

PROPOSITION DE PROJET DOCTORAL

RENTRÉE 2018

RENSEIGNEMENTS ET RÉSUMÉ DU PROJET

Unité (intitulé - code) : Laboratoire Jean Perrin UMR 8237

Titre du projet (2 lignes max.) : Distribution spatio-temporelle de l'oxygène et de l'expression des gènes au sein d'un biofilm bactérien multi-espèces.

Mots clés (4 maxi.) : Millifluidique, Fluorescence résolue dans le temps, Biofilm bactérien, Bio-senseurs

Directeur de thèse (HDR obligatoire, préciser la fonction) : Nelly Henry, DR CNRS

Email : Nelly.henry@upmc.fr

Téléphone : 01 44 27 22 53

Bilan des encadrements du directeur de thèse sur les 5 dernières années :

Nom du doctorant	Type de financement	Date de début	Date de fin	%
Olivier Galy	IdF	1 Oct 2008	30 Sep 2011	100
Nadia Bourouina	Contrat Doc ED 388	1 Nov 2007	29 juin 2011	100
Amaury Monmeyran	Contrat ANR	1 Nov 2016	31 octobre 2019	100
3 publications du directeur de thèse en rapport avec le sujet proposé	Thomen P, Robert J, Monmeyran A, Bitbol AF, Douarche C, Henry N. <i>PLoS ONE</i> . 12(4):e0175197 (2017).			
	J. Geng, C. Beloin, J. M. Ghigo, N. Henry, <i>PLoS ONE</i> 9, e102049 (2014).			
	O. Galy <i>et al.</i> , <i>Biophysical journal</i> 5, 1400 (2012).			
Equipe encadrante* et intégration du projet dans le cadre de collaborations	Equipe encadrante : Physico-chimie LJP (Nelly Henry) Co-encadrement : Arnaud Gautier - Labo PASTEUR			
	Collaboration interne – LJP : Franck Sureau Collaboration LPTMC - Carine Douarche Collaboration MICALIS – INRA – Stéphanne Aymerich			

* La co-direction ne peut être proposée qu'entre HDR rattachés à des équipes différentes.

Résumé du projet (10 lignes max., ce résumé servira à la mise en ligne) :

Les bactéries adhérant aux surfaces forment des matériaux 3D appelés biofilms. Ces organisations vivantes et concentrées ont un impact considérable sur les activités humaines et l'équilibre de nombreux écosystèmes naturels. La physico-chimie qui prévaut dans le biofilm est très spécifique. Notre projet est, en associant biophysiciens et chimistes, de lever les verrous associés à l'étude des biofilms bactériens vivants par microscopie de fluorescence. La stratégie est de coupler le **développement de nouveaux rapporteurs génétiques non-sensibles à l'O₂** et celui d'un **dispositif de microscopie optique** incluant une **excitation par nappe laser** et des **mesures conjointes de temps de vie et d'intensité de fluorescence**. L'objectif est d'accéder à des mesures quantitatives fiables qui permettront d'éclaircir les relations causales liant les paramètres physico-chimiques locaux aux fonctions biologiques.

DESCRIPTION DÉTAILLÉE (2 PAGES MAXIMUM AU TOTAL)

Placer le sujet de thèse dans un contexte général .

Les communautés de bactéries adhérant aux surfaces et interfaces forment des matériaux tridimensionnels que l'on appelle biofilms. Les cellules s'y englobent dans une matrice extracellulaire de substances polymères qui les protège et favorise leur développement. Dans cet environnement confiné, les bactéries se divisent, interagissent et acquièrent des propriétés spécifiques qui les distinguent des bactéries planctoniques. Elles démontrent entre autres une résistance aux antibiotiques de plusieurs ordres de grandeurs supérieure à celle de leurs homologues planctoniques. Ces organisations vivantes ont un impact considérable sur les activités humaines¹ (voir aussi le rapport interministériel sur les maladies nosocomiales*). Une importante activité de microbiologie fondamentale cherche à en comprendre le fonctionnement pour mieux les contrôler. A l'heure où la biologie moléculaire a permis de montrer la multiplicité des gènes dont l'expression est altérée dans le biofilm, les mécanismes sous-jacents restent mal compris et il apparaît comme crucial de progresser dans la connaissance des relations causales liant les conditions physiques et physico-chimiques spéciales que les bactéries expérimentent en biofilm, à l'altération des fonctions biologiques. Cette tâche immense requiert les contributions concertées de toutes les disciplines pour établir des modèles d'étude pertinents et développer des outils spécifiques qui doivent permettre la mesure quantitative et fiable des paramètres physiques et physico-chimiques qui prévalent dans ces systèmes hétérogènes aux multiples gradients moléculaires (nutriments, métabolites, ions...) et, conjointement, celle des réponses biologiques à travers la détermination sûre de l'expression des gènes.

Description des différents objectifs, de la stratégie envisagée pour les atteindre, du planning de travail.

Objectifs : Le projet proposé s'insère dans un objectif global visant à comprendre le fonctionnement d'une communauté bactérienne multi-espèces en mettant en évidence le rôle des interactions inter-espèces dans des conditions physico-chimiques bien contrôlées. L'objectif de la thèse est concentré sur le rôle de l'O₂ dans ces systèmes vivants et hétérogènes. Nous visons i) à mettre au point une méthode de mesure *in situ*, locale, non invasive et permettant d'accéder aux variations temporelles de fonctions biologiques clés à travers l'expression de gènes ciblés. ii) à imager en mode parallélisé la distribution spatio-temporelle de l'O₂ dans les différents biofilms formés par les 4 espèces de bactéries de notre système — *Pseudomonas fluorescens* (Pf), *Bacillus thuringiensis*, *Kocuria varians*, et *Rhodocyclus sp.* — pour inférer la contribution de l'O₂ dans les propriétés spécifiques de ces systèmes complexes.

Stratégie et Programme: La stratégie repose sur la maîtrise en laboratoire d'un modèle de biofilm à 4 espèces capable de former une communauté (4S) — c'est à dire d'atteindre un état stationnaire où les 4 espèces persistent. Nous avons fait le choix d'installer ce modèle dans un dispositif en flux en canaux millifluidiques, montage qui mime une large gamme de conditions naturelles où les biofilms se développent souvent en immersion aqueuse et sont soumis à des contraintes hydrodynamiques. Ces géométries présentent deux avantages notables. Ils permettent la parallélisation des expériences aussi bien à l'acquisition qu'à l'analyse et offrent un contrôle fin des paramètres physico-chimiques appliqués au biofilm. Il s'agit ensuite de développer des sondes moléculaires pertinentes pour suivre à la fois les variations des fonctions biologiques et des paramètres physico-chimiques. Les fonctions biologiques, seront suivies grâce à la mesure de l'expression de gènes dédiés. Il faut pour cela utiliser des sondes encodées génétiquement de type GFP mais permettant des mesures quantitatives en biofilm, ce qui n'est pas le cas des rapporteurs classiques. Nous développerons pour cela en étroite collaboration

¹ H. Koo, R. N. Allan, R. P. Howlin, P. Stoodley, L. Hall-Stoodley, Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*, (2017)

* Etude Nationale de Prévalence sur les maladies nosocomiales 2001, 2006

avec Arnaud Gautier du labo PASTEUR, co-encadrant de la thèse, des variations de la protéine fluorogénique FAST¹ dont nous avons déjà montré l'efficacité en biofilm². Notre stratégie pour accéder à la mesure locale de l'O₂ dans le biofilm sans perturbation est de coupler la formulation micellaire d'une sonde moléculaire à oxygène (un complexe du Ruthenium)³ à la détection de son temps de vie de fluorescence en imagerie (FLIM)⁴. La formulation micellaire permet de contourner la toxicité de la sonde à l'égard des bactéries et la détection FLIM permet de dériver la concentration locale en oxygène à partir de la mesure du rendement quantique de la sonde sans avoir à connaître la concentration de la sonde. Pour cela nous avons développé un montage dédié incluant une illumination par nappe laser. On extrait le temps de vie de fluorescence des mesures de déphasage entre l'excitation et l'émission. Le premier objectif est d'obtenir une image FLIM d'un biofilm modèle (vraisemblablement un biofilm d'E. coli très bien connu) pour valider l'ensemble du dispositif puis de travailler à optimiser la résolution en z (profondeur du biofilm) de cette image. Les protocoles seront ensuite appliqués à la caractérisation du biofilm 4-espèces pour produire une description 3D de la distribution en O₂ dans ce système complexe. La variation temporelle de cette distribution sera étudiée au cours de la formation et du vieillissement du biofilm 4S. On cherchera les corrélations entre les caractéristiques de la distribution en O₂ et l'expression de gènes cibles. Puis, pour établir des relations causales sur la base de ces corrélations, on réalisera des expériences de formation de biofilm 4S dans des conditions d'O₂ contrôlées et variables. Ces expériences devront permettre d'établir le rôle de l'O₂ dans l'établissement et le fonctionnement de la communauté rapporté par les marqueurs FAST. Éventuellement, en fonction de la vitesse d'avancée du projet, on s'intéressera au rôle de l'O₂ dans les interactions inter-espèces. Pour cela la distribution en O₂ devra être caractérisée sur des biofilms issus de différentes combinaisons des 4-espèces bactériennes dans une mini-combinatoire permise par la parallélisation de l'expérience.

Les principales étapes à accomplir seront les suivantes :

- I) Optimisation de la mesure d'O₂, validation sur un biofilm modèle mono-espèce
- II) Profil tri-dimensionnel de la distribution en O₂ dans un biofilm 4S mature
- III) Mise au point de sondes FAST alternatives, expression en biofilm.
- IV) Couplage des mesures O₂/FAST – Cartographie spatio-temporelle bi-paramétrique
- V) Cartographie spatio-temporelle bi-paramétrique en conditions d' O₂ variables
- VI) Éventuellement, cartographies en mini-combinatoire 4S

Retombées espérées : L'achèvement de ce projet devrait apporter plusieurs niveaux de réalisation : (1) une nouvelle méthode de mesure du profil 3D de l'O₂ *in situ* en biofilm vivant non perturbé en relation avec l'expression d'un gène (2) de premiers résultats sur le partage de l'O₂ en communauté multi-espèces (3) de nouvelles informations sur le rôle de la déplétion en O₂ sur le développement du biofilm.

Ces travaux seront dirigés au LJP par Nelly Henry (LJP-UPMC, CNRS UMR 8237, <http://www.labos.upmc.fr/ljp/>) en co-encadrement avec Arnaud Gautier (labo PASTEUR – ENS)

Discuter l'équilibre entre la prise de risque et la faisabilité du projet. (10 lignes max.)

Le risque est lié à la complexité du système multi-espèces susceptible de générer des profils de distribution d'O₂ également complexes et des données massives longues à analyser et à corrélérer aux propriétés phénotypiques du biofilm. Ce risque est contre-balançé par les différents niveaux de réalisation contenus dans le programme de thèse, technologique et mécanistique avec une partie optionnelle (V) qui pourra être différée s'il s'avère que les étapes I à IV prennent beaucoup de temps. La nouveauté de l'approche méthodologique suffit en elle-même à garantir le succès de la thèse puisque la production d'un profil 3D de l'O₂ sur un biofilm vivant non-perturbé en corrélation avec l'expression d'un gène constituerait déjà une avancée significative dans le domaine.

¹ Plamont, M. A. *et al.* Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 497-502.

² Monmeyran *et al.*, FAST outperforms classical fluorescent proteins. *Submitted 2018*

³ Douarche C *et al.*, *E. Coli* and oxygen: a motility transition. *Phys Rev Lett.* **102** (19):198101, (2009) – Thomen P *et al.*, PLoS ONE- under revision (2017)

⁴ Bastiaens P. I. H. & Squire A. Fluorescence lifetime imaging microscopy. *Trends Cell Biol.* **9** (2) :48-52. (1999)

