ainsi de très nombreux phénomènes co-existants dans des suspensions de microorganismes, susceptibles d'interagir entre eux, peuvent contribuer aux propriétés morphologiques des dépôts. Pour s'affranchir de certains de ces facteurs, notre étude a été réalisée dans des conditions et avec des systèmes modèles maîtrisés (rinçage, ...).

#### 5. Organisation des micro-organismes au sein de dépôts

Dans nos expériences, les deux suspensions cellulaires sont centrifugées en fin de phase de croissance, rincées et resuspendues dans du liquide physiologique (NaCl 0,9 %).
Elles sont ainsi conditionnées selon une procédure qui permet de contrôler certains paramètres :

 les micro-organismes récoltés en fin de phase de croissance sont en grande majorité viables (>90 %) et les cellules sont turgescentes,

- le mode de culture discontinu (batch, non limité en substrat) utilisé pour produire les micro-organismes ne favorise pas la production d'exopolymères chez la bactérie. En outre, quelles que soient les conditions de culture, la levure *S. cerevisiae* n'est pas connue pour produire des exopolymères.

- le rinçage et la remise en suspension dans du liquide physiologique permet d'éliminer les composés extracellulaires et de limiter les phénomènes de croissance ou de production de molécules extracellulaires susceptibles de participer au colmatage,

- le rinçage permet en outre d'obtenir des conditions environnementales identiques pour les deux micro-organismes et de s'affranchir des effets de milieu ou de solvant.

Ainsi, ce sont majoritairement (et certainement exclusivement) les différences de morphologie des micro-organismes (taille et forme) et leurs propriétés de surface (charge de surface, hydrophobicité) qui peuvent expliquer les différences observées dans les résistances des dépôts et leur comportement sous contrainte de pression. De plus, les micro-organismes étant en suspension dans du liquide physiologique, l'influence des propriétés de surface peut être négligée, et contrairement à la filtration tangentielle, en filtration frontale les cellules ne sont pas soumises à un cisaillement additionnel susceptible de les entraîner. Ainsi, de notre point de vue la morphologie semble être le paramètre essentiel distinguant les micro-organismes qui pourrait dans le contexte de ces expériences expliquer les différences observées dans les résistances des dépôts.

On peut en effet supposer que par la seule différence de taille des deux microorganismes, les structures des dépôts génèrent des perméabilités différentes. Quel que soit le type d'empilement des particules, « levures » ou « bactéries », il est probable que les interstices entre les levures seront de tailles supérieures à ceux laissés par les bactéries. Pour illustrer l'organisation des deux espèces dans un dépôt, les levures et les bactéries ont été représentées schématiquement par des sphères de tailles différentes, prenant en compte le rapport de taille des micro-organismes. Des dépôts dits « purs » de même épaisseur sont constitués de sphères vertes représentant des levures, ou de sphères rouges pour les bactéries (Figure 76). Le dépôt de levure présente ainsi des vides plus larges que le dépôt bactérien ce qui peut contribuer à leurs différences de résistances respectives. Toutefois, si l'approximation des levures par des sphères est acceptable, les bactéries s'apparenteraient davantage à des cylindres, le taux de vide serait alors plus important.



Figure 76 : Illustration d'arrangements possibles de particules sphériques de tailles différentes dans des dépôts de même épaisseur : les sphères rouges représentent les bactéries et les sphères vertes les levures.

Dans la bibliographie deux hypothèses distinctes, ont été avancées pour expliquer le comportement des différents dépôts obtenus ; la déformation des micro-organismes sous l'effet de la pression ou leur réarrangement au sein du dépôt (Foley, 2006).

En effet, afin de justifier les résultats obtenus lors de la filtration de levures réhydratées, Meireles *et al.*, 2004 ont émis l'hypothèse que la déformation des levures soumises à une compression diminuerait l'espace intercellulaire et serait responsable de la modification des résistances hydrauliques des dépôts. Contrairement à cette équipe qui a mis en évidence une modification de la forme de cellules partiellement déshydratées, aucune déformation marquée des cellules n'a été observée dans nos essais (compte tenu de la précision des observations). Les levures utilisées sont cependant des cellules fraîches issues d'une culture et leur viabilité est optimale. En outre, compte tenu des propriétés de la paroi cellulaire des levures, en particulier de la valeur du module de Young traduisant l'élasticité de leur enveloppe (Smith *et al.*, 2000), on peut supposer que dans la gamme de pressions utilisées pour nos essais, elles peuvent être considérées non déformables.

L'autre hypothèse pouvant expliquer l'évolution des caractéristiques des dépôts serait donc un réarrangement des micro-organismes qui se traduirait également par une évolution de la porosité. Le réarrangement des particules sous contrainte peut être particulièrement important s'il existe une dispersion de taille des micro-organismes. Ce phénomène peut avoir lieu dans une culture pure ou d'une population mixte. En effet, pour une suspension pure dans laquelle une taille moyenne de micro-organismes peut être établie, la répartition de taille des micro-organismes n'est pas tout à fait homogène, notamment du fait de la présence de plusieurs populations de micro-organismes en fin de culture. Nous avons montré que dans le cas des levures, il existait une dispersion de taille des cellules qui pouvait influencer leur organisation (paragraphe II-2). De même pour les bactéries, les observations montrent des morphologies différentes ; les cellules issues de la division cellulaire peuvent être plus « courtes » que les bactéries prêtes à se diviser.

Le dépôt mixte est apparu notablement plus compressible que les dépôts « purs » de bactéries ou de levures ce qui tendrait à confirmer l'influence de la répartition de taille des particules sur ses caractéristiques. En effet, si les levures sont assimilées à des sphères de rayon R, en fonction des caractéristiques de leur empilement, de petites particules telles que des bactéries pourraient s'intercaler dans les interstices ce qui modifierait la porosité globale du dépôt. Si l'on considère par exemple un empilement de type cubique, le rayon r équivalent de l'espace entre les particules sphériques est de :

$$r = R(\sqrt{2} - 1)$$

Pour un empilement plus compact (cubique à face centrée), le rayon équivalent r de l'espace entre particules sphérique est de:

$$r = R(\frac{1}{\cos 30^\circ} - 1)$$



Figure 77 : Exemples d'empilements de sphères de rayon R, et espaces interstitiels correspondants.

Le rayon moyen R d'une levure ayant été estimé à 2,5  $\mu$ m (paragraphe II-2), le rayon r d'un objet sphérique qui pourrait s'intercaler dans les interstices peut varier de 0,4 à 1 $\mu$ m environ selon la nature de l'empilement. La taille moyenne des bactéries étant de 1x2  $\mu$ m, un positionnement des bactéries dans les espaces vides apparaît donc possible pour un empilement lâche. Dans le cas d'un empilement plus compact, l'insertion directe des bactéries serait plus difficile ou pourrait au contraire contribuer à éloigner les levures les unes des autres. Dans un dépôt mixte constitué d'une proportion identique en masse de levures et bactéries, selon la répartition et l'agencement des deux populations, l'épaisseur globale, la porosité et la résistance pourraient donc varier. Les exemples ci-dessous illustrent différentes configurations d'occupation des interstices (Figure 78).



Figure 78 : Illustration d'arrangements de particules sphériques de tailles différentes dans un dépôt mixte : les sphères rouges représentent les bactéries et les sphères vertes les levures.

De façon similaire, Mota *et al.*, 1999, ont mis en évidence une diminution de la porosité d'un mélange de particules ayant des tailles variables par rapport celle d'un dépôt mono-espèce. La variation serait d'autant plus marquée que la différence de diamètre entre les particules serait importante, ce qui est le cas du mélange levures-bactéries. Les valeurs de la porosité, évaluée par la résistance des dépôts, seraient donc corrélées à une compressibilité supérieure du dépôt mixte.

Afin d'étudier l'organisation interne du dépôt mixte, différentes expériences ont été réalisées. Comme nous l'avons précédemment indiqué, la zone sur laquelle l'analyse est réalisée est limitée aux 25-30µm supérieurs du dépôt. La distinction des levures et des bactéries est toujours nette ce qui permet une analyse satisfaisante de la répartition respective de ces deux espèces dans une structure complexe (Figure 79) et ce, même si le marquage des levures n'est pas total.



Figure 79 : Image d'un plan focal observé à l'objectif X40, zoom2, à mi-hauteur d'un dépôt mixte levures (vert) bactéries (rouges) obtenu à une pression transmembranaire de 30 mbars. Images 187,5 µm x 187,5 µm.

Le faible taux de marquage des levures dans certains essais pouvant cependant causer des biais dans l'analyse, l'étude de l'organisation interne d'un dépôt mixte a été effectuée sur une expérience pour laquelle le taux de marquage des levures était de 83 % (+/- 2 %). La masse sèche déposée pour constituer ce dépôt est de 26,91 mg (+/- 0,51 mg), dont 13,81 mg (+/- 0,47 mg) de levures et 13,1 mg (+/- 0,04 mg) de bactéries. Les conditions d'acquisition (gain et offset sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau 27).

	Gain (V)	Offset (%)
Levures	695	-0,5
Bactéries	420	-0,7

Tableau 27 : Valeurs des paramètres d'acquisition gain et offset.

Une première analyse a été réalisée sur l'intégralité de la zone observable du dépôt mixte à différentes pressions. Pour chaque plan z, le volume occupé par chaque espèce microbienne a été mesuré et rapporté au volume total issu du signal cumulé des deux espèces dans toute l'épaisseur de la zone considérée. Ce calcul permet de comparer la répartition des deux espèces microbiennes. A titre d'exemple, le graphe obtenu pour une pression de 44 mbars est présenté sur la figure ci-dessous (Figure 80). La surface du dépôt se situe aux valeurs supérieures (35-40  $\mu$ m). La surface recouverte pour chaque plan z est analysée grâce au logiciel Volocity®, avec des seuils inférieurs gardés constants sur toute l'épaisseur analysée (40 pour la levure et 80 pour la bactérie) et le volume est calculé en connaissant l'épaisseur d'un plan z (0,6  $\mu$ m).



Figure 80 : Volumes occupés par la levure *S. cerevisiae* (en vert) et *E. coli* (en rouge) pour différents plans z du dépôt. Valeurs d'intensité seuils inférieures pour les bactéries: 80, pour les levures : 40.

L'analyse du graphe met en évidence plusieurs incohérences, notamment dans la zone la plus profonde du dépôt (plus proches de la membrane) (0 à 15  $\mu$ m) où le signal de la bactérie n'est pas détecté. Le volume correspondant aux bactéries est alors considéré comme nul lors du calcul réalisé par le logiciel de traitement d'image. Ceci est dû au fait qu'un seuil fixé à une intensité minimale de 80 ne permet pas de détecter les voxels d'intensité inférieures

à cette valeur, ce qui est le cas dans la partie profonde du dépôt. Néanmoins fixer un seuil permettant la prise en compte des voxels de plus faible intensité (valeur d'intensité seuil inférieur à 20) entraîne une surévaluation des voxels au centre de la zone analysée, du fait de la saturation du signal à ce niveau (Figure 81).



**Figure 81 :** Volume occupé par la levure *S. cerevisiae* (en vert) et *E. coli* (en rouge) pour différents plans z du dépôt. Valeurs d'intensité seuils inférieures pour les bactéries: 60, pour les levures : 40.

Le réel problème pour analyser globalement la répartition des micro-organismes réside dans une hétérogénéité du signal provenant des bactéries et également des levures. Pour contourner cette difficulté, il est possible de réaliser une analyse plan par plan, en réglant les seuils pour chaque espèce à chaque plan focal considéré. Cependant une telle procédure nécessite un temps d'analyse très long dû notamment au choix des seuils qui est délicat lorsque les objets sont peu ou au contraire très fluorescents. Ainsi, l'analyse de la surface recouverte par le signal issu de chaque micro-organisme a été limitée à trois plans z pris respectivement en surface, dans le cœur et dans le fond du dépôt, et ce pour différentes valeurs de pression.

Les valeurs des seuils inférieurs sélectionnées sont indiquées dans le tableau cidessous (Tableau 28).

	Dessus dépôt	Dessus dépôt	Dessus dépôt
	(A figure 82)	(B figure 82)	(C figure 82)
levures	39	34	23
bactéries	68	77	28

Tableau 28 : Valeurs d'intensité seuils inférieures sélectionnées

Un exemple d'images obtenues pour un dépôt à une pression transmembranaire de 44 mbars est présenté sur la figure ci-dessous (Figure 82), la base détectée du dépôt étant positionnée à  $0 \mu m$  et la limite supérieure à  $35 \mu m$ .



**Figure 82 :** Images en coupe du dépôt mixte (à gauche, 1 unité = 1 côté de petit carré : 18,7  $\mu$ m), et plans z situés en surface de la zone observée (A), au cœur (B) ou en profondeur (C) (à droite, images 187  $\mu$ m x 187  $\mu$ m). Reconstruction et analyse avec le logiciel Volocity®

La surface recouverte par chaque espèce microbienne sur les différents plans z a été évaluée en réglant les seuils dans chaque plan z pour chaque espèce microbienne. Les conditions pour l'analyse d'image ont été sélectionnées de façon à éviter une surestimation consécutive à des phénomènes de saturation du signal au cœur du dépôt ou une sousestimation due à un signal de fluorescence plus faible lorsque l'on descend dans le dépôt vers la membrane. Ainsi, la surface mesurée sera plus représentative de la surface réelle recouverte par une espèce pour chaque plan considéré.

On obtient ainsi une surface recouverte par les deux micro-organismes proche de la surface totale du plan z lorsqu'on se trouve au cœur de la zone analysée, mais elle ne correspond qu'à 70 % (+/- 10 %) de la surface totale dans les parties supérieures ou plus profondes du dépôt (plus proches de la membrane). On peut supposer qu'en surface, le dépôt est peut-être moins compact, ou pas tout à fait plat, et que des zones de vides sont encore présentes. En profondeur, ce faible taux pourrait être une conséquence d'une fluorescence moins importante des micro-organismes par rapport à ceux situés en surface du dépôt, qui seraient alors moins bien détectés malgré l'adaptation des réglages.

La surface recouverte pour un plan z considéré est évaluée grâce au logiciel Volocity<sup>®</sup>. Pour chaque plan z, la surface d'une espèce microbienne est rapportée à la surface totale de ce plan z. Ce calcul permet de comparer la répartition des deux espèces microbiennes sur les trois plans z situés à différents niveaux de la zone observée du dépôt (Figure 83). Les barres d'erreur ont été définies en prenant en compte l'erreur de mesure due à la marge d'appréciation du seuil par l'opérateur.



**Figure 83 :** Surface occupée par la levure *S. cerevisiae* (en vert) et *E. coli* (en rouge) par rapport à la surface totale recouverte pour différents plans z situés à différentes profondeurs (à la surface, au cœur de la zone analysée ou plus proche de la membrane) pour une pression de 44 mbars

Sur la figure précédente (Figure 83), on remarque une répartition hétérogène des deux populations dans la zone analysée du dépôt. En surface du dépôt, les bactéries représentent environ 95 % de la surface recouverte, contre 5 % environ pour les levures. Cette tendance est retrouvée dans le cœur de la zone analysée, où les bactéries représentent encore près de 80 % de la surface couverte. Néanmoins, dans la partie la plus profonde, les levures représentent une surface recouverte majoritaire d'environ 75 %.

La différence de prédominance des deux micro-organismes selon la profondeur pourrait provenir non seulement de phénomènes physiques ou physico-chimiques (différences de tailles et de morphologies), mais aussi de leur aptitude à sédimenter. En effet, lors de la préparation de l'essai, après le remplissage de la chambre et avant la filtration, il existe une courte période (réglages du dispositif et du microscope) au cours de laquelle les microorganismes sont simplement soumis à la gravité. Compte tenu de leur différence de tailles, leurs masses volumiques étant du même ordre de grandeur, la loi de Stokes en régime laminaire et permanent montre que considérées isolément, les levures peuvent décanter à une vitesse supérieure à celle des bactéries, du fait de leur diamètre moyen plus important :

$$V_s = d^2 (\rho_s - \rho_L) g / 18.\mu_L$$

Avec Vs vitesse de sédimentation en m.s<sup>-1</sup>, d : diamètre du micro-organisme en m,  $\rho_{\rm S} = 1120 \text{ kg.m}^{-3}$  masse volumique du micro-organisme,  $\rho_{\rm L} = 1000 \text{ kg.m}^{-3}$  masse volumique de l'eau,  $G = 9,81 \text{ m.s}^{-2}$  : accélération de la pesanteur,  $\mu_{\rm L} = 10^{-3}$  Pa.s: viscosité de l'eau

La vitesse de décantation initiale des levures, considérées à une distance relativement grande les unes des autres (pas d'interaction), est ainsi de l'ordre de 1,5  $\mu$ m par seconde en régime d'écoulement laminaire (Re<<1). Ainsi pour une durée de mise en place de l'expérience de l'ordre de 2 minutes, la distance maximale parcourue serait de l'ordre de 0,2 mm pour une levure et de 20  $\mu$ m pour une bactérie. Compte tenu de la profondeur de la chambre qui est environ de 1 mm, la sédimentation initiale pourrait donc avoir une influence sur la ségrégation des espèces. Il convient donc de veiller à établir le régime d'écoulement le plus rapidement possible de façon à n'étudier que les phénomènes qui interviennent durant la

filtration. Cependant, lorsque l'écoulement est établi, comme les débits appliqués restent faibles (vitesse moyenne de l'écoulement comprise entre 0,5 et 25  $\mu$ m/s selon le débit appliqué), la sédimentation peut encore être influente et les cellules peuvent se déplacer à des vitesses relatives différentes. Néanmoins, la concentration des micro-organismes augmentant au fur et à mesure de leur accumulation dans le bas de la chambre, l'hypothèse de suspension diluée et de particules isolées n'est plus valable ; les vitesses de sédimentation sont progressivement ralenties et les phénomènes convectifs deviennent prépondérants.

Si on suppose que la sédimentation est négligeable et que les cellules sont entrainées par les lignes de courant du fluide, le temps nécessaire pour traverser la chambre serait de l'ordre de 35 min pour le débit le plus faible et 40 s pour le débit le plus élevé. L'augmentation de débit réalisée en début d'expérience permet de forcer le dépôt d'une partie des micro-organismes ce qui est nécessaire pour repérer la zone de dépôt puisque la membrane n'est pas fluorescente et donc indétectable. Cette étape qui requiert la filtration de 0,6 mL environ pourrait cependant perturber le développement initial du dépôt, en accélérant de façon transitoire la capture des micro-organismes.

Les résultats présentés dans ce paragraphe montrent que dans ces expériences préliminaires il a été difficile tant sur le plan de la mise en œuvre du dispositif que de la microscopie d'établir les conditions optimales pour aboutir à une analyse quantitative rigoureuse de l'organisation des micro-organismes dans les dépôts biologiques. Néanmoins, ces travaux ont permis de dégager les conditions de mise en œuvre les plus pertinentes par rapport aux limites et contraintes méthodologiques, qui, une fois connues, permettront de concevoir des expérimentations « idéales » sans interférences. Ainsi, l'acquisition et traitement d'images pour étudier les premières couches d'un dépôt de levures ont permis d'obtenir des informations locales originales sur ses caractéristiques (taux de vide). Cette technique appliquée à l'étude de l'organisation tridimensionnelle d'un dépôt mixte, a pu mettre en évidence une répartition hétérogène des deux espèces. Elle a montré une stratification des levures et des bactéries, les levures apparaissant plus concentrées en profondeur alors que les bactéries sont majoritairement présentes à la surface du dépôt.

Lors de ces expériences, le rôle de l'augmentation de la pression sur l'organisation globale des espèces a été recherché. L'analyse des images obtenues pour le même dépôt à des pressions différentes montre que, pour les trois pressions testées, les histogrammes traduisant la répartition des espèces en fonction de la profondeur ont approximativement la même allure. Ceci signifie que dans les conditions expérimentales utilisées, compte-tenu de la résolution, la variation de la répartition des micro-organismes dans la zone analysée du dépôt n'est pas significative. Ainsi, sur cette zone, l'augmentation de PTM n'induirait pas un déplacement des plus petits micro-organismes entre les plus gros, mais peut-être contribuerait à « resserer » une organisation déjà établie aux faibles pressions transmembranaires. Cependant ces observations n'étant réalisées que sur la partie supérieure des dépôts, il serait nécessaire de réaliser une analyse à des profondeurs plus importantes, sur toute l'épaisseur du dépôt pour réellement conclure sur la possibilité d'un déplacement des petites particules.

### **III - Conclusion**

Cette partie concerne la caractérisation de structures microbiennes sous contraintes hydrodynamiques maîtrisées. Les expériences et résultats ont concerné des dépôts microbiens constitués de micro-organismes modèles obtenus par filtration frontale. Le mode spécifique de préparation des cultures de micro-organismes a permis de s'affranchir de nombreux phénomène afin de ne cibler l'analyse que sur les effets des contraintes pouvant être corrélés à la taille et à la morphologie des cellules. Une cellule de filtration spécifiquement conçue pour cette étude a permis de réaliser des observations directes en microscopie confocale afin de suivre la structuration et l'organisation des micro-organismes dans des dépôts mono-espèces et mixtes *in-vivo* et *in-situ* soumis à différentes pressions transmembranaires. Ces observations ont été confrontées aux résultats de filtration afin de mieux comprendre les relations « structure/ organisation/ performances ».

Dans les conditions opératoires des essais réalisés dans ce travail, la mesure des épaisseurs des dépôts à partir des images acquises a conduit à définir les limites de cette stratégie permettant d'aboutir à un résultat quantitatif satisfaisant dans le cas de structures denses. En effet, au-delà d'une épaisseur critique évaluée à environ 20 à 30 µm selon les caractéristiques des micro-organismes (taille, intensité de fluorescence) et les performances du microscope, la densité du dépôt est apparue être un réel obstacle à l'analyse locale de ses caractéristiques. Les signaux tant à l'excitation qu'à l'émission peuvent en effet être très atténués lors de leur passage au travers de la structure. L'étude globale de dépôts concentrés par cette méthodologie est donc limitée à l'analyse d'une épaisseur sur quelques dizaines de microns.

D'autres paramètres relatifs à la structuration des dépôts ont pu être étudiés grâce à cette méthode ; il s'agit en particulier du taux de vide. Les expériences réalisées ont ainsi pu mettre en évidence des différences de propriétés qui semblent liées à la morphologie et à la taille des micro-organismes modèles utilisés.

Pour des dépôts de levures, les taux de vide mesurés par analyse d'images à différentes pressions dans une gamme de 50 à 300 mbars, apparaissent cohérents avec les taux de vide obtenus à partir des résultats expérimentaux de filtration en utilisant l'équation de Koseny-Carman. Ce taux de vide serait ainsi de l'ordre de 15 %, confirmant certaines données bibliographiques et montrant les limites d'une modélisation des levures par des sphères monodisperses pour lesquelles le taux de vide ne serait pas inférieur à 26 %. La méthodologie d'observation employée semble donc pertinente dans le cas de ce micro-organisme pour réaliser une analyse globale ou locale du taux de vide sur l'épaisseur de dépôt pouvant être visualisée.

L'analyse du dépôt bactérien, dont la résistance spécifique est supérieure à celle du dépôt de levures pures et du dépôt mixte, indique quant à elle un taux de vide très faible, voire nul. Néanmoins, cette évaluation semble faussée par le niveau de résolution des images qui dans les conditions expérimentales des observations est incompatible avec la taille de ces micro-organismes. L'utilisation d'objectifs plus performants (grossissement, ouverture numérique) permettrait d'améliorer la résolution mais impliquerait une ré-adaptation de la chambre de filtration utilisée. Le peu de données disponibles, la disparité des résultats disponibles dans la bibliographie concernant les dépôts bactériens, et la morphologie de ces bactéries typiquement non sphériques, rendent complexe la détermination du taux de vide à partir des mesures obtenues en filtration en utilisant l'équation de Koseny-Carman. Dans le cas de micro-organismes de petite taille (inférieure à 2  $\mu$ m environ) ce type d'approche doit donc être perfectionné.

La localisation des différentes espèces a également été étudiée dans la zone accessible aux longueurs d'ondes, en ciblant une tranche de faible épaisseur dans laquelle les paramètres d'analyse peuvent être maintenus constants. Bien que peu ou pas d'évolutions de l'organisation relative des espèces n'aient pu être mises en évidence par l'analyse d'image au cours des filtrations, probablement du fait des limites pré-citées (profondeur de champ réduite, résolution parfois limitante), les résultats montrent cependant une évolution de la résistance des dépôts sous l'effet de la pression. Les micro-organismes étant supposés indéformables dans les conditions de ces essais, l'hypothèse de ré-organisation et/ou de rapprochement des cellules à l'intérieur des dépôts a été proposée, guidée par l'observation d'une répartition de tailles des micro-organismes hétérogène même pour les dépôts « purs ». En effet pour des populations présentant une répartition de tailles, les espèces de taille inférieure pourraient se retrouver dans les interstices constitués par celles de taille supérieure.

L'analyse de dépôt mixte a pu également mettre en évidence une organisation hétérogène, avec une proportion plus importante des levures en profondeur et des bactéries en surface.

L'ensemble des résultats obtenus a ainsi permis :

- d'évaluer la pertinence de l'utilisation de micro-organismes autofluorescents pour réaliser des observations *in situ* et *in vivo* en 3D d'un dépôt microbien afin d'en déterminer localement et globalement les caractéristiques et,

- de préciser la plage d'application de cette stratégie qui est apparue liée non seulement aux spécificités des micro-organismes utilisés et des structures formées mais aussi aux limites des outils optiques et du traitement d'image. Ainsi, il ressort que cette stratégie apparait bien adaptée à l'étude de dépôts d'épaisseur faible ou modérée (au maximum 20 à  $30 \ \mu$ m) ou peu denses, constitués de micro-organismes de taille supérieure à 2  $\ \mu$ m environ (dans les conditions de nos essais) et possédant un bon niveau d'expression de la fluorescence.

Dans ces conditions, un suivi en temps réel de la croissance d'un dépôt et de l'organisation des espèces serait donc tout à fait envisageable. Ceci pourrait par exemple être réalisé dans le cas de l'étude de la filtration continue d'une suspension diluée, en conditions frontales ou tangentielles. Dans ce cas, la séquence d'acquisition d'images devrait être réalisée à partir de la membrane. Pour cela, afin de pouvoir repérer cette dernière, elle devrait préalablement être marquée par un fluorochrome n'ayant aucune interférence avec ceux portés par les micro-organismes. Rappelons que, à l'opposé, dans les essais réalisés, l'observation débutait par le haut après que le dépôt ait été formé, la membrane étant invisible car non fluorescente.

Enfin, ces expériences ont mis en évidence que, quelle que soit l'épaisseur du dépôt microbien considéré, la précision de la détermination du taux de vide était tributaire des limites optiques du dispositif de microscopie utilisé (résolution) et également du choix des paramètres retenus lors du traitement d'image (zones de faible ou de forte densité au dessus ou au dessous du cœur d'un dépôt inhomogène). Ainsi, en particulier pour des micro-

organismes de trop petite taille (< 2  $\mu$ m), le taux de vide est sans doute sous-estimé. L'amélioration de la résolution par des choix optiques adaptés, associée à une réduction de la zone scrutée, pourrait sans nul doute améliorer la qualité des analyses et la quantification des analyses.

Enfin, dans ces essais, les conditions ont été spécifiquement établies pour s'affranchir de phénomènes biochimiques parasites (cultures en phase stationnaire, rinçages, milieux salins). Or, dans de nombreuses opérations de filtration, les micro-organismes sont en suspension dans un milieu complexe et évolutif qui peut contribuer au colmatage par différents phénomènes : interactions membrane/solutés ou solutés/cellules, croissance des micro-organismes en suspension et sur la membrane (par apport convectif de nutriments), renforcement de la cohésion du dépôt. Aussi, il serait d'un grand intérêt de prolonger cette approche en intégrant graduellement différents niveaux de complexité du fluide pour tendre vers l'étude de la filtration de milieux biologiques réels.

# Résultats Chapitre III : Etude d'agrégats biologiques de type biofilms

#### I - Contexte de l'étude

Afin d'évaluer la potentialité d'étudier le développement et l'organisation d'un autre type d'agrégat de type biofilm, un biofilm modèle a été réalisé avec les souches recombinantes *E. coli* exprimant la protéine DsRed-express et *S. cerevisiae* exprimant la protéine Gfp, les micro-organismes autofluorescents ont tout d'abord été étudiés indépendamment en cultures discontinues afin d'étudier l'influence de conditions environnementales (milieu, aération) sur l'expression de la fluorescence.

Les résultats des expériences précédentes pour la caractérisation des conditions opératoires permettant une bonne influence sur la fluorescence ont permis de définir les conditions suivantes.

Les cultures seront régulées de façon à maintenir des conditions non limitantes d'oxygène, le glucose sera le facteur limitant pour la croissance, ainsi la concentration en glucose résiduel dans le réacteur devra être quasiment nulle, le glucose fourni en entrée à un débit inférieur aux capacités maximales d'assimilation de la souche devant être totalement et rapidement consommé. De plus, même si certaines expériences ont montré qu'une concentration élevée en glucose pouvait compenser l'effet « inhibiteur » de conditions d'aération faible pour la levure, le glucose peut également jouer un rôle inhibiteur de l'expression de la fluorescence chez *E. coli*.

## II - Culture continue

Un biofilm mixte composé de levures et de bactéries a été réalisé. Compte tenu des différences significatives de taux de croissance de ces deux espèces, la stratégie retenue a consisté à simuler la contamination par une bactérie d'un biofilm de levures.

Le dispositif conçu pour obtenir le développement d'un biofilm (réacteur en mode continu associé à une boucle de circulation) a été présenté de façon détaillée dans la partie « matériel et méthodes » (cf paragraphe V).

Les micro-organismes modèles étudiés ayant des comportements physiologiques très différents, en particulier le taux de croissance maximal de la bactérie étant supérieur à celui de la levure, l'expérience a été initiée avec la levure en culture pure, tout d'abord en mode discontinu (batch) avec avec du glucose à 20 g/L comme seule source de carbone, puis en mode continu, la culture étant alimentée en milieu frais à 20 g/L de glucose, à un débit de 0,2

L/h (taux de dilution 0,2 h<sup>-1</sup>). Les conditions ont été maintenues sur une durée suffisante pour permettre la colonisation par les levures des supports en polyéthylène prévus pour le développement du biofilm.

A la fin du sixième jour en mode continu, le lactose est ajouté au milieu frais en entrée à une concentration de 10 g/L. Après 10 heures de culture (soit environ deux temps de séjour) la bactérie a été inoculée pour simuler une contamination au sein du biofilm levurien. Le délai de 10 heures a été choisi afin de faciliter l'implantation de la bactérie, le lactose, qui est non consommé par les levures, s'étant accumulé dans le réacteur. Puis le taux de dilution sera diminué à 0,1 h<sup>-1</sup>. Ces conditions opératoires ont permis aux micro-organismes de se développer à la fois en suspension dans le réacteur et d'adhérer aux coupons, permettant ainsi de suivre et comparer les deux modes de développement pour chacune des souches.

Des prélèvements réguliers ont été réalisés au cours de la culture, afin d'analyser l'évolution dynamique des différents paramètres. On supposera que, dans les conditions expérimentales retenues (notamment en termes de temps de séjour dans la boucle de recirculation, qui est inférieur à une minute), la suspension cellulaire est homogène en tout point du dispositif.

La quantité de biomasse adhérée sous forme de biofilm sur le support ne peut quant à elle être quantifiée de façon précise par les techniques usuelles. Des visualisations de coupons seront réalisées pour évaluer son développement et ses caractéristiques (composition, organisation...).

La figure suivante (Figure 84) présente l'évolution cinétique des concentrations de la biomasse libre en suspension dans le réacteur ainsi que les profils des concentrations des deux substrats utilisés (glucose et lactose).



**Figure 84 :** Courbes de concentration du glucose (•), du lactose (•), et courbe d'évolution de la biomasse totale en suspension dans le fermenteur (•). Les lettres associées aux flèches rouges correspondent aux prélèvements des coupons qui seront observés en microscopie confocale. Les flèches numérotées correspondent au début de la phase de culture continue (1), à l'inoculation du réacteur avec la bactérie (2), à la diminution du taux de dilution de 0,2 h<sup>-1</sup> à 0,1 h<sup>-1</sup> (3).

Les sept premiers jours correspondent à la culture pure de la levure, la bactérie n'étant inoculée qu'au cours du 7ème jour (flèche 2 de la Figure 84). La concentration en levure est alors stabilisée à une valeur de l'ordre de 2 g/L. Après l'inoculation de la bactérie, les mesures globales de biomasse correspondent à la concentration cellulaire totale (levures+bactéries).

Au cours des quatre premiers jours en mode continu, la concentration résiduelle en glucose est faible mais non nulle (de l'ordre de 2,5 g/L), la concentration en biomasse dans le réacteur est d'environ est 1,5 g/L. Une limitation nutritionnelle en acides aminés a été constatée empêchant d'atteindre le régime stabilisé souhaité correspondant à 2 g/L de biomasse et substrat résiduel nul. Le milieu nutritif a donc été complété par un ajout d'acides aminés dans le bidon d'alimentation au  $5^{eme}$  jour de culture. Cette modification de la composition du milieu s'est traduite par une augmentation de la concentration en biomasse jusqu'à 2 g/L avec un rendement de conversion de 0,1  $g_x/g_s$  à substrat résiduel nul. Le régime a été stabilisé pendant 3,5 jours soit sur un temps supérieur à 16 temps de séjour. Ce temps a été nécessaire pour un développement suffisant du biofilm de levures sur les coupons.

L'inoculation de la bactérie, couplée à un apport complémentaire en substrat lactose induit une augmentation rapide de la concentration cellulaire due à la fois à la prolifération des bactéries et à une accumulation accrue de la biomasse.

Afin d'éviter une implantation trop rapide de la bactérie au détriment de la levure, le taux de dilution est diminué à 0,1 h<sup>-1</sup> après 12 heures environ, temps estimé suffisant pour que la

bactérie se soit suffisamment implantée dans le réacteur. Parallèlement à la croissance bactérienne, une diminution de la concentration en lactose dans le milieu est logiquement observée. Pour des raisons techniques, la culture continue a due être interrompue avant que le régime permanent ne soit atteint dans cette deuxième phase. Néanmoins, la colonisation par les bactéries a été suffisante pour induire des modifications importantes sur les biofilms mixtes développés sur les coupons, permettant de réaliser les analyses souhaitées.

Afin de suivre la dynamique d'implantation ou de colonisation de l'espèce bactérienne, des coupons ont été régulièrement prélevés le 4<sup>ème</sup> jour (Flèche A), le 7ème jour (Flèche B), le 9ème jour (Flèche C) et le 10ème jour (Flèche D). Les prélèvements ont été réalisés grâce à une boucle de dérivation qui permet de conserver la stérilité du système sans perturbation de l'écoulement dans les autres segments de la boucle, évitant ainsi des modifications structurelles du biofilm dues à des changements hydrodynamiques. Un échantillon de culture de 20 mL environ est prélevé dans le réacteur au même moment et centrifugé. Les coupons sont délicatement rincés dans le surnageant de culture afin de ne conserver que les cellules adhérées au support et maintenir les mêmes conditions d'environnement pour les micro-organismes que celles existant dans le réacteur. Le biofilm est ensuite observé par microscopie confocale.

Plusieurs zones ont été analysées sur chaque échantillon de support. Des analyses globales ont été réalisées à l'aide de l'objectif X40, sans zoom, permettant l'observation d'une surface xy de  $375 \,\mu$ m sur  $375 \,\mu$ m, soit 140 000  $\mu$ m<sup>2</sup> ou 0,14 mm<sup>2</sup>.

Cette unité de surface en xy de 0,14 mm<sup>2</sup> est gardée constante pour toutes les observations ultérieures au cours du développement du biofilm. Par contre, l'épaisseur du biofilm sera variable en fonction de la croissance des micro-organismes sur le support conduisant à des volumes observés différents qui seront calculés pour chaque coupon.

#### <u>1. Première étape : développement du biofilm de levures : Coupons A et B</u>

Préalablement à l'analyse des coupons, le taux de marquage des levures exprimant la protéine Gfp a été évalué sur la lame sur des échantillons pris dans le réacteur aux temps correspondants aux prélèvements des coupons A et B (Tableau 29).

	Prélèvement réacteur	Prélèvement réacteur
	(temps A)	(temps B)
Nombre total de cellules comptées	284	394
Taux de levures marquées par la protéine Gfp	63 % (+/- 5,2%)	72 % (+/- 4,6%)

Tableau 29 : Analyse des images obtenues pour les cellules en suspension dans le réacteur.

Les conditions d'aération sont maintenues non limitantes dans le réacteur, et les épaisseurs relativement faibles observées au niveau du biofilm ( $\approx 50 \ \mu m$  aux points maximum) laissent supposer qu'il n'y aura pas de limitation d'oxygène au niveau du biofilm. Les taux de marquages obtenus sont de l'ordre de 63 % à 72 %. Le marquage n'est donc pas total et pourrait s'expliquer par l'inactivité ou la mortalité de certaines cellules ou par une perte du plasmide au cours de la réplication cellulaire lors de la culture de la souche (Gupta & Mukherjee, 2001). Néanmoins, la bibliographie indique que la stabilité des plasmides en général est fonction de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux (Zhang et al, 1996; Gupta & Mukherjee, 2001). Ainsi, la diminution du taux de dilution augmente le phénomène de perte du plasmide lors de culture en milieu sélectif (Gupta & Mukherjee, 2001). De même, l'immobilisation des cellules (dans des gels ou des biofilms) augmenterait la stabilité des plasmides (Yang & Shu, 1996; Zhang et al, 1996). Sur la base de ces conclusions, nous poserons comme hypothèse de travail, que le rendement de marquage des cellules vivantes lié à l'expression de la protéine Gfp et donc au maintien du plasmide est total pour les cellules du biofilm. Les cellules considérées comme mortes seront révélées par l'IP. Cette hypothèse mériterait d'être vérifiée en récupérant l'ensemble des cellules adhérées sur le support pour vérifier ex-situ le marquage ou utiliser directement sur le biofilm un fluorochrome capable de marquer toutes les cellules (exemple, DAPI marqueur d'acides nucléiques révélé à une longueur d'onde de 305 nm, proche UV).

Après rinçage des coupons dans du surnageant afin de ne conserver que les cellules adhérées, différentes zones ont été observées (trois à quatre zones situées dans la partie centrale du coupon dans laquelle la contrainte de cisaillement est identique, cf annexe IV). Les volumes occupés par les levures Gfp sur des unités de surface de 0,14 mm<sup>2</sup> ont été mesurés. Une moyenne est réalisée sur les différentes valeurs obtenues et l'écart maximum par rapport à la moyenne est calculé. Un marquage à l'IP a été réalisé sur les coupons afin d'évaluer le taux de mortalité des cellules. L'iodure de propidium a été choisi pour ne

présenter aucune interférence possible avec la fluorescence de la Gfp. Le tableau ci-dessous (renvoi tableau) synthétise les résultats issus des traitements des images et présentent les calculs des volumes occupés par chaque population active exprimant la Gfp et mortes exprimant l'IP). Un témoin non marqué à l'IP a permis également de vérifier qu'il n'y avait pas d'auto-fluorescence du support dans les conditions de visualisation de l'IP.

<u>**Tableau 30 :**</u> Volume occupé par les levures exprimant la Gfp et par les cellules marquées à l'IP pour une surface de 0,14 mm<sup>2</sup>. Les variations maximales par rapport à la moyenne pour les différentes zones du coupon observé sont indiquées entre parenthèses.

	Coupon A (jour 4)	Coupon B (jour 7)
	Moyenne et écart maximum par	Moyenne et écart maximum par
	rapport à la moyenne	rapport à la moyenne
Volume occupé par les levures	21 364 (+/- 2425)	107 255 (+/- 7096)
fluorescentes ( $\mu m^3$ )		
Volume occupé par les levures	23 521 (+/- 4980)	36 466 (+/-3540)
mortes $(\mu m^3)$		
Volume total colonisé ( $\mu m^3$ )	44 885 (+/- 7405)	143721 (+/- 10 636)
Ratio cellules Gfp / totales	47,6 %	74,6 %





Coupon B

Figure 85 : Images obtenue d'après l'observation des coupons A et B et l'acquisition au microscope confocal (objectif X40, zoom 1) (1 unité = 1 coté de petit carré : 37,6 μm)

Le double marquage IP + Gfp permet d'accéder à la fois à la surface totale recouverte par les levures et au taux de levures mortes adhérées sur le support au cours du temps. Les résultats sont reportés dans le Tableau 30 et les images obtenues pour les coupons A (4 jours de colonisation) et B (7 jours de colonisation) sont présentées sur la figure suivante (Figure 86).



**Figure 86 :** Images obtenues lors de l'observation au microscope confocal des coupons A et B (objectif X40 zoom 1). Les levures exprimant la Gfp développées sur la surface du coupon apparaissent en vert et les cellules marquées à l'IP apparaissent en rouge (1 unité = 1 coté de petit carré = 37,6 μm)

Les résultats du tableau 30 et les images associées montrent que le taux de mortalité des levures (cellules marquées à l'IP) semble important sur le coupon A. Ce résultat peut être expliqué du fait de conditions limitantes en éléments nutritifs (acides aminés) pendant toute la période de colonisation considérée des supports, soit les 4 premiers jours en mode continu (Figure 84).

Cette hypothèse de décès due à une limitation nutritionnelle est confirmée par l'analyse du coupon B ; en effet, 3 jours après la levée de la limitation nutritionnelle, la proportion de levures mortes diminue et le biofilm contient quasiment 75 % de cellules vivantes exprimant la protéine Gfp. Le volume global calculé par analyse d'image relatif aux levures Gfp fluorescentes (et donc supposées actives) traduit une croissance des levures d'un facteur 5 au sein du biofilm sur la période considérée soit un taux de croissance moyen de  $0,02 \text{ h}^{-1}$ , taux de croissance 10 fois plus faible que celui imposé pour le développement des cellules en suspension. Le taux de décès moyen est très faible  $0,006 \text{ h}^{-1}$ .

Les résultats obtenus sur le biofilm sont comparés à ceux obtenus pour les cellules en suspension dans le réacteur :

Les échantillons prélevés dans le réacteur (aux temps correspondants aux prélèvements A et B des coupons de biofilms) ont été marqués à l'IP et observés sur lame. Le taux de mortalité (cellules marquées à l'IP sur nombre de cellules total) est calculé et le ratio levures marquées à l'IP/levures marquées à la Gfp est évalué pour pouvoir être comparé à celui des cellules adhérées. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 31).

	F	Prélèvement temps A	Prélèvement temps B
		4 jours	7 jours
	Nombre total de cellules comptées en fond clair	284	394
Réacteur	Nombre de cellules exprimant protéine Gfp	179 (+/- 15)	284 (+/- 18)
	Nombre de cellules exprimant l'IP	41 (+/- 6)	30 (+/- 5)
	Ratio cellules mortes / cellules Gfp	0,23	0,11
	Volume occupé par les levures Gfp (µm <sup>3</sup> )	21 364	107 255
Biofilm	Volume occupé par les levures mortes (µm <sup>3</sup> )	23 521	36 466
	Ratio cellules mortes / cellules Gfp	1,10	0,34

<u>**Tableau 31**</u> Analyse des images obtenues pour les cellules en suspension dans le réacteur et dans le biofilm. Les variations maximales par rapport à la moyenne pour les différents comptages sont indiquées entre parenthèses.

Le tableau ci-dessus montre une réduction du taux de mortalité entre les 2 prélèvements successivement réalisés que les levures soient en suspension ou adhérées. La limitation nutritionnelle ayant été levée dans le milieu, le taux de mortalité diminue d'un facteur 2 pour les cellules en suspension et d'un facteur 3 quand elles sont adhérées. Les phénomènes de croissance ont clairement été mis en évidence précédemment aussi bien pour les cellules en suspension (taux de croissance = taux de dilution hydraulique =  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ) que pour le biofilm (taux de croissance estimé à  $0,02 \text{ h}^{-1}$ ) où la croissance est cependant plus lente. En outre, au vu des ratios « cellules mortes / cellules Gfp » le taux de levures mortes semble plus élevé au sein du biofilm qu'en suspension.

Sur la figure 86, les levures apparaissent surtout regroupées ce qui peut être dû soit à des interactions de surface entre levures favorisant leur rapprochement, soit à une croissance propre des cellules. L'observation du coupon B (Figure 86) conduit à privilégier le phénomène de croissance des levures adhérées sur le support plutôt qu'un effet d'interactions physico-chimiques entre levures adhérées et levures en suspension induisant l'adhésion au biofilm de ces dernières. En effet, l'observation plus précise des levures, (zoom X3 lors de la même acquisition), permet de visualiser très nettement des levures bourgeonnantes (Figure 87).



**Figure 87 :** Image obtenue d'après l'observation de levures se développant sur les coupons et l'acquisition au microscope confocal (objectif X40, zoom 3). Un grossissement est ensuite réalisé après reconstruction de l'image.

Ces images confirment la capacité de la souche de levure *S. cerevisiae* PJ69 utilisée à former des biofilms et à continuer à se reproduire une fois adhérée sur le support. Des biofilms levuriens (mono ou pluri-espèces) ont été mentionnés dans la bibliographie que ce soit pour le genre *Saccharomyces*, certaines espèces de *S. cerevisiae* (Kawarai *et al.*, 2007) ou pour le genre *Candida*, qui en se développant sur des surfaces est à l'origine de maladies infectieuses (Kumamoto, 2002 ; Nett & Andes, 2006).

# 2. Deuxième étape : développement du biofilm mixte levures-bactéries : Coupons C et D

L'inoculation de la bactérie a lieu après 7 jours de culture de la souche *S. cerevisiae* en mode continu et 10 heures environ après le prélèvement du coupon B. Comme indiqué précédemment, le taux de dilution est diminué à  $0,1 h^{-1}$  afin de ralentir l'implantation des deux souches et pouvoir suivre l'évolution du biofilm mixte.

Des coupons sont prélevés dans la boucle après 9 et 10 jours (soit 2 jours et 3 jours après la contamination par l'espèce *E. coli*), puis observés en microscopie confocale. Les marqueurs de viabilité ou d'activité disponibles ne peuvent plus être utilisés car ils interfèrent avec l'une ou l'autre des protéines fluorescentes exprimées par les deux souches. Donc seuls les ratios levures/bactéries pourront être exploités dans cette partie, les 2 genres microbiens étant supposés dans un état physiologique « métaboliquement actif » puisqu'exprimant les protéines Gfp et DsRed express. Les résultats obtenus pour les coupons C et D sont présentés

dans le tableau ci-dessous, les résultats obtenus pour les coupons A et B sont rappelés également (Tableau 32).

		1	1	
	Coupon A	Coupon B	Coupon C	Coupon D
	(jour 4)	(jour 7)	(jour 9)	(jour10)
Volume occupé par les levures	21364	107 255	109 858	226 293
fluorescentes (µm3)	(+/- 2425)	(+/- 7096)	(+/- 6902)	(+/- 32650)
Volume occupé par les bactéries			80 384	766 792
(µm3)			(+/- 7904)	(+/- 20117)

**Tableau 32 :** Volume occupé par les levures exprimant la protéine Gfp, et par les bactéries exprimant la protéine DsRed-express pour une surface de 0,14 mm2. Les variations maximales par rapport à la moyenne pour les différentes zones observées sont indiquées entre parenthèses.

Dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées, l'implantation des bactéries semble avoir, à court terme, un impact sur l'adhésion des levures. En effet, le volume calculé comme occupé par les levures n'a quasiment pas évolué entre les jours 4 et 7 (coupons B et C). La colonisation par les bactéries est rapide et importante puisque le volume occupé par les bactéries a été multiplié par un facteur 10 en 24 heures. Le taux de croissance calculé sur les volumes obtenus par traitement d'image est de 0,094 h<sup>-1</sup>, soit un taux de croissance identique au taux de dilution. On constate par ailleurs qu'il n'y a pas de développement du biofilm de levures entre le jour 7 et 9, puisque compte-tenu des incertitudes de mesures, le calcul du volume occupé par les levures n'augmente quasiment pas au cours des 10 premières heures qui suivent la contamination du milieu par la bactérie (Tableau 32), ceci pouvant être dû à la stabilisation du biofilm de levures dans les conditions expérimentales avant l'inoculation de la bactérie ou à une inhibition du développement des levures due à la présence de la bactérie.

Une reprise de la croissance de la levure au sein du biofilm est cependant observée par la suite avec un taux de croissance de  $0,03 \text{ h}^{-1}$  soit peu différent de celui calculé dans le cas de la levure seule. Lors de cultures mixtes ou pluri-espèces, des interactions microbiennes peuvent survenir. Parmi les différents types d'interactions, on peut citer le commensalisme, l'amensalisme, la symbiose etc... D'après la bibliographie, la co-agrégation d'une souche procaryote (bactérie) et d'une souche eucaryote (levure) peut favoriser le développement de l'une ou l'autre des espèces présentes (symbiose) ou au contraire l'inhiber (Adam *et al*, 2002 ; Trachoo & Brooks, 2005 ; Kawarai *et al*, 2007). Il n'existe pas de règle globale pré-établie, et les phénomènes générés vont dépendre de nombreux paramètres tels que les taux de

croissance respectifs des deux souches, qui vont notamment régir les phénomènes de compétition pour un même substrat. Parmi les facteurs pouvant intervenir, on peut également citer les ratios de concentrations des espèces en solution, la capacité à s'adhérer à une surface (Millsap et al, 2000; Donlan et al, 2002), mais également des paramètres environnementaux, comme la composition du milieu de culture, la nature du support ou l'hydrodynamique locale qui peut influencer l'adhésion ou le détachement de particules de tailles différentes (Millsap et al, 2000; Donlan et al, 2002). Du fait de l'utilisation de 2 sources de carbone dans le milieu nutritionnel, la compétition pour un même substrat semble écartée. Les taux de croissance intrinsèques de chacune des souches auraient pu intervenir si les cultures avaient été conduites en mode discontinu, cependant, le mode continu utilisé pour ces essais, fixe le taux de croissance pour les deux micro-organismes via le taux de dilution. On peut donc supposer que la colonisation du support par la bactérie soit privilégiée du fait d'une capacité à adhérer supérieur de ces micro-organismes, grâce à la mise en place de mécanismes d'adhésion (pilis, sécrétion d'EPS...). On peut également supposer que la bactérie peut avoir une d'affinité plus grande pour le support que les levures au niveau de zones non colonisées par ces dernières (interactions physico-chimiques spécifiques). Néanmoins, du fait de l'épaisseur du biofilm et de la position plus profonde de la levure (initialement implantée) dû au recouvrement par la bactérie, des limitations nutritionnelles pourraient également intervenir.

L'évolution en 24 heures (coupons C et D) de l'organisation et de la colonisation de différentes zones des coupons sont présentées sur les figures ci-dessous (Figure 88).



**Figure 88 :** Images obtenues d'après l'observation des coupons C (à gauche) et D (à droite). Les levures apparaissent en vert et les bactéries en rouge. L'acquisition au microscope confocal est réalisée à l'objectif x40, zoom 1 (1 unité = 1 coté de petit carré = 37,6 μm). Surface observée en xy = 376 μm X 376 μm.

Ces images permettent de mettre en évidence que contrairement à l'analyse de dépôts mixtes ou bactériens dans le chapitre précédent, il ne semble pas y avoir de phénomène d'atténuation très marqué des micro-organismes dans l'épaisseur du biofilm. En effet, malgré des épaisseurs pouvant atteindre localement une cinquantaine de microns (zone centrale de l'image de droite Figure 88), les micro-organismes même situés en profondeur apparaissent bien fluorescents. Ceci peut en partie s'expliquer par une densité apparente plus faible des biofilms contrairement à celle observée sur les dépôts réalisés sous pression qui apparaissent très compacts, ainsi les phénomènes de saturation semblent être de moindre importance. On peut également supposer que, dans les conditions de cette expérience, les limitations nutritionnelles précédemment évoquées, qui pourraient altérer la fluorescence des levures en profondeur ne soient pas pénalisantes.

Les visualisations permettent d'apporter une information complémentaire sur le mode de développement des bactéries : contrairement aux levures qui se développent en amas, les bactéries forment un « tapis », elles recouvrent toute la surface du support et s'insèrent également dans les agrégats de levures. Kawarai *et al*, 2007, avaient noté également ce développement en « tapis » des bactéries, qui formait la couche basale d'un biofilm mixte levures-bactéries, les levures apparaissant au-dessus. Par ailleurs, Adam *et al*, 2002, ont montré que dans biofilms mixtes levures-bactéries réalisés avec les souches *Candida albicans* et *Staphylococcus epidermis*, ces souches ayant des taux de croissance proches dans les conditions utilisées, les bactéries se trouvaient aussi bien au-dessous qu'au dessus des levures.

Nos résultats confrontés à ceux de la bibliographie montrent que la structuration et l'organisation de micro-organismes de genre, espèce et morphologie différents sont relativement différentes selon les types de couples microbiens choisis. L'utilisation dans des biofilms des micro-organismes auto-fluorescents construits pour cette étude démontre leur pertinence dans l'apport de connaissances nouvelles sur l'organisation et la structuration des agrégats biologiques.

#### 3. Discussion

L'étude réalisée dans ce chapitre a eu pour objectif de caractériser et quantifier le développement d'un biofilm mixte dans des conditions environnementales maîtrisées (composition du milieu, aération, température, hydrodynamique...). Ainsi, une culture

continue a été réalisée avec la mise en place d'une boucle de recirculation dans laquelle des coupons de polyéthylène sont soumis à un flux de recirculation de milieu de 45 mL/min, correspondant à une vitesse d'écoulement tangentielle de 0,015 m/s. Ces conditions permettent d'assurer l'homogénéité du milieu dans tout le dispositif, tout en maintenant une vitesse d'écoulement très faible au niveau de la surface du coupon (inférieure à 0,01 m/s). La contrainte de cisaillement est donc minimisée et relativement homogène sur la partie centrale du coupon (inférieure à 0,1 Pa) (cf annexe IV). Ceci permet de ne pas perturber l'adhésion des micro-organismes et de ne limiter leur détachement, et ainsi faciliter la formation de biofilms. En effet, des chercheurs s'intéressant au détachement de levures adhérées sur un polymère plastique (PVC) ont montré qu'une contrainte de cisaillement de 1 à 3 Pa selon la souche pouvait décrocher 50 % des levures adhérées (Guillemot *et al.*, 2007).

Dans notre système, la capacité de la levure *S. cerevisiae* à adhérer aux coupons de polyéthylène et à s'y développer a ici été démontrée grâce à l'analyse des images acquises en microscopie confocale, à la fois par la présence de cellules bourgeonnantes et par l'évaluation des taux de croissance au niveau du biofilm. Ce taux de croissance, relativement faible par rapport à celui des levures dans le réacteur  $(0,2 h^{-1} \text{ sur les premiers jours})$  est en accord avec les observations d'autres chercheurs ayant mis en évidence une capacité moindre de *S. cerevisiae* à développer des biofilms que d'autres levures telles que *Candida albicans* (Chandra *et al.*, 2001a). La structure du biofilm dans une première phase (jusqu'au jour 7) est également en accord avec celle décrite par ces auteurs, le biofilm ne se développant pas en « tapis » d'épaisseur homogène mais plutôt en agrégats répartis de façon hétérogène sur le support.

Les contraintes temporelles de cette étude et l'objectif étant d'étudier un système mixte, l'implantation de la bactérie a été initiée rapidement avant d'avoir confirmé la stabilisation du biofilm de levures. La possibilité du développement d'un biofilm épais mature, tel que Reynolds & Fink, 2001, le suggèrent dans leurs travaux n'a pu être analysée dans cet essai. Ces auteurs indiquent en conclusion de leur article que leur souche de levure *S. cerevisiae* était non seulement capable d'adhérer à des surfaces plastiques solides, mais qu'elles pouvaient former des biofilms denses et pluricouches sur des coupons de polystyrène, sans préciser toutefois l'épaisseur du biofilm obtenu ou la présence ou non d'exopolymères. Il est donc délicat de conclure sur la réelle aptitude de la souche utilisée à former ce type de biofilm, d'autant que bien que la capacité d'adhésion de la levure *S. cerevisiae* à différentes surfaces ait été mentionnée dans la bibliographie, cette levure n'est pas habituellement réputée

capable de former des biofilms dits « matures ». Cela est, notamment lié au fait de son incapacité à produire des exopolymères, ou EPS, comme ont pu le montrer Chandra *et al.*, 2001a, composés qui entrent dans la composition de la gangue d'exoploymères, et contribuer à la formation des biofilms dits « matures ». En effet, le rôle primordial des exopolymères dans la formation et la structuration de biofilms a largement été mis en évidence, aussi bien chez d'autres types de levures telles que *Candid*a (Chandra *et al.*, 2001a), que chez de nombreux micro-organismes tels que *E. coli* (Danese *et al.*, 2000 ; Beloin *et al.*, 2008).

Dans notre étude, la capacité d'adhésion de la levure ainsi que celle de la bactérie sur des coupons de polyéthylène a pu être mise en évidence. Bien qu'il n'y ait pas, à notre connaissance, de références bibliographiques décrivant l'adhésion de levures S. cerevisiae sur le polyéthylène, Reynolds & Fink, 2001 ainsi que Chandra et al., 2001a, ont montré qu'elles pouvaient adhérer à d'autres types de surfaces plastiques (polypropylène, PVC, polystyrène, polyméthylméthacrylate...). De plus, de nombreux chercheurs comme dans nos expériences ont mis en évidence l'adhésion de bactéries sur le polyéthylène et ont pu montrer le développement de biofilms mono-espèces constitués d'E. coli (Yu et al., 2010 ; Seyfriedsberger et al., 2006) ou de Staphyloccocus aureus (Seyfriedsberger et al., 2006) ainsi que de biofilms mixtes (Yu et al., 2010 ; Seyfriedsberger et al., 2006). Dans les expériences réalisées au laboratoire avec des micro-organismes issus d'eau de rivière, les biofilms obtenus sur polyéthylène atteignent jusqu'à 1 mm d'épaisseur (Ochoa et al., 2007; Derlon et al., 2007), témoignant du potentiel de ce matériau dans le cas d'une population mixte contenant divers micro-organismes présentant probablement une importante variété de caractéristiques de surface. Yu et al., 2010 ont pu mettre en évidence que le polyéthylène utilisé dans leur expérience avait une surface relativement lisse (non quantifié) comparée à la surface rugueuse des composés métalliques, ce qui pouvait expliquer une capacité à développer des biofilms moins importante que les composés métalliques étudiés par ces auteurs. Coquet et al., 2002, observent la même tendance avec une mesure de rugosité (RA) de 0,08 µm pour une matière plastique comme le PVC, contre des rugosités de 3 à 5 µm pour le bois ou le béton (RA). Les observations en microscopies électroniques que nous avons réalisées sur nos coupons de polyéthylène montrent une surface hétérogène, avec la présence d'aspérités et de stries atteignant plusieurs micromètres de large, pouvant ainsi contribuer à une adhésion hétérogène des levures. De plus, les mesures de rugosité arithmétique de 0,74  $\mu$ m +/- 0,11  $\mu$ m, c'est-àdire 10 fois supérieure au PVC observé par Coquet et al., 2002, et de rugosité maximale de 6,3 µm +/- 1,3 µm (cf annexe III) traduisent une surface suffisamment accidentée pour faciliter l'adhésion de levures et de bactéries dont la taille respective est de 1 à 5  $\mu$ m.

D'autres facteurs, en particulier les propriétés physico-chimiques de surface respectives du matériau et des micro-organismes (hydrophobicité, potentiel zéta), non caractérisés dans notre étude, peuvent également intervenir dans le phénomène d'adhésion (Harkes *et al.*, 1990; Kang & Choi, 2005; Guillemot *et al.*, 2006). Ainsi, les données bibliographiques indiquent que le polyéthylène présente un caractère hydrophobe (Higashi *et al.*, 1996) et une charge de surface négative aux pH auxquels nous travaillons (Seyfriedsberger *et al.*, 2006). Les propriétés de surface des micro-organismes dépendent quant à elles non seulement de nombreux paramètres environnementaux mais également de l'état physiologique. Ainsi, deux souches d'une même espèce peuvent présenter des caractéristiques différentes (Guillemot *et al.*, 2006; Harkes *et al.*, 1990) et une même souche peut avoir des propriétés de surface différentes selon son stade de croissance et le milieu dans lequel elle se développe (Vazquez-Juarez *et al.*, 1994; Guillemot *et al.*, 2006).

De plus, d'autres propriétés des micro-organismes telles que la présence de molécules ou d'appendices de surface, propre à chaque micro-organisme, interviennent également dans les capacités d'adhésion au support. Chez la levure S. cerevisiae, Reynolds & Fink, 2001, comme d'autres auteurs (Zara et al., 2005), ont démontré que la présence de gènes codant pour des protéines de surface ayant des propriétés hydrophobes, tel que le gène FLO11, jouait un rôle prépondérant dans l'adhésion des cellules entre elles et sur des surfaces solides ou à l'interface air-liquide. Néanmoins, la levure n'est pas connue pour posséder des appendices de surface, bien que Day et al., 1975 aient observé de petits fimbriae chez certaines souches de levures, dont S. cerevisiae, impliqués dans le phénomène d'adhésion ou de floculation. Cependant, ces auteurs indiquent qu'ils sont peu nombreux chez les souches non-flocculantes, ce qui est le cas de la notre. Par contre, la présence de flagelles chez des souches d'E. coli est relatée dans la bibliographie, ces appendices participant à un transport actif des souches et favorisant ainsi le contact avec la surface solide ainsi que le déplacement des bactéries sur la surface à coloniser (swarming) (Pratt & Kolter, 1998). Les pilis, qui sont un autre type d'appendice participent également au processus d'adhésion à la surface solide ou à l'adhésion entre micro-organismes, consolidant ainsi la structure du biofilm (Pratt & Kolter, 1998; Prigent-Combaret et al., 2000). La présence de pili ou de flagelles n'a pas été directement visualisée sur la souche d'E. coli utilisée pour notre étude, mais la mobilité des souches en suspension observée sur lames témoigne de leur capacité à se déplacer. De plus, la présence de gènes codant pour différentes protéines de mobilité (flagelles) ou d'adhésion (pili ou fimbriae) chez la souche E. coli BL21 (DE3) est relatée sur des banques de données bioinformatiques (NCBI, KEGG). La présence de ces appendices peut expliquer l'adhésion et

la prolifération rapide d'*E. coli* sur les coupons de polyéthylène par rapport à la capacité moindre à adhérer et à former des biofilms chez *S. cerevisiae*.

Les conditions hydrodynamiques dans la boucle de recirculation ayant été maintenues constantes, les différences observées dans l'adhésion des deux souches ainsi que dans le développement du biofilm sur les coupons de polyéthylène peut donc s'expliquer par différents facteurs propres à chaque souche :

- capacité d'adhésion due à la présence d'appendices et mobilité des souches,
- capacité à produire des molécules extracellulaires intervenant dans les processus d'adhésion et de formation d'une gangue d'exopolymères participant à la formation et la consolidation d'un biofilm mature.

Dans notre étude, les taux de croissance calculés pour *S. cerevisiae* dans le réacteur et sur les coupons dans la première partie en culture pure ont montré un taux de croissance sur les coupons de  $0,02 \text{ h}^{-1}$  nettement inférieur au taux de croissance dans le réacteur  $(0,2 \text{ h}^{-1})$ . Le taux de croissance de *E. coli* sur les coupons a quant à lui été d'environ  $0,1 \text{ h}^{-1}$  sur la phase de culture mixte avec un taux de dilution de  $0,1 \text{ h}^{-1}$ . Même si sur la durée de la croissance d'*E. coli*, il n'y a pas eu de limitation au niveau du substrat lactose, celui-ci étant encore en excès lors de l'arrêt de l'expérience, cette souche semble présenter une capacité à former des biofilms supérieur à *S. cerevisiae*. Le taux de dilution restant inférieur à la capacité de croissance des micro-organismes, ceux-ci se développent en suspension et restent présents dans le réacteur (Figure 89).



Jour 8 Jour 9 <u>Figure 89</u>: Photos des micro-organismes en suspension dans le réacteur les jours 8 et 9, le jour 9 correspondant au prélèvement du coupon C.

Les contraintes techniques n'ont pas permis de prolonger sur une durée plus longue l'expérience. Néanmoins, une compétition par rapport au glucose pourrait être envisagée, aussi bien dans le réacteur qu'au sein du biofilm. Cela a en effet pu être observé lors de cocultures lorsque les souches en présence métabolisent le même substrat (Zhang et al., 1995). Pendant cette phase de co-culture, on peut ainsi s'interroger sur les interactions pouvant exister entre les deux micro-organismes tant au sein de la culture que dans le biofilm. Afin de mieux comprendre le processus de développement de chaque espèce dans un contexte possible de compétition et analyser l'influence de l'adhésion sur l'équilibre de la population, nous avons cherché à déterminer les concentrations respectives des levures et des bactéries dans le dispositif. La principale difficulté rencontrée provient du fait que seule une quantification globale de la biomasse a été réalisée dans le réacteur. Pour déterminer les proportions des deux espèces en suspension pendant la co-culture continue, nous avons analysé le devenir des substrats et plus précisément celui du glucose, le lactose étant exclusivement métabolisé par la bactérie. La biomasse correspondant à chaque espèce peut être estimée en se basant sur les rendements expérimentaux de croissance obtenus pour chaque souche pure lors des cultures discontinues aérobies, sur glucose pour S. cerevisiae, et sur glucose et lactose pour E. coli (Tableau 33).

 Tableau 33 :
 Rendements expérimentaux de croissance des micro-organismes modèles issus des expériences menées en culture discontinues aérées, exprimés en « g biomasse/g substrat »

		0
Substrat	S. cerevisae	E. coli
Lactose	0	0,208
Glucose	0,1	0,236

Lors de la co-culture continue, trois hypothèses peuvent être envisagées :

- tout le glucose est consommé par la levure, la bactérie se développant exclusivement sur le lactose.
- tout le glucose est consommé par la bactérie, il n'y a plus de croissance de la levure.
- le glucose est utilisé à la fois par la levure et la bactérie, cette dernière consommant également le lactose

La cohérence de ces hypothèses a été analysée à partir des bilans matière sur les substrats et la biomasse, réalisés aux jours 9 et 10, correspondant aux prélèvements des coupons C et D (Tableau 34).

		Entrée	Sortie	Accumulation	Bilan
				(depuis J0)	(production (+)
					ou consommation (-))
Biomasse	J9	0	14,2	1,7	+ 15,9
	J10	0	24,1	2,8	+ 26
Lactose	J9	55,5	38,2	9,6	-7,5
	J10	79,6	55,7	9,5	-14,6
Glucose	J9	110,9	0	0	-110,9
	J10	159,1	0	0	-159,1

Tableau 34 : Bilans matière globaux, (en g) réalisés sur la co-culture continue aux jours 9 et 10

Si tout le glucose était consommé par la levure et la bactérie tout le lactose, au jour 9 (prélèvement coupon C), compte tenu des rendements respectifs sur glucose et lactose, la masse totale de levures formée serait de 11,1 g, et la masse totale de bactéries formée serait de 1,6 g ce qui entrainerait une biomasse totale de 12,7 g. Or cette dernière est estimée à 15,9 g. Le glucose ne peut donc être consommé uniquement par la levure. Cette conclusion est également retrouvée lors du bilan réalisé pour le jour 10.

Si en revanche tout le glucose était consommé par la bactérie, ce qui impliquerait une non prolifération de la levure, au jour 9 la biomasse totale bactérienne formée (accumulation dans le réacteur + biomasse sous-tirée en sortie) serait de 26,15 g. Or la biomasse totale mesurée (levure+bactérie) est seulement de 15,9 g. Le glucose n'est donc pas uniquement consommé par la bactérie. Cette conclusion est également retrouvée lors du bilan réalisé pour le jour 10.

Le glucose doit donc être consommé simultanément par la levure et la bactérie, cette dernière utilisant également du lactose pour sa croissance. Dans le dispositif, une co-existence des deux espèces a donc lieu ainsi qu'une co-assimilation du glucose. L'évolution des concentrations respectives en bactéries et levures dépendra principalement de la capacité de chaque souche à se développer sur ce substrat. De même que précédemment, à partir des rendements expérimentaux estimés pour les deux souches sur glucose et/ou lactose et de la mesure de la biomasse totale formée (levure + bactérie, accumulée dans le réacteur et soutirée), nous avons cherché de manière itérative les concentrations respectives des deux espèces permettant d'aboutir aux bilans matière sur le glucose et la biomasse totale, sachant que seule la bactérie métabolise le lactose. Ainsi au jour 9, sur 15,9 g de biomasse formée, il y aurait 1,6 g et 5,6 g de biomasse bactérienne provenant respectivement du lactose et du glucose. Le glucose non consommé par les bactéries donnerait lieu à la production de 8,7 g de levure.

L'hypothèse d'une co-consommation du glucose étant la plus probable, les calculs montrent que 79 % du glucose serait consommé par la levure et 21 % par la bactérie. Ces calculs permettent donc d'évaluer qu'au jour 9, 45 % (soit 1,7 g/L dans le réacteur) de la masse microbienne mesurée correspond à de la biomasse bactérienne et 55 % (soit 2 g/L dans le réacteur) à de la biomasse levurienne.

De la même façon, le bilan réalisé entre le début de la co-culture et le jour 10 (prélèvement coupon D) montre qu'à ce jour, 63 % du glucose a été consommé par la levure et 37 % par la bactérie. Nous pouvons également en déduire que 63 % de la masse microbienne mesurée correspond à de la biomasse bactérienne (soit 3 g/L dans le réacteur) et 37 % à de la biomasse levurienne (soit 1,8 g/L dans le réacteur) au jour 10 (Tableau 35).

Ces bilans montrent qu'à distance de la contamination, la proportion de la biomasse bactérienne augmente globalement au détriment de la levure qui se maintient néanmoins dans le réacteur ; la part de glucose consommée par les bactéries augmente donc.

	% en masse des levures	% en masse des bactéries
Jour 9 réacteur	55 % (2 g/L)	45 % (1,7 g/L)
Jour 10 réacteur	37 % (1,8 g/L)	63 % (3 g/L)
Jour 9 coupon	58 % (19 μg /coupon)	42 % (14 μg /caipon)
Jour 10 coupon	23 % (39 µg/ coupon)	77 % (131 µg/caipon)

<u>**Tableau 35</u>** : Répartition des populations bactérienne et levurienne en suspension dans le réacteur et adhérées sur les coupons.</u>

Au vu de ces résultats au sein du réacteur et au niveau du biofilm, on peut se demander si l'adhésion peut modifier le comportement des micro-organismes.

L'observation du biofilm montre globalement les mêmes tendances d'évolution du ratio de populations, avec cependant une augmentation plus importante de la proportion de
biomasse bactérienne adhérée sur la période analysée. En effet, si au jour 9, les mêmes ratios de populations sont retrouvés dans le réacteur et sur les coupons, au jour 10, la proportion bactéries/levures adhérées est plus élevée sur les coupons que dans le réacteur. La bactérie semblerait donc privilégier un mode de développement adhéré.

La quantification de la biomasse, adhérée ou en suspension, confirme cette tendance. En effet, entre les jours 9 et 10 (coupons C et D), lorsque la population bactérienne augmente d'un facteur 2 dans le réacteur (1,7 à 3 g/L), elle augmente d'un facteur 10 sur les coupons et dans le même temps, la population levurienne, qui semble se maintenir dans le réacteur, double sur les coupons. L'augmentation de la masse de levures adhérées semble néanmoins indiquer que l'adhésion de *E. coli* faciliterait celle des levures. Ce phénomène d'interaction entre bactéries et levures a pu être identifié par d'autres chercheurs, notamment dans des cas d'infections ou dans la préparation de produits fermentés (Paramithiotis et al., 2006; Alejandra Golowczyc et al., 2009; Martins et al., 2010). Différents chercheurs ont proposé des modélisations des phénomènes de compétitions entre espèces au sein de biofilms, la plupart se basant sur les taux de croissance des souches (Soda et al., 1999; Khoyi et al., 2005). Davison & Stephanopoulos, 1986, ont étudié la co-existence de souches de S. cerevisiae et d'E. coli dans un chémostat fonctionnant à fort taux de dilution (entre 0,2 et 0.37 h<sup>-1</sup>) avec du glucose comme seule source de carbone, et ont montré qu'en fonction des taux de dilutions et des concentrations de glucose en entrée, on pouvait avoir la prédominance d'une souche ou de l'autre, ou encore la co-existence des deux souches. Les auteurs expliquent leurs résultats notamment par le rôle inhibiteur de certains produits, en particulier l'éthanol et l'acide acétique. Des études au préalable par ces auteurs en mode discontinu (batch) avaient montré une sensibilité importante de la souche de E. coli utilisée à l'acide acétique, avec un arrêt de la croissance dès 0,5 g/L d'acide acétique produit, alors qu'une légère baisse du taux de croissance de la levure n'avait été observée qu'à partir de 2 g/L d'acide acétique (0,45 h<sup>-1</sup> à 1 g/L et 0,4 h<sup>-1</sup> à 2 g/L). Les concentrations d'éthanol et d'acide acétique obtenues dans notre étude restent faibles et inférieures respectivement à 2,5 g/L et 1 g/L et leur effet inhibiteur peut être négligé compte tenu des observations réalisées sur cultures pures.

Dans cette expérience, même si le régime n'a pu être stabilisé, on peut supposer que la compétition vis-à-vis du glucose pourrait entraîner progressivement une élimination de la population levurienne en faveur des bactéries, d'autant plus que la biomasse bactérienne bénéficiera toujours de l'apport de lactose que la levure ne métabolise pas.

#### **III - Conclusion**

Cette partie des résultats s'est focalisée sur l'étude de la génération de biofilms microbiens mono ou pluri-espèces, l'analyse de leur structuration et le suivi de leur développement et de l'organisation des espèces par observation directe en microscopie confocale. Les micro-organismes utilisés sont les micro-organismes autofluorescents précédemment construits et développés qui permettent de réaliser *in vivo* une observation directe de structures biologiques sans marquage préalable des cellules adhérées ce qui évite tout phénomène de modification de la structure créée et une quantification de l'évolution des ratios de population sur les coupons et en dynamique.

Les expériences menées pour analyser les conditions d'expression des protéines fluorescentes (quantité d'oxygène dissous disponible, nature de la source de carbone) ont permis de définir des paramètres opératoires pour réaliser une culture continue de levure *S. cerevisiae* dans laquelle la bactérie *E. coli* a pu être implantée. Le dispositif expérimental correspond à un réacteur couplé à une boucle de recirculation externe dans laquelle sont disposés des coupons autoclavables en polyéthylène servant de support à l'implantation d'un biofilm. Ce système permet en outre de prélever stérilement les coupons au cours du temps, pour un suivi *in-vivo* et en dynamique du développement et de l'organisation du biofilm.

Les structures globale et locale ont ainsi pu être analysées, ainsi que le volume de micro-organismes adhérés formant le biofilm. Les résultats montrent des différences notables sur les taux de croissance en suspension et dans le biofilm pour la levure (respectivement de  $0,2 h^{-1}$  et  $0,02 h^{-1}$ ). L'état physiologique des levures a pu être quantifié en couplant un marqueur d'intégrité membranaire (IP) à la fluorescence intrinsèque des levures. Les résultats obtenus suggèrent que le taux de croissance de cette espèce est 10 fois plus faible pour les cellules se développant dans le biofilm que pour celles en suspension. Ces résultats ont été établis sur la base d'hypothèses fortes (taux de marquage de 100% des cellules dans le biofilm) qu'il conviendra de vérifier par des marquages et une caractérisation *ex-situ* des cellules fixées afin de confirmer ces données.

Dans un deuxième temps, l'analyse dynamique et *in-vivo* du biofilm mixte a pu mettre en évidence le développement rapide des bactéries.

L'analyse de la consommation du glucose et du lactose sur la phase de co-culture a permis de mettre en évidence une co-assimilation du glucose par les deux souches en se basant sur les rendements obtenus par les souches en cultures discontinues sur substrat pur (glucose et/ou lactose). Les calculs réalisés ont également permis de déterminer la proportion

de chaque souche dans la biomasse totale mesurée en suspension et de la comparer à la biomasse adhérée sur les coupons et mesurées par analyse d'image. Ainsi, le comportement des deux souches a pu être comparé et a permis de mettre en évidence que la bactérie semble privilégier un développement adhéré.

Pendant cette phase, l'analyse de la structuration du biofilm a montré un développement différent des deux micro-organismes, avec un développement plutôt en amas pour les levures et plutôt sous forme de « tapis » donc plus homogène pour les bactéries. Il semble que dans le biofilm, les bactéries se développent à un taux de croissance supérieur aux levures, proche du taux de dilution imposé  $(0,1 h^{-1})$ . Les levures semblent privilégier un mode de développement planctonique.

Néanmoins, il aurait été intéressant de pouvoir poursuivre l'expérience sur un temps plus long jusqu'à stabilisation de la formation du biofilm pour analyser la structuration et l'organisation du biofilm mixte mature.

De même, il aurait été intéressant de pouvoir accéder au paramètre viabilité des deux espèces sur les coupons C et D comme sur les coupons A et B. Pour cela, le choix devra se porter sur l'utilisation de l'IP avec les bactéries exprimant les protéines AmCyan en utilisant un microscope à épifluorescence adapté à un suivi convenable de cette fluorescence (pas d'interférence entre l'émission des protéines AmCyan et Gfp).

Cette étude sur les biofilms a également apporté des éléments complémentaires sur le rôle de la compacité des structures sur l'émission de la fluorescence. En effet, sur des épaisseurs de biofilms pouvant atteindre une cinquantaine de microns sur les coupons, aucun phénomène d'atténuation de la fluorescence en profondeur n'a été observé pour ces structures lâches, contrairement à ce que nous avons obtenu sur les dépôts. La densité de l'agrégat est donc un paramètre important qui conditionne la qualité de l'observation et des analyses réalisées en microscopie confocale.

Ces travaux illustrent l'intérêt de la méthodologie mise en œuvre qui apparaît comme un outil pertinent pour l'étude de biofilms modèles mixtes *in-vivo* et en dynamique. En effet elle permet de réaliser à la fois des études globale et locale, et peut être couplée à l'utilisation de marqueurs d'activité grâce à l'utilisation de composés fluorescents ne présentant pas d'interférence avec les protéines fluorescentes exprimées par les micro-organismes recombinants.

# **Conclusion générale**

Ce travail s'inscrit dans le contexte de la caractérisation d'écosystèmes complexes sous contraintes hydrodynamiques et biologiques et plus particulièrement à l'organisation et à la localisation de micro-organismes dans ces structures biologiques suite à ces contraintes. L'objectif poursuivi était de permettre des analyses à la fois globales et locales d'agrégats microbiens, et d'étudier *in-vivo*, voire *in-situ* leurs évolutions temporelles en fonction des contraintes appliquées.

L'étude bibliographique a montré que plusieurs méthodes étaient actuellement disponibles pour étudier ces structures. Parmi ces techniques, beaucoup mettent en jeu des principes ou dispositifs optiques spécifiques. Ainsi la microscopie confocale qui permet des observations au sein d'échantillons épais est largement utilisée pour réaliser des analyses locales. D'autres systèmes ont été développés pour réaliser des études *in situ* (cellules d'observation directe...) afin d'éviter d'altérer les échantillons lors du prélèvement ou pour observer la dynamique d'évolution d'une structure (cellules d'écoulement...). Cependant la plupart des méthodes proposées ne permettent que rarement de réaliser simultanément des analyses globales (morphologie, dimensions...) et locales (organisation des espèces, porosité locale...), et peu d'approches *in-vivo* sont proposées, des traitements, généralement réalisés *ex-situ*, étant nécessaires (méthode FISH par exemple).

Par ailleurs, la possibilité de construire des organismes exprimant des protéines fluorescentes par recombinaisons génétiques a été récemment développée et constitue un outil privilégié pour réaliser des études *in-vivo*.

Ainsi, sur la base de ce bilan bibliographique, la stratégie qui a été proposée dans ce travail a consisté à utiliser des micro-organismes recombinants, la construction étant basée sur l'insertion de plasmides, pour leur conférer la propriété intrinsèque de fluorescence. Ces micro-organismes ont été choisis pour être représentatifs de genres microbiens couramment utilisés dans des procédés biotechnologiques, pour étudier *in-vivo* et sans traitement préalable leur organisation et leur localisation dans des écosystèmes complexes obtenus sous contraintes environnementales maîtrisées (hydrodynamiques, cinétiques ou biochimiques). Les souches recombinantes ont été cultivées et les dynamiques de croissance ont été quantifiées et comparées aux souches sauvages.

Sur la base des travaux réalisés, deux questions scientifiques ont été abordées :

- Comment varie l'expression et/ou la maturation des protéines fluorescentes en fonction des conditions environnementales ?

- Comment les agrégats microbiens s'organisent-ils sous conditions ou environnement maîtrisés ?

Ainsi, l'étude dans des conditions de non-prolifération (dépôts) a permis de privilégier l'impact de l'hydrodynamique et de la morphologie des souches sur l'organisation et la structuration de l'agrégat, en limitant les phénomènes biologiques tels que la croissance ou la sécrétion d'exopolymères. Dans un deuxième temps, l'étude en conditions de prolifération (croissance en biofilms) a permis de prendre en compte les phénomènes biologiques tels que la croissance, la compétition pour un substrat et l'adhésion à des surfaces alors que les contraintes hydrodynamiques sont contrôlées et maintenues constantes pendant la culture.

Le premier chapitre de résultats a concerné l'étude des caractéristiques biologiques et cinétiques des micro-organismes modèles retenus pour cette étude (S. cerevisiae et E. coli). Ainsi les cinétiques identiques (croissance, métabolisme) obtenues pour les souches sauvages et leur(s) recombinant(s) ont permis de valider l'utilisation des souches autofluorescentes en remplacement des souches sauvages. Afin de répondre à la question scientifique sur la structuration des populations au sein d'agrégats biologiques lors de l'application de différentes contraintes, la problématique liée à l'expression de la fluorescence en fonction des conditions de mise en œuvre doit être abordée. Ainsi, les conditions d'aération sont apparues comme un élément important pour la maturation des protéines fluorescentes. Les résultats montrent en effet que lorsque la protéine Gfp extracellulaire est soumise à un flux d'air, la maturation de la protéine suit une cinétique d'ordre 1 dont la constante de temps est de 0,24 h<sup>-</sup> <sup>1</sup> Sur des cellules entières soumises aux mêmes conditions (la protéine est intracellulaire), la cinétique d'augmentation de la fluorescence et donc la cinétique de maturation de la protéine est beaucoup plus lente, soulevant le rôle de la membrane et/ou de la paroi sur l'accessibilité de la protéine à l'oxygène en condition de non-prolifération. Des études menées sur l'impact des conditions d'aération en conditions de prolifération chez la levure (pO2 de 1 % ou de 90 %), qui en fonction des conditions en oxygène dissous et en substrat non-limitant peut présenter deux métabolismes différents (fermentaire ou oxydo-fermentaire). Les résultats ont montré que pour les cultures réalisées à 1 % de pO<sub>2</sub>, l'intensité spécifique de fluorescence était 2,5 fois inférieure à l'intensité spécifique de fluorescence de la culture menée à 90 % de pO<sub>2</sub>, mais que le retour à des conditions aérées permettait de retrouver une intensité de fluorescence de 85 % de la valeur en cultures aérées au bout de 20 h d'aération. Ainsi, les conditions environnementales en oxygène dissous doivent être maintenues non-limitantes afin de favoriser la maturation des protéines fluorescentes exprimées par les souches recombinantes.

Dans un deuxième temps, au-delà de l'aspect aération et en fonction des constructions choisies, une étude spécifique du lien entre expression et environnement physico-chimique de la protéine a été menée, dans l'optique de mener une co-culture. Pour *E. coli*, la construction a été réalisée en utilisant le promoteur lac Z en aval de protéines fluorescentes AmCyan, DsRed-express et ZsYellow. Ce promoteur est connu pour être activé sur lactose mais la bibliographie note qu'il est réprimé partiellement ou totalement sur lactose. En vue de cultures mixtes *E. coli* – *S. cerevisiae* recombinants (la souche *S. cerevisiae* étant construite en utilisant le promoteur ADH1 activé sur glucose, substrat préférentiel de la levure), l'effet des sources de carbone sur l'expression de la fluorescence pour *E. coli* a été quantifié. Ainsi, nos résultats ont montré que le glucose nécessaire à l'expression de la protéine Gfp chez la levure ne provoque pas d'inhibition totale de l'expression de la protéine fluorescente DsRed-express chez la bactérie *E. coli*. Cette inhibition semblant totalement levée si le milieu comporte les deux sources de carbone glucose + lactose, ce dernier étant métabolisé exclusivement par la bactérie, et simultanément au glucose.

Une attention particulière a été portée sur la définition des conditions opératoires lors de l'acquisition des images en microscopie. Compte tenu des capacités des appareils microscopiques utilisés, les associations de micro-organismes les plus pertinentes pour la génération de dépôts ou de biofilms ont été définies afin de limiter notamment les phénomènes d'interférences sur les spectres de fluorescence (en émission et à l'excitation). L'influence des paramètres opératoires lors du traitement des images acquises a été considérée (définition des seuillages, évaluation des limites opératoires etc..) pour conduire à une analyse quantitative la plus rigoureuse possible des images obtenues.

L'étude de dépôts de filtration s'est plus particulièrement attachée à analyser l'influence d'une contrainte hydrodynamique (pression transmembranaire) sur la structure et l'organisation de micro-organismes. Afin de limiter volontairement les phénomènes biologiques, les micro-organismes recombinants ont été cultivés séparément, lavés et mélangés en quantités et proportions connues, afin de générer des dépôts dans des conditions hydrodynamiques contrôlées. L'utilisation des micro-organismes auto-fluorescents dans des dépôts biologiques purs ou mixtes obtenus en filtration frontale a permis de montrer la pertinence de cette stratégie. Si l'approche par traitement d'image s'est avérée limitée par l'épaisseur ( $30 \mu$ m) et la densité des dépôts pour la mesure de l'épaisseur, d'autres paramètres de structure ont pu être étudiés et quantifiés, c'est le cas notamment des taux de vide locaux quantifiés entre 11 et 13 % pour des micro-organismes de la taille des levures, qui se sont avérés cohérents avec les taux de vide calculés à partir des résultats de filtration en sa basant sur l'équation de Kozeny-Carman, et estimés entre 9 et 13 % en fonction de la pression appliquée. L'étude de l'organisation et de la répartition des différentes espèces dans la zone observable (25-30  $\mu$ m environ) a pu également mettre en évidence une répartition hétérogène des espèces microbiennes en profondeur, avec les bactéries retrouvées en surface et les bactéries en profondeur.

Des perspectives d'utilisation de la méthodologie pour étudier des dépôts biologiques plus fin, ou pour étudier l'effet des forces de cisaillement sur des dépôts formés en filtration tangentielle restent des pistes d'études prometteuses.

Dans le cas de l'étude de biofilms, les travaux réalisés ont permis d'apporter de nouvelles connaissances quant à une étude dynamique et *in-vivo* du développement de biofilms, en permettant à la fois une étude globale et locale, et pouvant être couplée à l'utilisation de marqueur d'activité grâce à l'utilisation de fluorochromes ne présentant pas d'interférence avec les protéines fluorescentes exprimées par les micro-organismes recombinants. Les résultats ont montré des différences notables sur les taux de croissance en solution  $(0,2 \text{ h}^{-1})$  puis 0,1 h<sup>-1</sup>) et dans le biofilm  $(0,02-0,03 \text{ h}^{-1})$  pour la levure, c'est-à-dire 4 à 5 fois inférieur à celui des bactéries en biofilm  $(0,09 \text{ h}^{-1})$  qui est proche du taux de dilution imposé. Ces résultats ont pu mettre en évidence un développement privilégié de la levure en suspension. De plus, l'étude des bilans réalisés sur les substrats aux jours 9 et 10 a montré que la bactérie semble au contraire privilégier le développement en biofilm, puisqu'entre les jours 9 et 10, la proportion de bactéries augmente d'un facteur 1,4 en suspension (45 à 63 %), et d'un facteur 1,8 dans le biofilm (42 à 77 %).

La stratégie développée a également montré un développement différent des deux genres microbiens, avec un développement plutôt en amas pour les levures et plutôt sous forme de « tapis » donc plus homogène pour les bactéries.

La confrontation des résultats obtenus sur dépôts et biofilms a également mis en évidence l'influence primordiale de la densité de l'agrégat sur les résultats de l'observation réalisée en microscopie confocale. Le paramètre « densité de l'agrégat » est donc un facteur limitant de la méthode. En outre, la prolifération des micro-organismes sur une surface et la production d'exopolymères mènent au développement de structures moins denses que celles réalisées avec des micro-organismes non proliférant (dépôts), et permet une observation plus en profondeur de l'agrégat (pas de limitation observée sur des épaisseurs de 50  $\mu$ m environ). Dans des cas réels, comme dans des réacteurs à membranes immergées, les dépôts de filtration obtenus sont la plupart du temps composés de micro-organismes mais également d'autres types de molécules et notamment d'exopolymères, et les conditions environnementales (présence de substrats) peuvent également permettre la prolifération de micro-organismes. La limite d'épaisseur de 25-30  $\mu$ m obtenue dans notre étude pour l'observation de dépôts de micro-organismes non-proliférant serait ainsi à reconsidérer.

Les perspectives de ce projet sont nombreuses et peuvent être appliquées dans différents domaines, en élargissant notamment le panel des micro-organismes modèles utilisés :

- dans l'étude de dépôts, les limites rencontrées ont permis de définir des recommandations pour une étude pertinente des dépôts ; la méthode apparaît par exemple adaptée pour l'étude de la formation et de l'organisation de dépôts sur une épaisseur maximale de 30  $\mu$ m, pour l'étude d'un dépôt dont l'épaisseur peut être contrôlée grâce aux forces de cisaillement ou pour l'étude des phénomènes d'adhésion/détachement.

- dans l'étude des biofilms, les premiers résultats sont très encourageants. Ils pourraient être utilisés pour étudier l'organisation d'autres composés au sein du biofilm, en couplant un marquage des exopolymères par exemple (marquage spécifique des lectines). Il pourrait être intéressant d'analyser les interactions de différents micro-organismes d'intérêt au sein d'un agrégat biologique modèle en associant l'implantation d'un micro-organisme donné dans un système complexe mature existant et/ou en quantifiant l'impact des conditions environnementales sur l'organisation et l'activité des micro-organismes et des performances résultantes du système biologique.

# **Références bibliographiques**

#### Adam B., G. S. Baillie, L. J. Douglas (2002)

Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*, *51: 344-349*.

### Alejandra Golowczyc M., P. Mobili, G. L. Garrote, M. de los Angeles Serradell, A. Graciela Abraham & G. L. De Antoni (2009)

Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *Journal of Dairy Research, 76 : 111-116.* 

#### Aldiguier A.S. (2006)

Activité bio-catalytique en haute densité cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* pour l'intensification de la production de bio-éthanol.

Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées, Université Paul Sabatier, Toulouse III.

## Alfenore S, C. Molina-Jouve, S. Guillouet, J.-L. Uribelarrea, G. Goma & L. Benbadis (2002)

Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process.

Applied Microbiology and Biotechnology, 60: 67-72.

#### Allison D. G.& M.A. Sattenstall (2007)

The influence of green fluorescent protein incorporation on bacterial physiology: a note of caution. *Journal of Applied Microbiology, 103: 318 – 324.* 

#### Amann R.I., Krumholz L. & Stahl D.A. (1990 a)

Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*, *172: 762–770.* 

#### Amann R.I., B. J. Binder, R. J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux & D. A. Stahl (1990 b)

Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations.

Applied and Environmental Microbiology, 56: 1919–1925.

#### Amann R., H. Lemmer & M. Wagner (1997)

Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques.

FEMS Microbiology Ecology, 25: 205-215.

### Andersen J. B., C. Sternberg, L. Kongsbak Poulsen, S. Petersen Bjorn, M. Givskov & S. Molin (1998)

New instable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2240-2246.

#### Andersen J. B., B. B. Roldgaard, A. B. Lindner, B. B. Christensen & T. Licht (2006)

Construction of a multiple fluorescence labelling system for use in co-invasion studies of *Listeria* monocytogenes.

BMC Microbiology, 6: 86-94.

#### Aoi Y. (2002)

In situ identification of microorganisms in biofilm communities. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94: 552-556.

#### Auling G., F. Pilz, H. J. Busse, S. Karrasch, M. Streichan & G. Schön (1991)

Analysis of the polyphosphate-eliminating microflora in phosphorus-eliminating, anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp.

Applied and Environmental Microbiology, 57: 3585–3592.

#### B

#### **Bacchin P. (1994)**

Formation et résistance au transfert d'un dépôt de colloïdes sur une membrane d'ultrafiltration. *Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse III.* 

#### Baird G. S., D. A. Zacharias & R. Y. Tsien (2000)

Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America* (PNAS), 97: 11984-11989.

#### Bastias B. A., I. C. Anderson, Z. Xu & J. W. G. Cairney (2007)

DNA- and DNA-based profiling of soil fungal communities in a native Australian eucalypt forest and adjacent *Pinus elliotti* plantation. *Soil Biology and Biochemistry*, *39: 3108-3114*.

#### Becker S., P. Boger, R. Oehlmann & A. Ernst (2000)

PCR bias in ecological analysis: A case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4945-4953.

#### Beloin C., A. Roux & J.-M. Ghigo (2008)

*Escherichia coli* Biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology, 322 T. Romeo (Ed), Bacterial Biofilms.pp* 251-291.

#### Belser L. W. (1979)

Population ecology of nitrifying bacteria. Annual Review of Microbiology, 33: 309–333.

#### Bessiere Y. (2005)

Filtration frontale sur membrane : mise en évidence du volume filtré critique pour l'anticipation et le contrôle du colmatage. *Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse III.* 

#### Bevis B. J. & Glick B. S. (2002)

Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nature Biotechnology, 20: 83-87.* 

#### Beyenal H. & A. Tanyolaç (1998)

The effects of biofilm characteristics on the external mass transfer coefficient in a differential fluidized bed biofilm reactor. *Biochemical Engineering Journal, 1: 53-61.* 

#### Beyenal H., C. Donovan, Z. Lewandowski & G. Harkin (2004a)

Three-dimensional biofilm structure quantification. *Journal of Microbiological Methods*, 59: 395-413.

#### Beyenal H., Z. Lewandowski & G. Harkin (2004b)

Quantifying biofilm structure: facts and fiction. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research, 20: 1 - 23.

# Blattner FR, G. Plunkett, C.A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau & Y. Shao (1997)

The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, *277: 1453-1462*.

#### Bloemberg G. V., G. O. Toole, B. J. J. Lugtenberg & R. Kolter (1997)

Green Fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4543-4551.

#### Boissier B., F. Lutin, M. Moutounet & A. Vernhet (2008)

Particles deposition during the cross-flow microfiltration of red wines - incidence of the hydrodynamic conditions and of the yeast to fines ratio. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 47: 276-286.* 

#### Borde I. & D. Boucher (2005)

La régulation de l'opéron lactose. Site internet Université de Jussieu : http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/operonlactose/

#### Brakenhoff G.J., M. Müller & R.I. Ghauharali (1996)

Analysis of efficiency of two-photon versus single-photon absorption for fluorescence. generation in biological objects. *Journal of Microscopy*, *183: 140-144*.

#### Brown W., A. Ralston A. & K. Shaw (2008)

Positive transcription control: the glucose effect. *Nature Education*, 1: 1-2.

#### С

## Campbell R. E., O Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, & R. Y. Tsien (2002)

A monomeric red fluorescent protein. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America (PNAS) 99: 7877-7882.

#### Casetta P. & F. Negretti (1989)

Experimental observations on the bacteriological controls of antibiotics - II. Inactivation of the antimicrobial activity of membranes employed for the filtration of antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 7: 1867-1870.* 

#### Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, & D. C. Prasher (1994)

Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, *263*: *802-805*.

#### Chalfie M. (1995)

Green fluorescent protein. Photochemistry and Photobiology, 62: 651-656.

## Chandra J., P.K. Mukherjee, S.D. Leidich, F.F. Faddoul, L.L. Hoyer, L.J. Douglas & M.A. Ghannoum (2001a)

Antifungal resistance of *Candidal* biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. *Journal of Dental Research*, 80: 903-908.

## Chandra J., D. M. Kuhn, P. K. Mukherjee, L. L. Hoyer, T. McCormick & M. A. Ghannoum (2001b)

Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance.

Journal of Bacteriology, 183: 5385-5394.

#### Chang S., A. G. Fane & S. Vigneswaran (2002)

Experimental assessment of filtration of biomass with transverse and axial fibres. *Chemical Engineering Journal, 87: 121-127.* 

#### Chaudhuri B., S. Ingavale, & A. K. Bachhawat (1997)

*Apd1*(+), a gene required for red pigment formation in *ade6* mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, encodes an enzyme required for glutathione biosynthesis: a role for glutathione and a glutathione-conjugate pump.

Genetics, 145: 75-83.

#### Chen V., A. G. Fane, S. Madaeni & I. G. Wenten (1997)

Particle deposition during membrane filtration of colloids: transition between concentration polarization and cake formation. *Journal of Membrane Science*, *125: 109-122*.

#### Chen S., E. Kim, M.L. Shuler & D.B. Wilson (1998)

Hg<sup>2+</sup> removal by genetically engineered *Escherichia coli* in a hollow fiber bioreactor. *Biotechnology progress, 14: 667-671.* 

#### Chen V., H. Li & A. G. Fane (2004)

Non-invasive observation of synthetic membrane processes- a review of methods. *Journal of Membrane Science*, 241: 23-44.

#### **Chen C. L., W.-T. Liu, M.-L. Chong, M.-T. Wong, S.L. Ong, H. Seah & W.J. Ng (2004)** Community structure of microbial biofilms associated with membrane-based water purification processes as revealed using a polyphasic approach. *Applied Microbiology and Biotechnology, 63: 466-473.*

#### Choi B.-K., B. J. Paster, F. E. Dewhirst & U. B. Göbel (1994)

Diversity of cultivable and uncultivable oral spirochetes from a patient with severe destructive periodontitis.

Infection and Immunity, 62: 1889–1895.

#### Chudakov D.M., S. Lukyanov & K. A. Lukyanov (2005)

Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. *Trends in Biotechnology, 23: 605-613.* 

### Compère C., M.-N. Bellon-Fontaine, P. Bertrand, D. Costa, P. Marcus, C. Poleunis, C.-M. Pradier, B. Rondot & M.G. Walls (2001)

Kinetics of conditioning layer formation on stainless steel immersed in seawater. *Biofouling*, *17*: *129-145*.

#### Conchello J-A & J.W. Lichtman (2005)

Optical sectionning microscopy. *Nature Methods, 2: 920 – 931.* 

#### Congeevaram S., S. Dhanarani, J. Park, M. Dexilin & K. Thamaraiselvi (2007)

Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *Journal of Hazardous Materials, 146: 270-277.* 

#### Coquet L., P. Cosette, G. A. Junter, E. Beucher, J. M. Saiter & T. Jouenne (2002)

Adhesion of *Yersinia ruckeri* to fish farm materials: influence of cell and material surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 26: 373–378.* 

#### Cormack B., G. Bertram & M. Egerton (1997)

Yeast enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, *143*: 303-311.

#### Cubitt A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross & R. Y. Tsien (1995)

Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 20: 448–455.

#### D

#### Dabert P., J. P. Delgenes, R. Moletta & J.-J. Godon (2002)

Contribution of molecular microbiology to the study in water pollution removal of microbial community dynamics.

Review in Environmental Science & Biotechnology, 1: 39-49.

#### Danese P. N., L. A. Pratt & R. Kolter (2000)

Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture.

Journal of Bacteriology, 182: 3593-3596.

#### Daufin G., F. Rene & P. Aimar (1998)

Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire. *Editions Lavoisier, Tec & Doc.* 

#### Davison B. H. & G. Stephanopoulos (1986)

Coexistence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* in chemostat under substrate competition and product inhibition. *Biotechnology and Bioengineering, 2 : 1742-1752.* 

#### Day A.W., N. H. Poon & G. G. Stewart (1975)

Fungal fimbriae. III. The effect on flocculation in *Saccharomyces*. *Canadian Journal of Microbiology*, 21: 558-564.

#### De Wulf P., L. Brambilla, M. Vanoni, D. Porro & Lilia Alberghina (2000)

Real-time flow cytometric quantification of *GFP* expression and Gfp-fluorescence generation in *Saccharomyces cerevisiae*.

Journal of Microbiological Methods 42: 57-64.

#### Denis C. L., J. Fergusonl, & E. T. Young (1983)

mRNA Levels for the fermentative alcohol dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* decrease upon growth on a nonfermentable carbon source. *The Journal of Biological Chemistry*, 258: 1165-1171.

#### Denk W., Strickler J. H. & Webb W.W. (1990)

Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, *248:* 73-6.

#### Derlon N., A. Massé, R. Escudié, N. Bernet & E. Paul (2008)

Stratification in the cohesion of biofilms grown under various environmental conditions. *Water Research, 42: 2102-2110.* 

#### Diab El Arab H. G., V. Vilich & R. A. Sikora (2001)

The use of phospholipid fatty acids (PL-FA) in the determination of rhizosphere specific microbial communities (RSMC) of two wheat cultivars. *Plant and Soil*, *228*: *291-297*.

#### Donlan R. M. (2002)

Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases, 8: 881-890.

#### Dufour P., S. Dufour, A. Castonguay, N. McCarthy & Y. De Koninck (2006)

Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux ou un photon c'est bien... mais deux c'est mieux. *Médecine/Science*, 22: 837-44.

#### Dunn A. K., D. S. Millikan, D. M. Adin, J. L. Bose & E. V. D. Stabb (2006)

New *rfp*- and pES213-derived tools for analyzing symbiotic *Vibrio fischeri* reveal patterns of infection and *lux* expression *in situ*. *Applied and Environmental Microbiology*, *72: 802-810*.

E

#### Edwards S. R. & T. J. Wandless (2009)

Dicistronic regulation of fluorescent proteins in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast, published online*.

#### Emptage N. J. (2001)

Fluorescent imaging in living systems. *Current Opinion in Pharmacology, 1: 521–525.* 

### Errampalli D., J. T. Trevors; H. Lee, K. Leung, M. Cassidy, K. Knoke, T. Marwood, K. Shaw, M. Blears, E. Chung (1997) Bioremediation: A perspective.

Soil and Sediment Contamination: An International Journal, 6: 207 – 218.

#### Espinasse B., P. Bacchin & P. Aimar (2008)

Filtration method characterizing the reversibility of colloidal fouling layers at a membrane surface: Analysis through critical flux and osmotic pressure. *Journal of Colloid and Interface Science, 320: 483–490.* 

F

#### Fane A. G., C. J. D. Fell, P.H. Hodgson & K. C. Marshall (1991)

Microfiltration of biomass and biofluids: effects of membrane morphology and operating conditions. *Filtration and Separation, 28: 332–340.* 

#### Fisher M. M. & E. W. Triplett (1999)

Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities.

Applied and Environmental Microbiology, 65: 4630-4636.

#### Flemming H.-C., G. Schaule & R. McDonogh (1992)

Biofouling on membranes. A short review. "Biofilms-science and technology", L.F. Melo, T. R. Bott, M. Fletcher & B. Capdeville (Eds), Kluwer Academic Press, pp 487-497.

#### Foley G. (2006)

A review of factors affecting filter cake properties in dead-end microfiltration of microbial suspensions. Journal of Membrane Science, 274: 38-46.

#### Fratesi S. E., F. L. Lynch, B. L. Kirkland & L. R. Brown (2004)

Effects of SEM Preparation Techniques on the Appearance of Bacteria and Biofilms in the Carter Sandstone.

Journal of Sedimentary Research, 74: 858-867.

#### Freitas dos Santos L. M. & A.G. Livingston (1995)

Membrane-attached biofilms for VOC wastewater treatment. I. Novel *in-situ* biofilm thickness measurement technique.

Biotechnology and Bioengineering, 47: 82–89.

G

#### Gagnon G. A. & R. M. Slawson (1999)

An efficient biofilm removal method for bacterial cells exposed to drinking water. Journal of Microbiological Methods, 34: 203-214.

#### Gassara D., P. Schmitz., A. Ayadi, M. Prat (2008)

Modelling the effect of particle size in microfiltration. Separation Science and Technology, 43: 1754-1770.

#### Ge X. M., L. Zhang & F.W. Bai (2005)

Impacts of yeast floc size distributions on their observed rates for substrate uptake and product formation.

Enzyme and Microbial Technology, 39: 289-295.

#### Geissler S. & U. Werner (1999)

Dynamic model of crossflow microfiltration in flat-channel systems under laminar flow conditions. Filtration and Separation, 32: 533–537.

#### Gietz R. D. & R. H. Schiestl (1995)

Transforming yeast with DNA. Methods in Molecular and Cellular Biology, 5: 255-259.

#### Girvan M. S., J. Bullimore, A. S. Ball, J. N. Pretty & A. M. Osborn (2004)

Responses of active bacterial and fungal communities in soils under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens.

Applied and Environmental Microbiology, 70: 2692–2701.

Goffeau A., B.G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin & S. G. Oliver (1996) Life with 6000 genes. Science, 274: 563-567.

#### Goyal D. (2007)

Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, *98: 2243-2257*.

#### Guillán A., T. Lú Chau, E. Roca, M. J. Núñez & J. M. Lema (1998)

Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *EXG1* gene in free and immobilized cultures; Stability and Stabilization of Biocatalysts.

"Stability and Stabilization of Biocatalysts", A. Ballesteros, F.J. Plou, J.L. Iborra & P.J. Halling (Eds), Elsevier Science, pp 611-618.

### Guillemot G., G. Vaca-Medina, H. Martin-Yken, A. Vernhet, P. Schmitz & M. Mercier-Bonin (2006).

Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: Influence of yeast and solid surface properties.

Colloids and Surfaces: Biointerfaces, 49: 126-135.

#### Guillemot G., S. Lorthois, P. Schmitz & M. Mercier-Bonin (2007)

Evaluating the Adhesion Force Between *Saccharomyces Cerevisiae* Yeast Cells and Polystyrene From Shear-Flow Induced Detachment Experiments. *Chemical Engineering Research and Design*, *85: 800-807*.

#### Guiot E. (2001)

Microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons : applications à des études de corrélations et de déclins de fluorescence en milieu biologique. *Thèse de doctorat, Université Paris Sud - Paris XI.* 

#### Gupta J. C. & K. J. Mukherjee (2001)

Stable maintenance of plasmid in continuous culture of yeast under non-selective conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 : 317-323.

#### Н

#### Hadjantonakis A. K. & A. Nagy (2001)

The color of mice: in the light of GFP-variant promoters. *Histochemistry and Cell Biology, 115: 49-58.* 

#### Hakkaart H. J. J., B. Van Gemen, E. Velkamp & J. J. J. Nijkamp (1985)

Maintenance of multicopy plasmid Clo DF13 III: role of plasmid size and copy number in partitioning. *Molecular and General Genetics, 198: 364.366.* 

#### Hamachi M. & M. Mietton-Peuchot (1999a)

Experimental investigations of cake characteristics in crossflow microfiltration. *Chemical Engineering Science*, *54: 4023-4030*.

#### Hamachi M., M. Cabassud, A. Davin, M. Mietton Peuchot (1999b)

Dynamic modelling of crossflow microfiltration of bentonite suspension using recurrent neural networks.

Chemical Engineering and Processing, 38: 203-210.

#### Hanahan D., J. Jessee & F. R. Bloom (1995)

Techniques for transformation of E.coli. "DNACloning: Core techniques" 2<sup>nd</sup> edition, D. Glover & B. D. Hames (Eds), IRL Press, 1-32.

#### Hansen M. C., R. J. Palmer, C. Udsen, D. C. White & S. Molin (2001)

Assessment of GFP fluorescence in cells of Streptococcus gordonii under conditions of low pH and low oxygen concentration. Microbiology, 147: 1383–1391.

#### Harden H. S., J. P. Chanton, J. B. Rose, D. E. John & Mark E. Hooks (2003)

Comparison of sulfur hexafluoride, fluorescein and rhodamine dyes and the bacteriophage PRD-1 in tracing subsurface flow. Journal of Hydrology, 277: 100-115.

#### Harkes G., J. Feijen & J. Dankert (1991)

Adhesion of Escherichia coli on to a series of poly(methacrylates) differing in charge and hydrophobicity. Biomaterials, 12: 853-860.

#### Heim, R., D. C. Prasher & R. Y. Tsien (1994)

Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 91: 12501-12504.

#### Heliot L. (2006)

Base de la microscopie confocale. Cours en ligne ; http://www.picin.u-bordeaux2.fr/ Cours/ formation 2006/ MicroscopieIIcours.pdf

Hell S. W. (2007) Review : Far-field optical nanoscopy. Science, 316: 1153-1158.

#### Heydorn, A., A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersboll & S. Molin (2000)

Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology, 146: 2395-2407.

#### Higashi J. M., I-W. Wang, D. M. Shlaes, J. M. Anderson & R. E. Marchant (1996)

Adhesion of Staphylococcus epidermidis and transposon mutant strains to hydrophobic polyethylene. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 39: 341-350.

#### Hiraishi A., K. Masamune & H. Kitamura (1989)

Characterization of the bacterial population structure in an anaerobic-aerobic sludge system on the basis of respiratory quinone profiles.

Applied and Environmental Microbiology, 55: 897–901.

#### Hiromi, S., T. Kishimoto, T. Mizuno, T. Shinzato & H. Uemura (2005)

Expression of GCR1 the transcriptional activator of glycolytic enzyme genes in the yeast Saccharomyces cerevisiae is positively autoregulated by Gcr1p. Yeast, 22: 305-319.

#### Hodgson P. H., G. L. Leslie, R. P. Schneider, A. G. Fane, C.J.D. Fell & K.C. Marshall (1993)

Cake resistance and solute rejection in bacterial microfiltration: The role of the extracellular matrix. Journal of Membrane Science, 79: 35-53.

#### Horstkotte M. A., S. Stepanovic, M. Lang, D. Mack & J. K. Knobloch (2006)

Structural comparison of biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and other coagulase-negative *staphylococci*.

16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Nice, France, April 2006.

#### Hughes D., U. K. Tirlapur, R. Field & Z. Cui (2006)

In situ 3D characterization of membrane fouling by yeast suspensions using two-photon femtosecond near infrared non-linear optical imaging. *Journal of Membrane Science*, 280: 124-133.

I

#### Inada T., K. Kimata & H. Aiba (1996)

Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model.

Genes to Cells, 1: 293-301.

#### Inoue H, H. Nojima & H. Okayama (1990)

High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene, 96: 23-28.* 

#### Ivanov V., J. H. Tay, S. T. Tay, H. L. Jiang (2004)

Removal of micro-particles granules used for aerobic wastewater treatment. *Water Science technology, 50: 147-154.* 

J

#### James P., J. Halladay & E. A. Craig (1996)

Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two- hybrid selection in yeast. *Genetics*, *144: 1425-1436*.

#### Jones R. P. & P. F. Greenfield (1982)

Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology, 4: 210-223.* 

#### Κ

#### Kang S. & H. Choi (2005)

Effect of surface hydrophobicity on the adhesion of *S. cerevisiae* onto modified surfaces by poly(styrene-ran-sulfonic acid) random copolymers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 46: 70–77.* 

#### Kaper J. B., J. P. Nataro & H. L. T. Mobley (2004)

Pathogenic Escherichia coli. Nature Reviews Microbiology, 2: 123-140.

### Karpova T. S., C.T. Baumann, L. He, X. Wu, A. Grammer, P. Lipsky, G. L. Hager & J. G. Mc Nally (2003)

Fluorescence resonance energy transfert from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *Journal of Microscopy*, 209: 56-70.

#### Kawarai T., S. Furukawa, H. Ogihara & M. Yamasaki (2007)

Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 4673–4676.

#### Khoyi M. R. & S. Yaghmaei (2005)

Simulation of competition between two microorganisms in a biofilm reactor based on different growth models.

Biochemical Engineering Journal, 23: 63-72.

#### Kogure T., S. Karasawa, T. Araki, K. Saito, M. Kinjo & A. Miayaki (2006)

A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montpora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nature Biotechnology, 24: 577-581.* 

#### König K., U. Simon & K.J. Halbhuber (1996)

3D resolved two-photon fluorescence microscopy of living cells using a modified confocal laser scanning microscope. *Cellular and Molecular Biology, 42:1181-1194.* 

#### Korber D. R., J. R. Lawrence, M. J. Hendry & D. E. Caldwell (1992)

Programs for determining statistically representative areas of microbial biofilms. *Binary*, 4:204–210.

#### Kosse D., H. Seiler, R. Amann, W. Ludwig & S. Scherer (1997)

Identification of yoghurt-spoiling yeasts with 18S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Systematic and Applied Microbiology, 20: 468-480.* 

#### Kumamoto C. A. (2002)

*Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, *5:* 608-611.

#### Kuo J.-T., Y.-J. Chang & C.-P. Tseng (2003)

Growth rate regulation of lac operon expression in Escherichia coli is cyclic AMP dependent. *FEBS Letters*, 553: 397-402.

L

#### Langenbach K., P. Kuschk, H. Horn & M. Kästner (2009)

Modeling of slow sand filtration for disinfection of secondary clarifier effluent. *Water Research, article in press, corrected proof.* 

### Lee K. & C. Y. Choi (1987)

Growth and plasmid stability of recombinant *E. coli* cells producing hepatitis B surface antigen. *Korean Journal of Chemical Engineering, 4: 182-186.* 

#### Levy-Frebault V., K S Goh & H L David (1986)

Mycolic acid analysis for clinical identification of *Mycobacterium avium* and related *mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*, 24: 835-839

#### Li B. & P. L. Bishop (2004)

Micro-profiles of activated sludge floc determined using microelectrodes. *Water Research, 38: 1248-1258.* 

#### Li H., A. G. Fane, H. G. L. Coster & S. Vigneswaran (1998)

Direct observation of particle deposition on the membrane surface during crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 149: 83-97.

#### Li H., A. G. Fane, H. G. L. Coster & S. Vigneswaran (2003)

Observation of deposition and removal behaviour of submicron bacteria on the membrane surface during crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 217: 29-41.

#### Li H., M. Yang, Y. Zhang, T. Yu & Y. Kamagata (2005)

Nitrification performance and microbial community dynamics in a submerged membrane bioreactor with complete sludge retention. *Journal of Biotechnology*, *123:* 60-70.

### Lissemore J. L., J. Bayes, M. Calvey, L. Reineke, A. Colagiavanni, M. Tscheiner & D. P. Mascotti (2009)

Green fluorescent protein is superior to blue fluorescent protein as a quantitative reporter of promoter activity in *E. coli. Molecular Biology Reports, 36 : 1107-1112.* 

#### Lodolo E.J., J.L. Kock, B.C. Axcell & M. Brooks (2008)

The yeast *Saccharomyces cerevisiae*- the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, 8: 1018-36.

#### Loomis W. F. JR. & B. Magasanik (1967)

Glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 93: 1397-1401.

#### Lünsdorf H., D. F. Wenderoth & W.-R. Abraham (2002)

Composite Biofilms grown in Acidic Mining Lakes and assessed by Electron Microscopy and Molecular Techniques. *Water, Air & Soil Pollution: Focus, 2: 69-79.* 

#### Lutstorf U. & R. Megnet (1968)

Multiple forms of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Physiological control of ADH-2 and properties of ADH-2 and ADH-4. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *126*: 933-944.

#### Lyautey E., B. Lacoste, L. Ten-Hage, J.L. Rols & F. Garabetian (2005)

Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE : methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research*, *39:* 380-388.

#### Μ

#### Maillard J.Y. (2007)

Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: shall we be concerned? *Journal of Hospital Infection, 65: 60-72.* 

### Martins F.S., Dalmasso G., Arantes R.M., Doye A., Lemichez E., Lagadec P., Imbert V., Peyron J.F., Rampal P., Nicoli J.R. & Czerucka D. (2010)

Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Protects Mice and Modifies T84 Cell Response to the Infection. *PLoS One*, *5*:1-12.

### Matz M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov & S. A. Lukyanov (1999)

Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnology*, 17: 969-973.

#### McCarthy A. A., H. Conroy, P. K. Walsh & G. Foley (1998a)

The effect of pressure on the specific resistance of yeast filter cakes during dead-end filtration in the range 30–500kPa. *Biotechnology Techniques*, *12: 909–912*.

#### McCarthy A. A., D. G. O'Shea, N. T. Murray, P. K. Walsh & G. Foley (1998b)

Effect of cell morphology on dead-end filtration of the dimorphic yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRLy2415. *Biotechnology Progress, 1: 279-285.* 

#### McGuire I., K. Coyle & G. Foley (2009)

Specific cake resistance of yeast suspensions measured by dynamic and steady state methods. *Journal of Membrane Science*, 344: 14-16.

#### Meireles M., C. Molle, M. J. Clifton & P. Aimar (2004)

The origin of high hydraulic resistance for filter cakes of deformable particles: cell-bed deformation or surface-layer effect?

Chemical Engineering Science, 59: 5819 – 5829.

#### **Mendret J. (2007)**

Mise au point de méthodes de caractérisation du colmatage de membranes : application à la caractérisation *in situ* d'un dépôt particulaire en ultrafiltration frontale en lien avec les performances du procédé.

Thèse de doctorat, université Paul Sabatier, Toulouse III.

#### Millsap K. W., R. Bos, H. C. Van Der Mei & H. J. Busscher (2000)

Dot assay for determining adhesive interactions between yeasts and bacteria under controlled hydrodynamic conditions. *Journal of Microbiological Methods, 40: 225-232.* 

#### Mittelman M.W. (1985)

"Biological Fouling of Purified-Water Systems: Part 1, Bacterial Growth and Replication" *Microcontamination*, *3: 51-55.* 

#### Mizuno H., A. Sawano, P. Eli, H. Hama & A. Miyawaki (2001)

Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry*, 40: 2502–2510.

#### Monod J. (1965)

From enzymatic adaptation to allosteric transitions. *Nobel Lecture.* 

#### Mota M., J. A. Teixeira & A.Yelshin (1999)

Image analysis of packed beds of spherical particles of different sizes. *Separation and Purification Technology 15: 59-68.* 

#### Mota M., J. A. Teixeira & A. Yelshin (2002)

Influence of cell-shape on the cake resistance in dead-end and cross-flow filtrations. *Separation and Purification Technology*, 27: 137-144.

#### Moter A., U. B. Göbel (2000)

Fluorescence in situ-hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, *41: 85-112*.

#### Mouchtouri V. A., G. Goutziana, J. Kremastinou & C. Hadjichristodoulou (2009)

Legionella species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures. American Journal of Infection Control, In Press, Corrected Proof.

#### Mores W. D. & R. H. Davis (2001)

Direct visual observation of yeast deposition and removal during microfiltration. *Journal of Membrane Science, 189: 217-230.* 

#### Mudliar S., S. Banerjee, A. Vaidya & S. Devotta (2008)

Steady state model for evaluation of external and internal mass transfer effects in an immobilized biofilm.

Bioresource Technology, 99: 3468-3474

#### Mueller L. N., J. F.C. de Brouwer, J. S. Almeida, L. J. Stal & J. B Xavier (2006)

Analysis of a marine phototrophic biofilm by confocal laser scanning microscopy using the new image quantification software PHLIP.

BMC Ecology, 6:1-15.

#### Mukherjee P. K., J. Chandra (2004)

*Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates*, 7: 301-309.

#### Muyzer G. (1999)

DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology, 2: 317-322.* 

#### N

#### Nakanishi K., T. Tadokoro & R. Matsuno (1987)

On the specific resistance of cakes of microorganisms. *Chemical Engineering Communications*, 62: 187–201.

#### Nett J. & D. Andes (2006)

*Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology, 9: 340-345.* 

#### Ni Mhurchu J. & G. Foley (2006)

Dead-end filtration of yeast suspensions: Correlating specific resistance and flux data using artificial neural networks. *Journal of Membrane Science*, 281: 325-333.

#### 0

**Ochoa J.-C., C. Coufort, R. Escudié, A. Liné & E. Paul (2007)** Influence of non-uniform distribution of shear stress on aerobic biofilms *Chemical Engineering Science, 62: 3672 – 3684.* 

**Oolman T. & T.C. Liu (1991)** Filtration properties of mycelial microbial broths. *Biotechnology Progress, 7: 534–539.* 

#### Oscar T. P., K. Dulal & D. Boucaud (2006)

Transformation of *Escherichia coli* K-12 with a high-copy plasmid encoding the Green Fluorescent Protein reduces growth: implications for predictive microbiology. *Journal of Food Protection, 6: 276-281.* 

#### Р

#### Paramithiotis S., S. Gioulatos, E. Tsakalidou & G. Kalantzopoulos (2006)

Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochemistry.*, 41: 2429-2433.

#### Park K., S. Y. Yi, C.-S. Lee, K. E. Kim, H.-S. Pai, D.-W. Seol, B. H. Chung & M. Kim (2006)

A split enhanced Green Fluorescent Protein-based reporter in yeast two-hybrid system. *The Protein Journal, 26: 107-116.* 

#### Patankar D. B., T.C. Liu & T. Oolman (1993)

A fractal model for the characterization of mycelial morphology. *Biotechnology and Bioengineering*, *42:* 571–578

#### Patterson G., R. N. Day & D Piston (2001)

Fluorescent protein spectra. Journal of Cell Science, 114: 837-838.

#### Peixoto C., I. Marcelino, A. I. Amaral, M. J. T. Carrondo & P. M. Alves (2007)

Purification by membrane technology of an intracellular *Ehrlichia ruminantium* candidate vaccine against heartwater. *Process Biochemistry*, 42: 1084–1089.

#### Perez-Arellano I.& G. Perez-Martinez (2003)

Optimization of the green fluorescent protein (GFP) expression from a lactose-inducible promoter in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiology Letters*, 222: 123-127.

#### Postgate J.P. (1967)

Viable counts and viability. Methods in Microbiology, J. R. Norris and D. W. Ribbons (Eds), Academic Press, pp 611-628.

#### Pratt L. A. & R. Kolter (1998)

Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili.

Molecular Microbiology, 30: 285–293.

#### Prigent-Combaret C., G. Prensier, T. T. Le Thi, O. Vidal, P. Lejeune & C. Dorel (2000)

Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing Escherichia coli strains: role of flagella, curli and colanic acid.

Environmental Microbiology, 2: 450-64.

#### Q

Qiu X., L. Wu, H. Huang, P. E. McDonel, A. V. Palumbo, J. M. Tiedje & J. Zhou (2001) Evaluation of PCR-generated chimeras, mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning.

Applied and Environmental Microbiology, 67: 880-7.

#### R

#### Rang C., J. E. Galen, J. B. Kaper & L. Chao (2003)

Fitness cost of the green fluorescent protein in gastrointestinal bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 49: 531-537.

#### Raskin, L., L. K. Poulsen, D. R. Noguera, B. Rittmann & D. Stahl (1994)

Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization.

Applied and Environmental Microbiology 60: 1241–1248.

#### Revnolds T. B. & G. R. Fink (2001)

Bakers' Yeast, a Model for Fungal Biofilm Formation Science, 291: 878-881.

#### Riesmeier B., K. Kroner & M. Kula (1990)

Harvest of microbial suspensions by microfiltration. Desalination, 77: 219-233.

#### Rochex A., J.-J. Godon, N. Bernet & R. Escudie (2008)

Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. Water research, 42: 4915-4922.

#### Rousseaux S., A. Hartmann, N. Rouard & G. Soulas (2003)

A simplified procedure for terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the soil bacterial community to study the effects of pesticides on the soil microflora using 4,6dinitroorthocresol as a test case. Biology and Fertility of Soils; 37: 250-254.

#### Ruohonen L., M. K. Aalto & S. Kergnen (1995)

Modifications to the ADH1 promoter of Saccharomyces cerevisiae for efficient production of heterologous proteins.

Journal of Biotechnology, 39: 193-203.

#### **Rubart M. (2004)**

Two-Photon Microscopy of Cells and Tissue. Circulation Research, 95: 1154-1166.

#### S

#### Salih A., A. Larkum, G. Cox, M. Kühl & O. Hoegh-Guldberg (2000)

Fluorescent pigments in corals are photoprotective. Nature, 408: 850-853.

#### Santangelo G. M. & J. Tornow (1990)

Efficient transcription of the glycolytic gene ADHI and three translational component genes requires the GCRI product, which can act through TUF/GRF/RAP binding sites. Molecular and Cellular Biology, 10: 859-862.

#### Schlichter D., H. W. Fricke &W. Weber (1986)

Light harvesting by wavelength transformation in a symbiotic coral of the Red Sea twilight zone. Marine Biology, 91: 403-407.

#### Schluep T. & F. Widmer (1996)

Initial transient effects during cross flow microfiltration of yeast suspensions. *Journal of Membrane Science*, 115: 133-145.

#### Scott K. P., D. K. Mercer, L. A. Glover & H. J. Flint (1998)

The green £uorescent protein as a visible marker for lactic acid bacteria in complex ecosystems. *FEMS Microbiology Ecology, 26: 219-230.* 

#### Sedlacek M. J. & Walker C. (2007)

Antiobitic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiology and Immunology, 22: 333-339.* 

#### Seyfriedsberger G., K. Rametsteiner & W. Kern (2006)

Polyethylene compounds with antimicrobial surface properties. *European Polymer Journal, 42: 3383–3389.* 

### Shaner N. C., R. E Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Gielmans, A. E. Palmer & R. Y Tsien (2004)

Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. Red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, *22: 1567-1572*.

#### Shaner N. C., P. A. Steinbach & R. Y. Tsien (2005)

A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, *12*: 905-909.

#### Sharma K. G., R. Kaur & A. K. Bachhawat (2003)

The glutathione-mediated detoxification pathway in yeast: an analysis using the red pigment that accumulates in certain adenine biosynthetic mutants of yeasts reveals the involvement of novel genes. *Archives of Microbiology, 180: 108-117.* 

#### Shimizu Y., K.-I. Shimodera & A. Watanabe (1993)

Cross-flow microfiltration of bacterial cells. Journal of Fermentation and Bioengineering, 76: 493-500.

#### Shimomura O. (2009)

Discovery of Green Fluorescent Protein (GFP), Nobel lecture. *Angewandte Chemie*, 48: 5590-5602.

#### Shuster J., J. Yu, D. Cox, R.V.L. Chan, M. Smith & E. Young (1986)

ADRI-mediated regulation of *ADH2* requires an inverted repeat sequence. *Molecular and Cellular Biology, 6: 1894-1902.* 

#### Siegrist H. & W. Gujer (1985)

Mass transfer mechanisms in a heterotrophic biofilm. *Water Research, 19: 1369-1378.* 

#### Smart P. L. & I. M. S. Laidlaw (1977)

An Evaluation of Some Fluorescent Dyes for Water Tracing. *Water Resources Research, 13: 15-33.* 

#### Smith M. A. & M. J. Bidochka (1998)

Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Canadian Journal of Microbiology*, 44: 351-355.

#### Smith A., K. E. Moxham & A. P. J. Middelberg (2000)

Wall material properties of yeast cells. Part II. Analysis *Chemical Engineering Science*, *55: 2043-2053*.

#### Soda S., E. Heinzle & M. Fujita (1999)

Modeling and simulation of competition between two microorganisms for a single inhibitory substrate in a biofilm reactor.

Biotechnology and Bioengineering, 66: 258 - 264.

#### Sonnleitner B & O. Kappeli (1985)

Growth of Saccharomyces cerevisiae is controlled by its limited respiratory capacity : formulation and verification of a hypothesis.

Biotechnology and Bioengineering, 28: 927-937.

#### Southward C. M. & M. G. Surette (2002)

The dynamic microbe: green fluorescent protein brings bacteria to light. *Molecular Microbiology*, 45 : 1191-1196.

#### Stelzer E. H. K. (2006)

The intermediate optical system of Laser-Scanning confocal microscopes. "Handbook of biological confocal microscopy", 3ème edition, J. B. Pawley (Eds), Springer Science, pp 207-220.

#### Stepanenko O. V., V. V. Verkhusha, I. M. Kuznetsova, V. N. Uversky & K.K. Turoverov (2008)

Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes.

Current Protein and Peptide Science, 9: 1-31.

### Sternberg C., B, B. Christensen, T. Johansen, A. T. Nielsen, J. B. Andersen, M. Givskov & S. Molin (1999)

Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4108-4117.

#### Stewart P. S., R. Murga, R. Srinivasan & D. de Beer (1995)

Biofilm structural heterogeneity visualized by three microscopic methods. *Water Research, 29: 2006-2009.* 

#### Stewart P. S. & J. W. Costerton (2001)

Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet, 358: 135–38.* 

#### Suzuki MT & Giovannoni ST (1996)

Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16s rRNA gene sequence obtained from activated sludge bacteria.

Applied and Environmental Microbiology, 62: 625-630.

#### Szwerinski H., S. Gaiser & D. Bardtke (1985)

Immunofluorescence for the quantitative determination of nitrifying bacteria: interference of the test in biofilm reactors.

Applied Microbiology and Biotechnology, 21: 125–128.

#### Takenaka S., M. Iwaku & E. Hoshino (2001)

Artificial Pseudomonas aeruginosa biofilms and confocal laser scanning microscopic analysis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 7: 87-93.

#### Tanaka T., R. Kamimura, K. Itoh & K. Nakanishi (1993)

Factors affecting the performance of crossflow filtration of yeast cell suspension *Biotechnology and Bioengineering*, *41:* 617-624.

#### Tanaka T., K.-I. Abe & K. Nakanishi (1994)

Shear-induced arrangement of cells in cake during crossflow filtration in *Escherichia coli* cells. *Biotechnology Techniques*, 8 : 57-60.

#### Tanaka T., K. Usui, K. Kouda & K. Nakanishi (1996)

Filtration behaviors of rod-shaped bacterial broths in unsteady-state phase of cross-flow filtration. *Journal of Chemical Engineering of Japan, 29: 973–981.* 

#### Tanji Y., Y. Morono, A. Soejima, K. Hori & H.Unno (1999)

Structural analysis of a biofilm which enhances carbon steel corrosion in nutritionally poor aquatic environments.

Journal of Bioscience and Bioengineering, 88: 551-556.

#### Tapia G. & J. Yee (2006)

Biofilm: its relevance in kidney disease. Advances in Chronic Kidney Disease, Volume 13: 215-224.

#### Tolker-Nielsen T., U. C. Brinch, P. C. Ragas, J. B. Andersen, C. S. Jacobsen & S. Molin (2000 a)

Development and Dynamics of *Pseudomonas* sp. Biofilms. Journal of Bacteriology, 182: 6482-6489.

#### Tolker-Nielsen T. & S. Molin (2000 b)

Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microbial Ecology*, 40: 75-84.

#### Tomaszek J. A. & M. Grabas (2007)

Carbon and Nitrogen removal in a biofilm reactors system with raw wastewater stream distribution. *Environmental Technology 28: 555-563.* 

#### Tombolini R., A. Unge, M. E. Davey, F. J. de Bruijn & J. K. Jansson (1997)

Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas* fluorescens bacteria. *FEMS Microbiology Ecology, 22: 17-28.* 

#### Totowa N.J., B. Carpentier & O. Cerf (1993)

Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 499-511.

#### Trachoo N. & J.D. Brooks (2005)

Attachment and heat resistance of *Campylobacter jejuni* on *Enterococcus faecium* biofilm. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8: 599–605.

#### Tsien R. Y. (1998)

The green fluorescent protein. Annual Review of Biochemistry, 67:509–44.

#### Tung K.L., S.J. Wang, W.M. Lu & C.H. Pan (2001)

In situ measurement of cake thickness distribution by a photointerrupt sensor. *Journal of Membrane Science, 190: 57–67.* 

#### V

Valeur B (2004) "Invitation à la fluorescence moléculaire". *De Boeck (Eds)*.

#### Vazquez-Juarez R., T. Andlid & L. Gustafssona (1994)

Cell surface hydrophobicity and its relation to adhesion of yeasts isolated from fish gut. *Colloids and Surfuces B: Biomterfaces, 2: 199-208.* 

**Venugopalan V. P., M. Kuehn, M. Hausner, D. Springael, P. A. Wilderer & S. Wuertz (2005)** Architecture of a Nascent *Sphingomonas* sp. Biofilm under Varied Hydrodynamic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology, 71: 2677-2686.* 

#### Verduyn C., T. P. L. Zomerdijk, J. P. van Dijken & W. A. Scheffers (1984)

Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode.

Applied Microbiology and Biotechnology, 19: 181-185.

#### Vialette M., A. M. Jandos-Rudnik, C. Guyard, O. Legeay, A. Pinon & M. Lange (1984)

Validating the use of green fluorescent-marked *Escherichia coli* O157:H7 for assessing the organism behaviour in foods.

Journal of Applied Microbiology, 96 : 1097-1104.

### Vroom J. M., K.J. De Grauw, H.C. Gerritsen, D.J. Bradshaw, P.D. Marsch, G.K.Watson, J.J. Birmingham &C. Allison (1999)

Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Applied and Environmental Microbiology, 65: 3502-3511.* 

#### W

#### Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer & K. H. Schleifer (1993)

Probing activated sludge with proteobacteria-specific oligonucleotides: inadequacy of culturedependent methods for describing microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1520–1525.

### Wagner, M., M. Schmid, S. Juretschko, K. H. Trebesius, A. Bubert, W. Goebel & K. H. Schleifer (1998)

In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 160: 159–168.

#### Wakeman R. J. (1994)

Visualization of cake formation in crossflow microfiltration. *Chemical Engineering Research and Design, 72: 530-540.* 

#### Walker G. & J. A. Walker (1998)

"Yeast Physiology and Biotechnology". John Wiley & Sons (Eds).

#### Ward W.W. & S. H. Bokman (1982)

Reversible denaturation of Aequorea green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*, 21: 4535-4540.

#### Weber S. D., W. Ludwig, K.-H. Schleifer & J. Fried (2007)

Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6233-6240.

#### Wilen B-M., M. Onuk, M. Hermansson, D. Lumley & T. Mino (2008)

Microbial community structure in activated sludge floc analysed by fluorescence in situ hybridization and its relation to floc stability. *Water Research*, *42: 2300-2308*.

#### Wong W.W. & J. C. Liao (2009)

Microbial maximal specific growth rate as a square-root function of biomass yield and two kinetic parameters. *Metabolic Engineering*, *11: 409-414*.

#### Х

#### Xavier J.B., A. Schnell, S. Wuertz, R. Palmer, D.C. White & J.S. Almeida (2001)

Objective threshold selection procedure (OTS) for segmentation of scanning laser confocal microscope images. *Journal of Microbiological Methods*, 47: 169-180.

#### Xavier J. B., D. C. White & J. S. Almeida (2003)

Automated biofilm morphology quantification from confocal laser scanning microscopy imaging. *Water Science and Technology*, 47: 31-37.

#### Xu-Jiang Y., J. Dodds & D. Leclerc (1995)

Cake Characteristics in Crossflow and Dead-End Microfiltration. *Filtration and separation*, 32: 795-798.

#### Y

#### Yang F., L. G. Moss & G. N. Phillips (1996)

The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein, *Nature Biotechnology*, 14: 1246-1251.

#### Yang S.-T. & C.-H. Shu (1996)

Kinetics and stability of GM-CSF production by recombinant yeast cells immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Biotechniologie Progress, 12: 449-456.* 

#### Yang X., H. Beyenal, G. Harkin & Z. Lewandowski (2000)

Quantifying biofilm structure using image analysis. *Journal of Microbiological Methods*, 39: 109-119

#### Yanushevich Y. G., N. G. Gurskaya, D.B. Staroverov, S. A. Lukyanov & K.A. Lukyanov (2003)

A natural fluorescent protein that changes its fluorescence color during maturation. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 29: 325-329.

#### Yerly J., Y. Hu, S. M. Jones & R. J. Martinuzzi (2007)

A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilm images. *Journal of Microbiological Methods*, 70: 424-433.

#### Yu A. B., R.P. Zou & N. Standish (1996)

Modifying the linear packing model for predicting the porosity of nonspherical particle mixtures. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *35: 3730–3741*.

#### Yu J., D. Kim & T. Lee (2010)

Microbial diversity in biofilms on water distribution pipes of different materials. *Water Science & Technology, 61: 163-171.* 

#### Z

#### Zara S., A. T. Bakalinsky, G. Zara, G. Pirino, M. A. Demontis & M. Budroni (2005)

*FLO11*-based model for air-liquid interfacial biofilm formation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2934–2939.

#### Zhang Z., M. Moo-Young & Y. Chisti (1996)

Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Advances*, *14*: 401-435.

#### Zhang W., B. G. Park, Y. K. Chang, H. N. Chang, X. J. Yu & Q. Yuan (1998)

Factors affecting membrane fouling in filtration of *Saccharomyces cerevisiae* in an internal ceramic filter bioreactor.

Bioprocess Engineering, 18: 317-322.

#### Zhang C., X.-H. Xing & K. Lou (2005)

Rapid detection of a Gfp-marked *Enterobacter aerogenes* under anaerobic conditions by aerobic fluorescence recovery. *FEMS Microbiology Letters*, 249: 211–218.

#### Zhang Y. P., A. G. Fane & A.W.K. Law (2006)

Critical flux and particle deposition of bidisperse suspensions during crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science, 282: 189-197.* 

#### Zhang K., H. Choi, M. Wu, G. A. Sorial, D. Dionysiou & D. B. Oerther (2007)

An ecology-based analysis of irreversible biofouling in membrane bioreactors. *Water Science and Technology*, *55: 395-402* 

## Annexes
# Annexe I : phrases de risque

### Phrases indiquant les risques (R) (Inserm):

- R 22: nocif en cas d'ingestionR 36: irritant pour les yeuxR 40: effet cancérogène suspecté preuves insuffisantes
- R 46: peut causer des altérations génétiques héréditaires

### Phrases indiquant les conseils de prudence (S) (Inserm):

S 26: en cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste

S 36/37/39: porter un vêtement de protection approprié, des gants et un appareil de protection des yeux/du visage

### Annexe II : Estimation des pertes de charge



Pertes de charge linéaires  $\overline{\Delta P}(Pa) = \lambda \frac{\overline{L}}{D} \frac{\rho}{2} V^2$  ou  $\Delta P(Pa) = 2f \frac{L}{D} \rho V^2$  avec  $\lambda = 4f$ ,  $\lambda$  (ou f) fonction du nombre de Reynolds

### Pertes de charge singulières

 $\Delta P(Pa) = \zeta \frac{\rho}{2} V^2$  où  $\zeta$  est le coefficient de perte de charge V : vitesse dans petite section.

Bernoulli : 
$$P_A + \rho g z_A + \rho \frac{V_A^2}{2} = P_B + \rho g z_B + \rho \frac{V_B^2}{2} + \Delta P$$

# $\frac{Calcul \ pression \ amont \ membrane \ P_{amont} :}{P_{atm} = P_{amont} + \rho g h + \rho v^2 / 2 + \Delta P}$

$$P_{amont} = P_{atm} - \rho g h - \rho v^2 / 2 - \Delta P$$

Pertes de charge « réservoir/membrane » :

- linéaire le long des conduites
  - rentrant en sortie du réservoir
  - 2 coudes à 90°
  - 3 rétrécissements
  - 1 élargissement à la sortie

 $\frac{\text{Calcul pression aval}}{P_{aval} + \rho v_{aval}^{2}/2 = P_{mano} + \rho v^{2}/2 + \Delta P}$ On suppose  $v_{aval} \ll v$ D'où  $P_{aval} = P_{mano} + \rho v^2 / 2 + \Delta P$ Pertes de charge essentiellement linéaires et 1 coude 90°C (coeff 1,3)

## Annexe III : Propriétés de surface polyéthylène

### - aspect et rugosité

1) Mesure rugosité sur coupons de polyéthylène (rugosimètre à contact classique Taylor-Hodson)

Evaluation sur 10 zones

 $Ra = 0.74 \ \mu m + - 0.11 \ \mu m$  $Rt = 6.3 \ \mu m + - 1.3 \ \mu m$ 

Avec

• Ra : moyenne arithmétique de toutes les valeurs du profil de rugosité R sur la longueur de mesure x (dans notre cas 4 mm).

$$Ra = \frac{1}{l_m} \int |y| \, dx$$

• Rt : écart vertical entre le point le plus haut et le plus bas sur la longueur de mesure x



2) Microscopie électronique à balayage (JEOL JSM-6380 LV)

Observation après métallisation avec un film carbone :





**Objectif X50** 



### Annexe IV : Simulation de l'écoulement (COMSOL)

Simulations de l'écoulement dans la boucle de recirculation avec le logiciel COMSOL multiphysics<sup>TM</sup>



- Txz : représente l'intensité de la contrainte de cisaillement sur le coupon

- Vx : la vitesse sur le plan axial sur la totalité du tube (avec au centre le coupon)



# Développement d'outils et de méthodologies pour l'étude de l'organisation et de la localisation *in-vivo* de micro-organismes dans des structures biologiques complexes.

Ce projet concerne l'analyse de l'organisation de populations microbiennes au sein de structures complexes comme des dépôts ou des biofilms.

Si différentes méthodes sont couramment utilisées pour étudier la structure globale ou l'organisation locale d'agrégats microbiens, peu d'entre elles, permettent de réaliser simultanément ces deux analyses et nécessitent souvent des étapes de préparation qui pénalisent un approche *in-vivo* et en dynamique.

La stratégie proposée repose sur la mise en œuvre de micro-organismes modèles autofluorescents (levures et bactéries) qui peuvent sans aucun traitement être directement observés en microscopie. La similitude du comportement physiologique de ces micro-organismes avec celui des souches sauvages a été démontrée. Les conditions d'acquisition des images en microscopie confocale ont été optimisées. Des dispositifs spécifiques ont été conçus pour générer des dépôts ou des biofilms dans des conditions de contraintes physico-mécaniques et biochimiques maîtrisées afin d'analyser simultanément leurs caractéristiques et les performances du bioprocédé. Ainsi les dépôts ont pu être observés *in-vivo* et *in-situ* grâce à une cellule de filtration équipée d'une fenêtre d'observation. Le développement d'un biofilm mixte composé de levures et bactéries modèles autofluorescentes, dans un réacteur continu spécifique, a également été analysé par microscopie confocale.

Le traitement et les analyses des images acquises au cours des expériences ont été effectués et ont permis d'étudier la structure globale des agrégats biologiques et l'organisation tridimensionnelle des micro-organismes dans ces structures, en mettant par exemple en évidence une répartition hétérogène de deux populations microbiennes dans des dépôts de filtration ou en comparant la capacité de deux espèces microbiennes à former des biofilms en étudiant *in-vivo* la dynamique de croissance de chacune des espèces.

Cette étude a en outre permis de démontrer la pertinence de la méthode proposée, de définir ses limites et son champ d'application.

Mots clés : Agrégats biologiques, Structure, Organisation, Micro-organismes auto-fluorescents, Microscopie confocale.

# Development of devices and methods for the organization and the localisation of micro-organisms in biological complex structures.

The aim of this project deals with the analysis of both the local localization and organization of microbial populations in complex structures such as deposits or biofilms. Different methods are currently used to study the global structure or the local organization of biological aggregates but only few ones allow a combined approach and require *ex-vivo* analyses.

The proposed strategy uses home-designed model auto-fluorescent microorganisms (yeasts and bacteria) which can be observed directly by microscopy without any dying treatment. Same kinetic behaviours between the wild strains and their recombinant ones were demonstrated. The confocal microscopy conditions were optimised. Specific devices were developed to generate deposits or biofilms under controlled and known hydrodynamic or biochemical environment conditions to analyse their structure characteristics linked to the bioprocess performances.

Based on the proposed strategy, microbial deposits modifications due to pressure constraints were observed *in vivo* in a specifically designed flow cell equipped with a microscope glass coverslip. A mixed biofilm composed by our auto-fluorescent yeasts and bacteria was carried out in a specific bioreactor allowing the sampling of biofilms during their development to be analysed by confocal microscopy. Both studies have shown specific organisations between yeasts and bacteria mainly depending on their size and on the environment conditions (pressure or dilution rate).

These studies of both local and global structure of biological aggregates and 3D-organisation of the microorganisms within these structures demonstrated the relevance of the proposed strategy defining the limits of the method and proposing various perspectives for further characterizations and applications.

Keys words: Biological aggregates, Structure, Organization, Fluorescent micro-organisms, Confocal Microscopy