

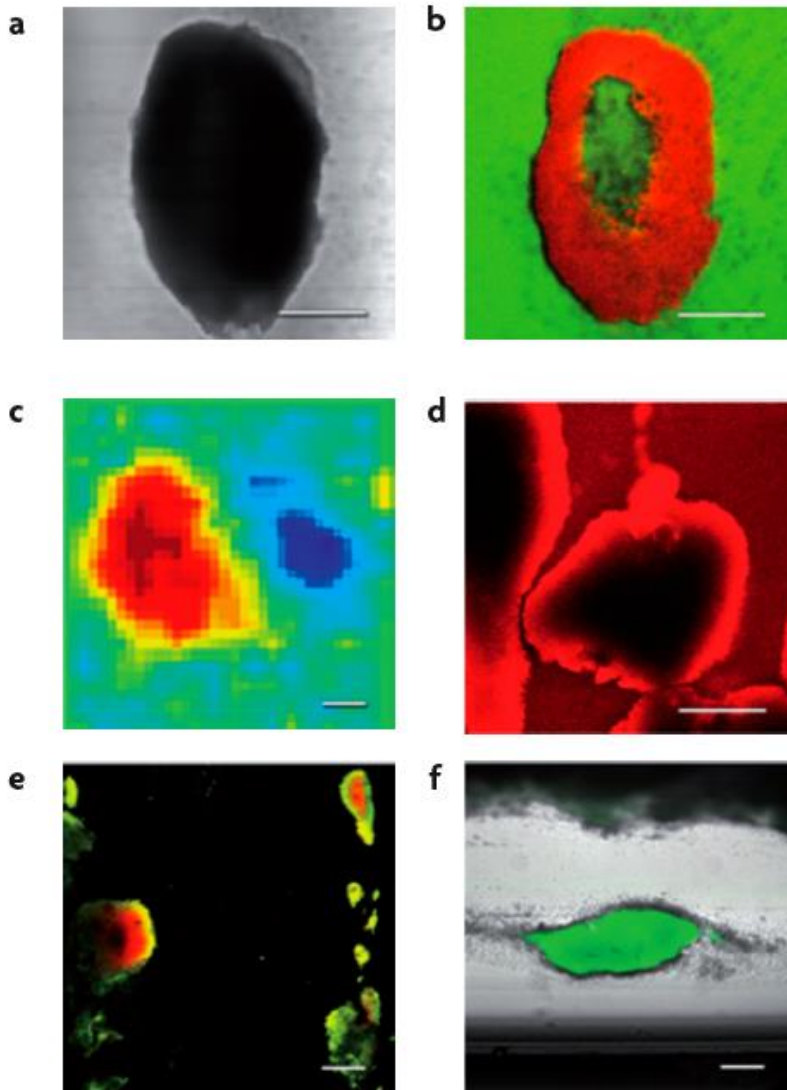
Partie IV

L'hétérogénéité du système biofilm

« Stratification physiologique en biofilm »



Hétérogénéité en biofilm



hétérogénéité structurale

- (a) Groupement de cellules (M. transmission).
(b) Biomasse en rouge (rhodamine B) & fluide en vert (fluorescéine)(Mic. Conf. Fluo.).

hétérogénéité des flux

- (c) Vitesse de l'eau (RMN) ; le rouge et le bleu indiquent des flux en directions opposées.

hétérogénéité chimique

- (d) Diffusion de la rodhamine B en biofilm (Mic. Conf. Fluo.).

hétérogénéité métabolique

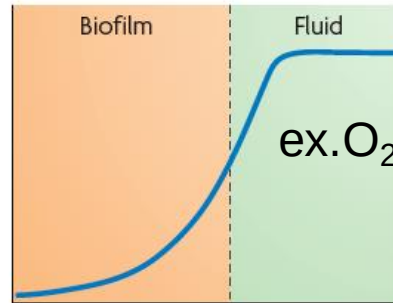
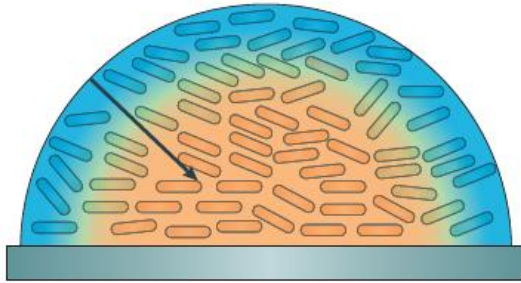
- (e) Synthèse d'ADN (immuno-marquage ; vert) en périphérie d'amas cellulaires (rouge).

- (d) Perméabilisation périphérique de cellules (gris foncé) par la javel - cellule intactes en vert

(barre d'échelle 100 µm)

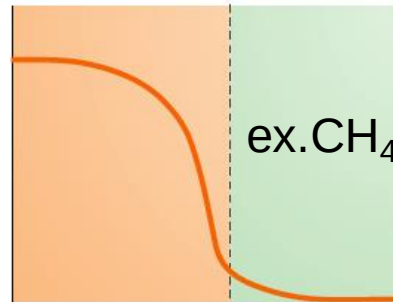
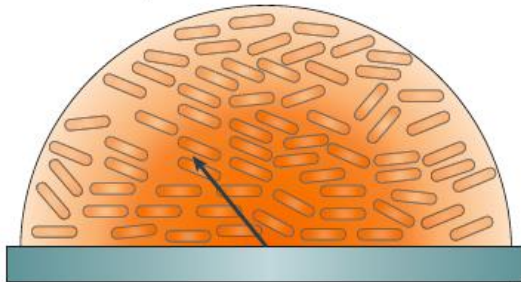
Hétérogénéité chimique en biofilm

a Metabolic substrate



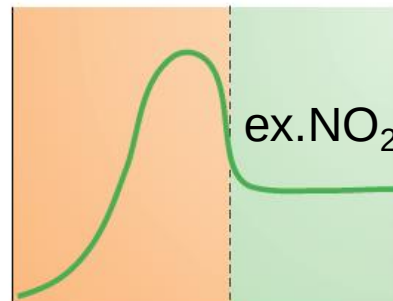
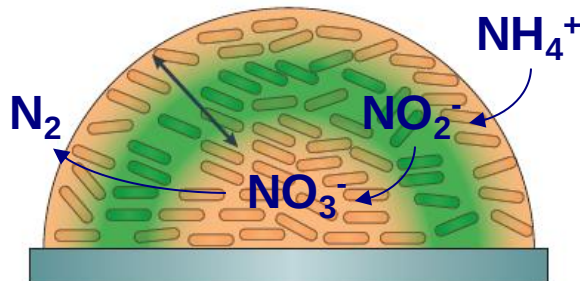
La concentration en **substrats** provenant de l'environnement décroît vers l'intérieur du biofilm (diffusion - consommation).

b Metabolic product



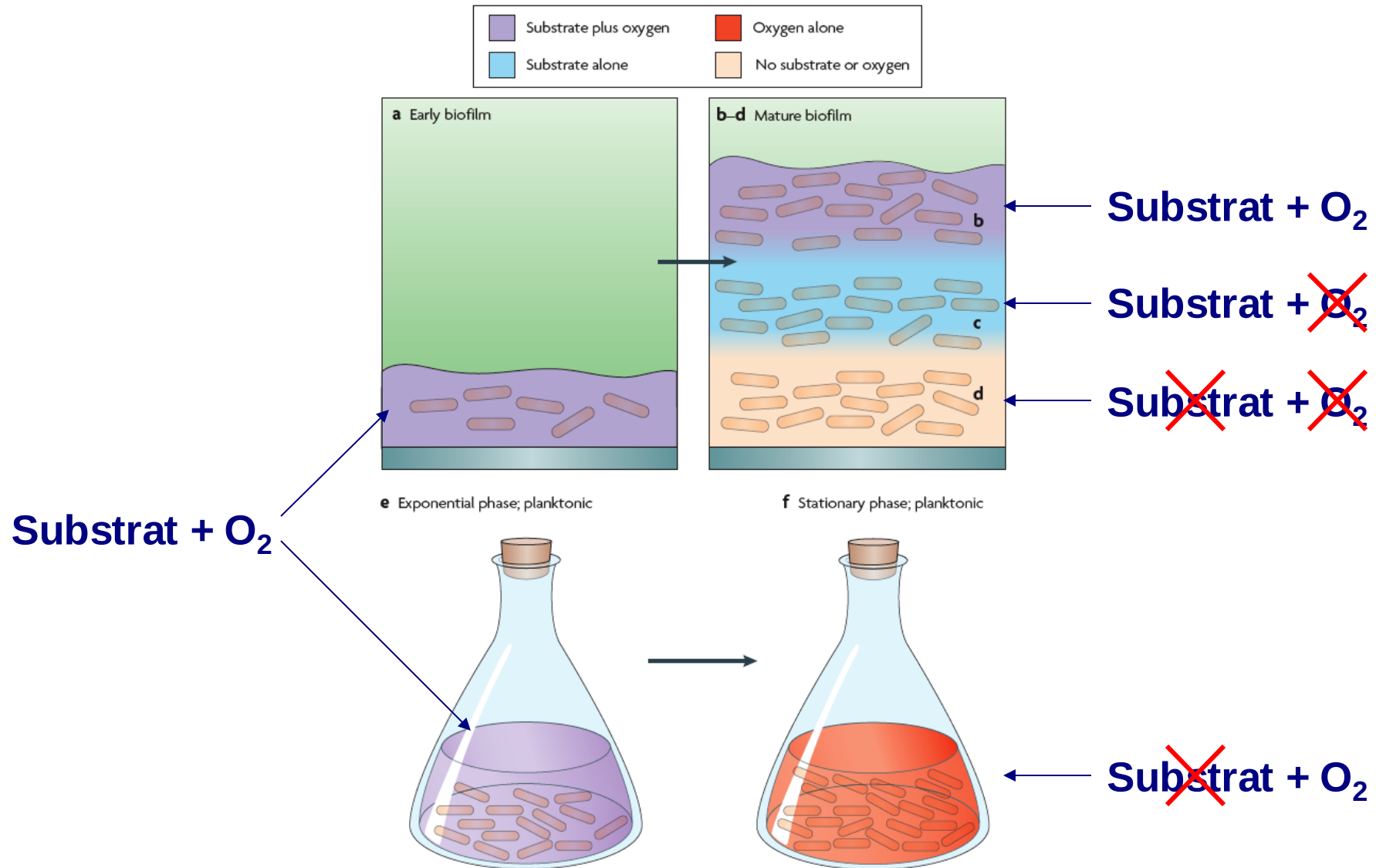
A l'opposé la concentration en **produits métaboliques** est plus élevée vers l'intérieur du biofilm.

c Metabolic intermediate



un **intermédiaire métabolique** qui serait à la fois produit et consommé par le biofilm peut parfois présenter des zones de concentrations maximales.

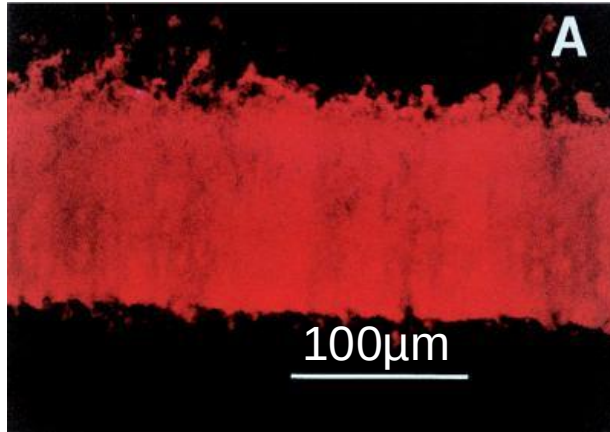
Hétérogénéité physiologique en biofilm





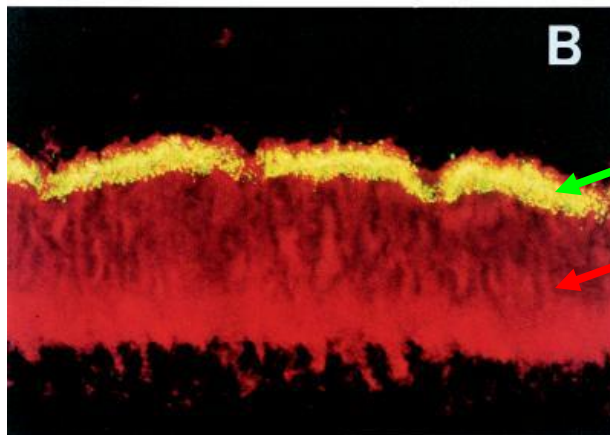
Hétérogénéité liée au mode biofilm

Ex : Activité phosphatase en biofilm



[Phosphate]
haute

Remarque : phosphatase alcaline.
= enzyme périplasmique qui libère
un phosphate à partir de différents
types de substrats. Ici, un substrat
synthétique (ELF97) devient jaune
fluorescent lorsqu'il est clivé.



Cellules Phosphatase +

Cellules Phosphatase -

} hétérogénéité

[Phosphate]
basse

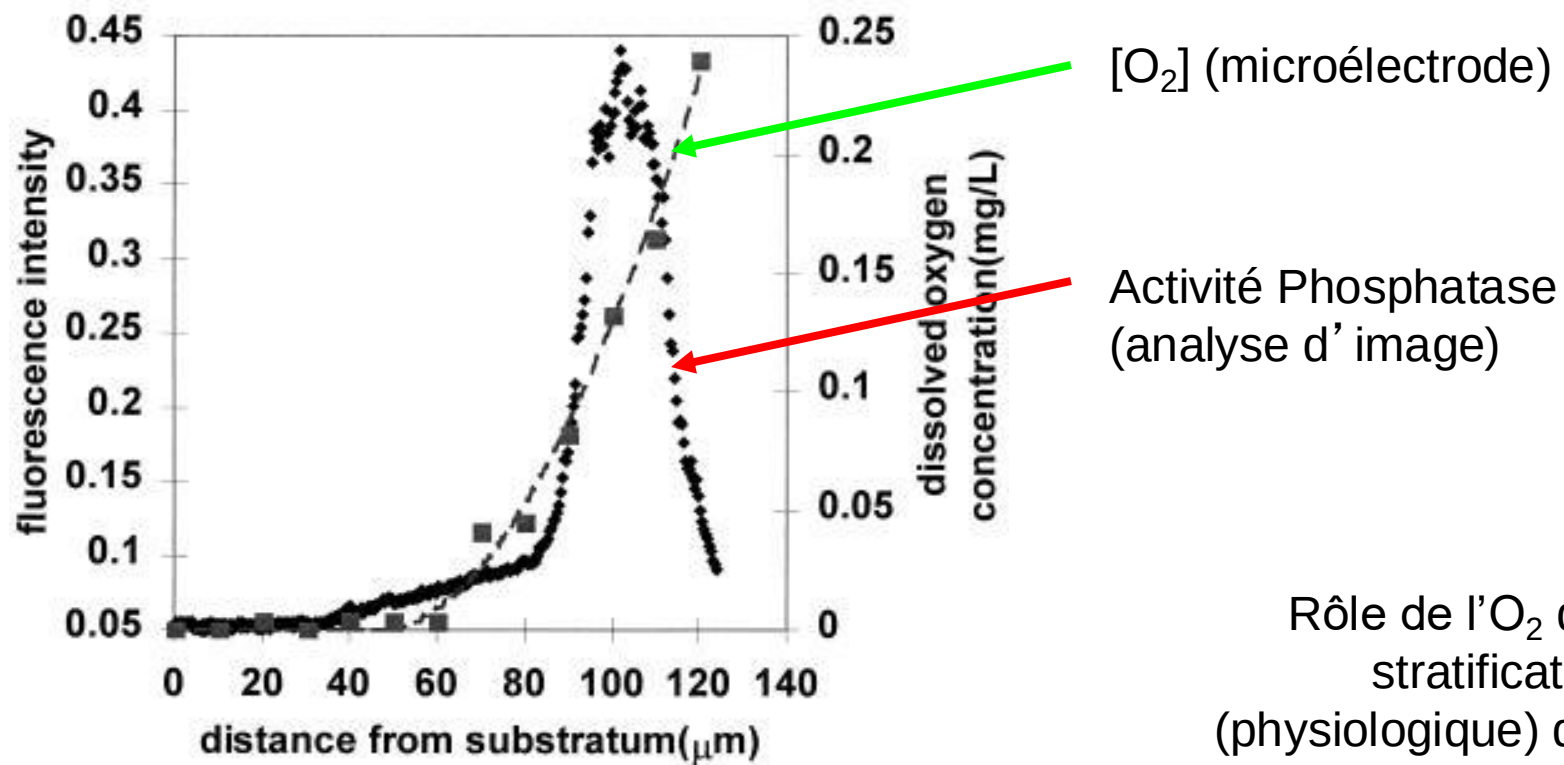
Profile non observé en
absence d' O₂. Rôle de l' O₂?

(En condition aérobie!!!)



Hétérogénéité liée au mode biofilm

Activité phosphatase en biofilm & O_2



Rôle de l' O_2 dans la stratification (physiologique) du biofilm?



Hétérogénéité liée au mode biofilm

Diffusion de l' O₂ en biofilm

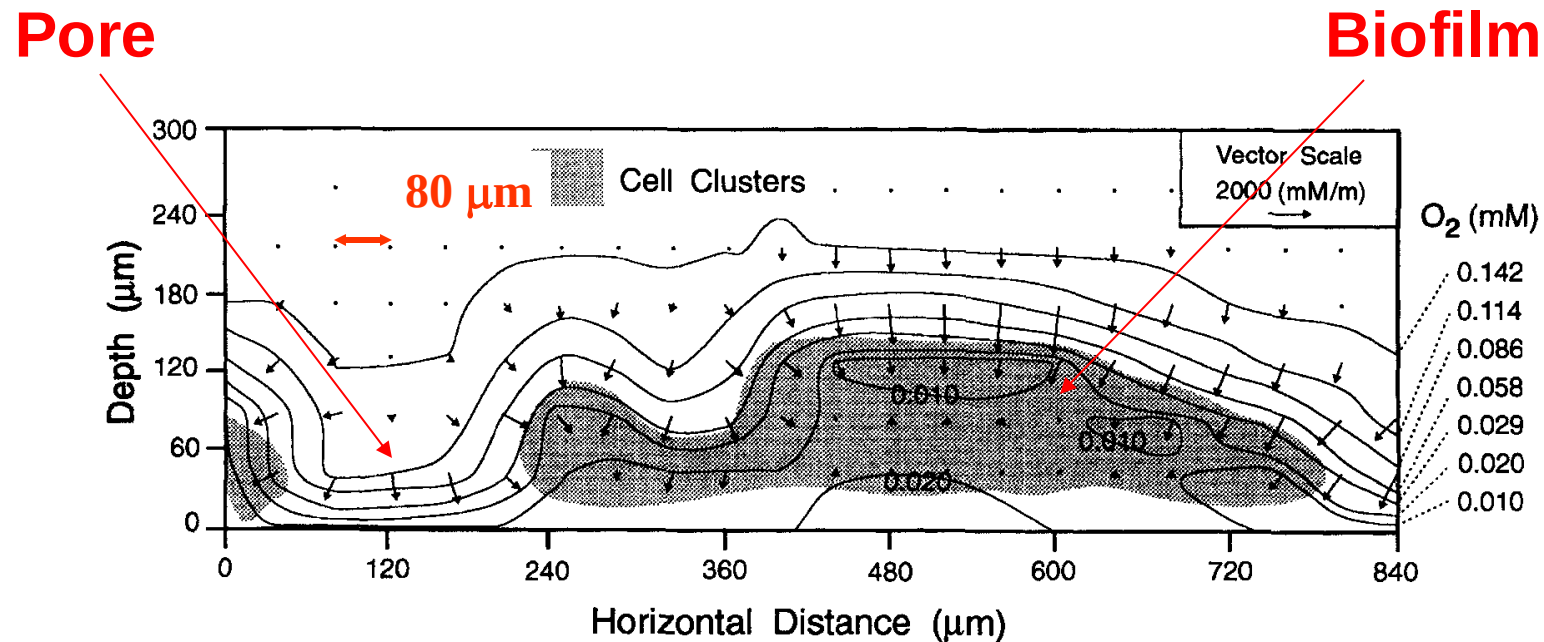


Figure 7. Oxygen contours and local gradients (represented by vectors) in a cross section of a 160- μm -thick biofilm. The positions of the cell clusters, shown as shaded areas, were determined by microscopic observation. Numbers within the figure and on the right margin indicate the local oxygen concentrations (mM).

« ... electrodes with tip diameters of 7 to 15 μm ... »



Hétérogénéité liée au mode biofilm

Diffusion de l' O_2 en biofilm - dispositif

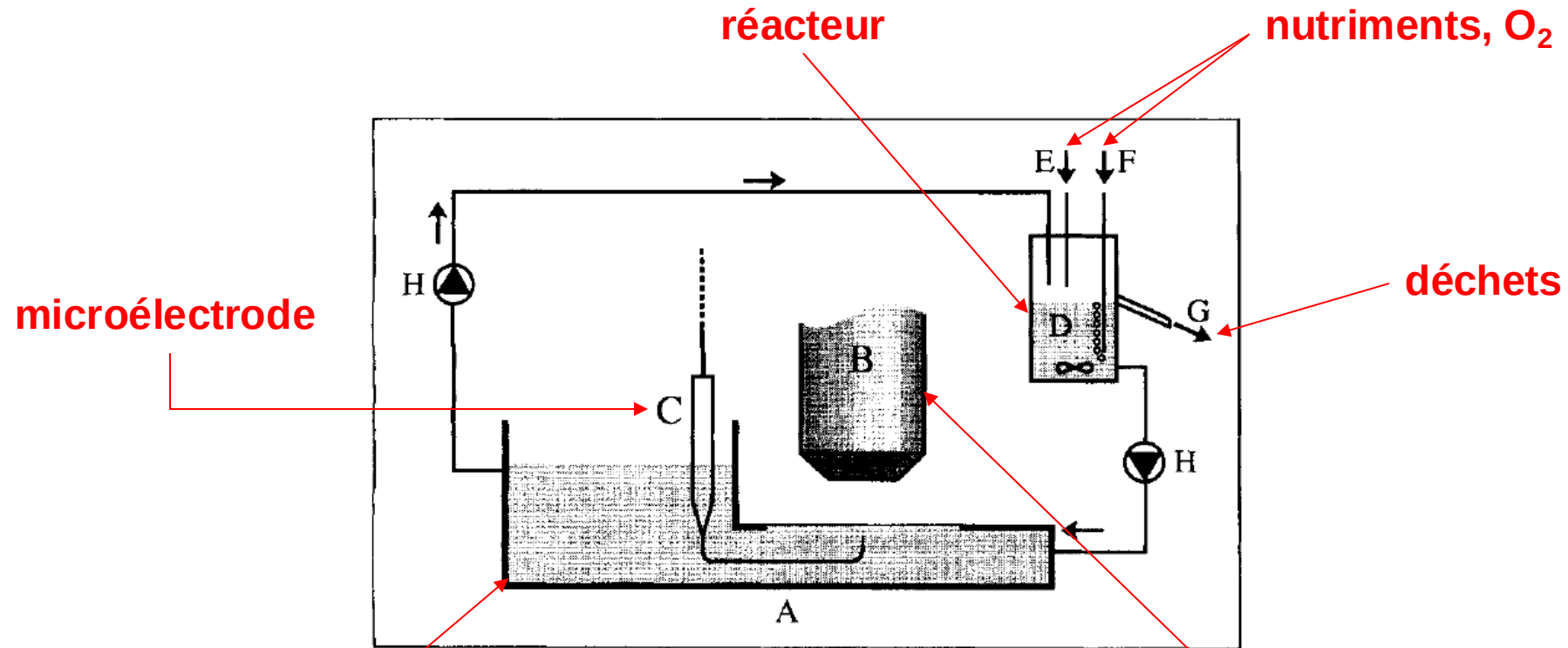


Figure 1. Schematic of experimental setup: (A) flow cell; (B) microscopic objective; (C) J-shaped microelectrode; (D) mixing vessel; (E) nutrient solution; (F) air supply; (G) waste outlet; (H) recirculation pumps.

chambre d'écoulement

objectif microscope



Hétérogénéité liée au mode biofilm

Diffusion de l' O_2 en biofilm

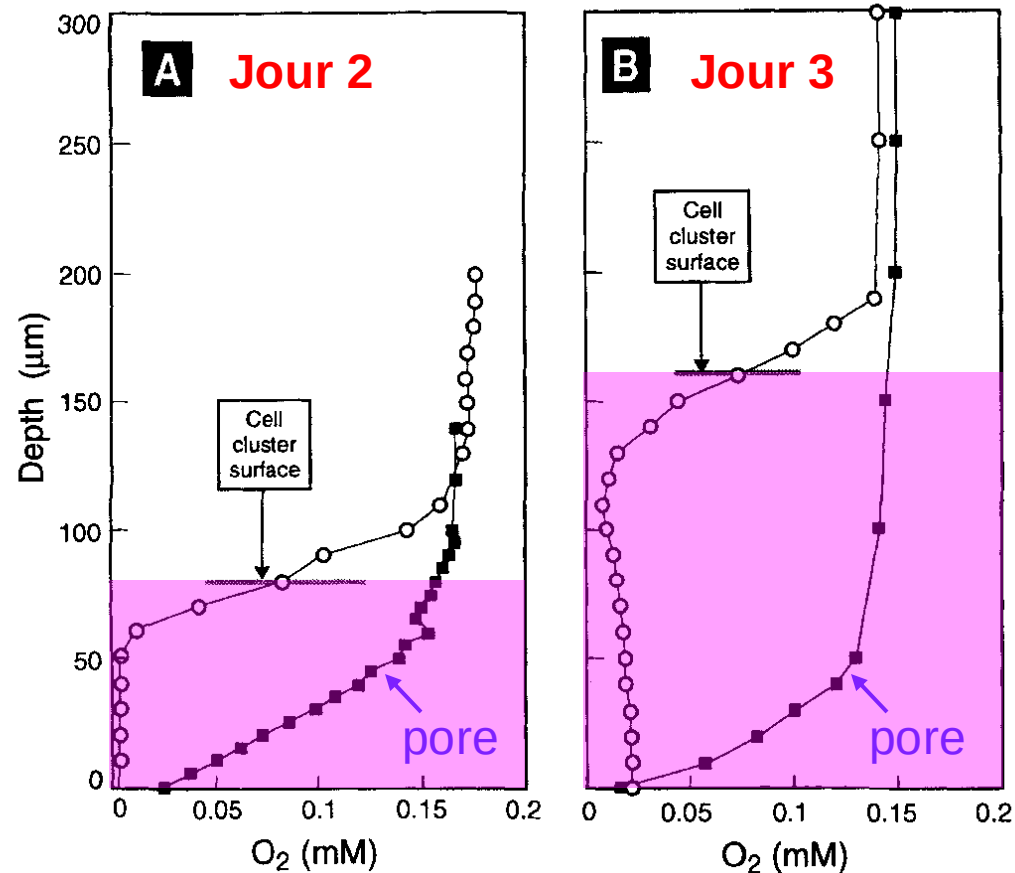
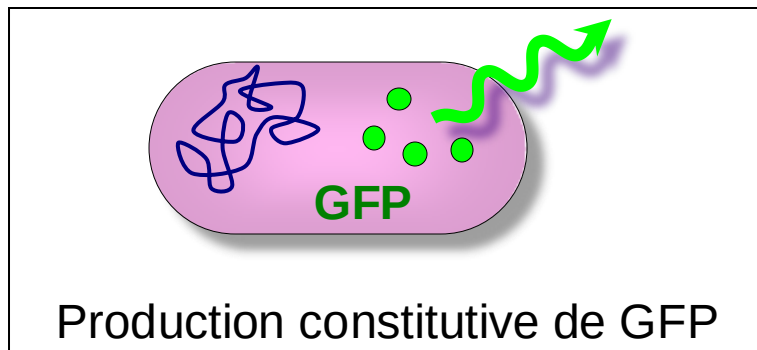
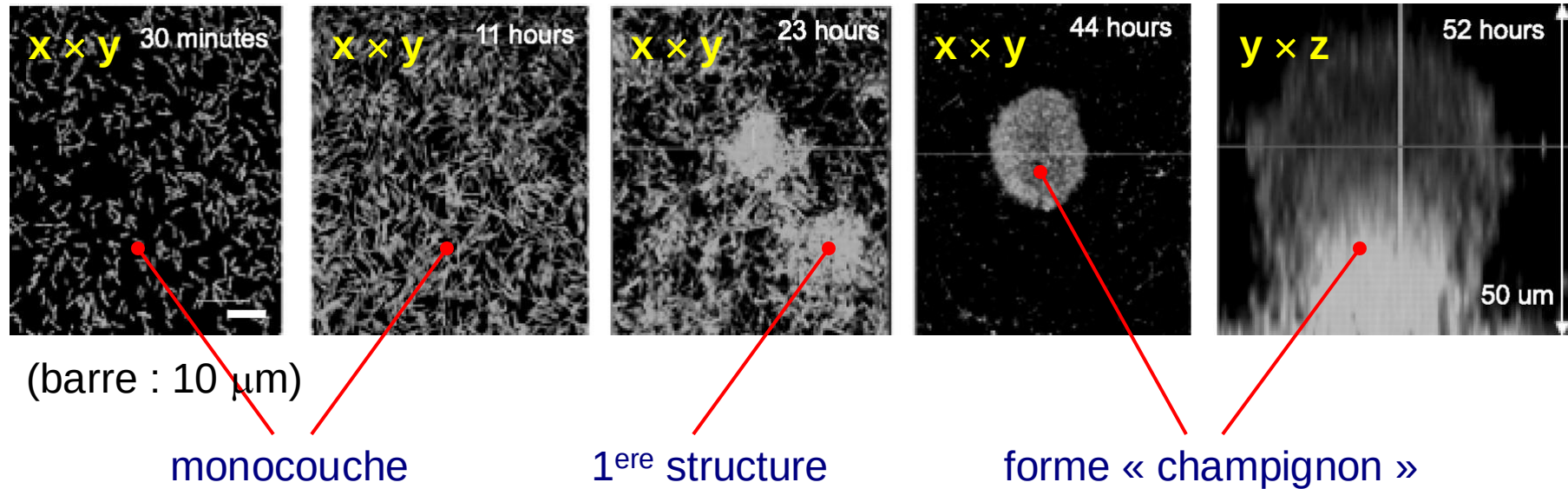


Figure 6. Oxygen concentration profiles measured in (■) a pore and (○) cell cluster in a biofilm of (A) 2 and (B) 3 days old.

- Diminution rapide de la $[O_2]$ à proximité de la surface du biofilm (hétérogénéité).
- Accroissement de la zone anaérobie avec la croissance du biofilm (conditions évolutives).
- Diffusion de l' O_2 à travers les pores vers différentes zones du biofilm (importance de la structure).
- taux de consommation en O_2 variable selon la profondeur (différentes espèces? différents états? ...)

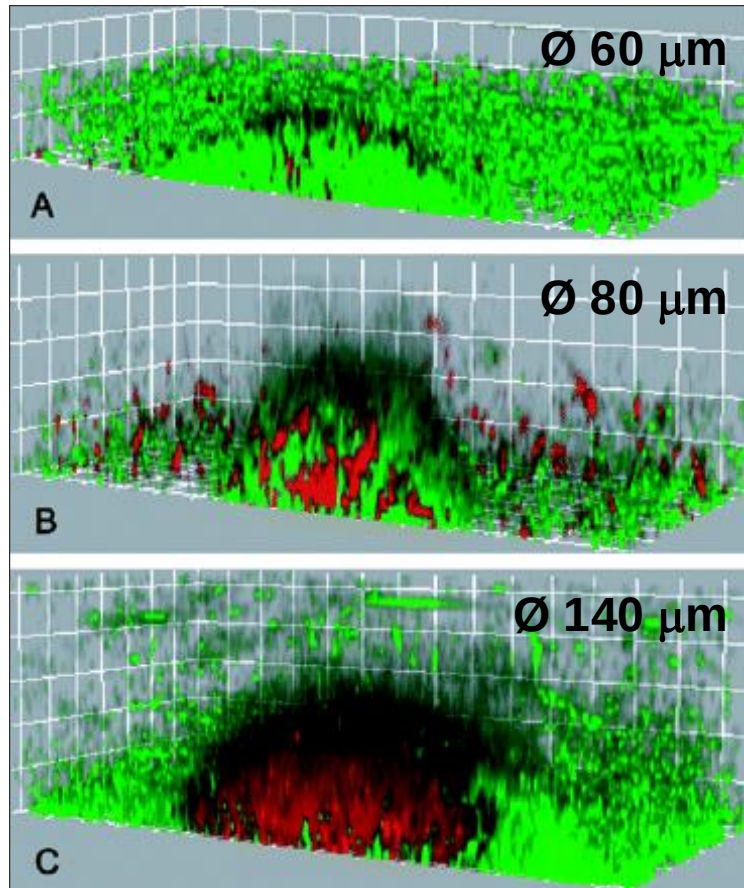
Stratification dans un biofilm de *Shewanella oneidensis*

structuration du biofilm dans le temps



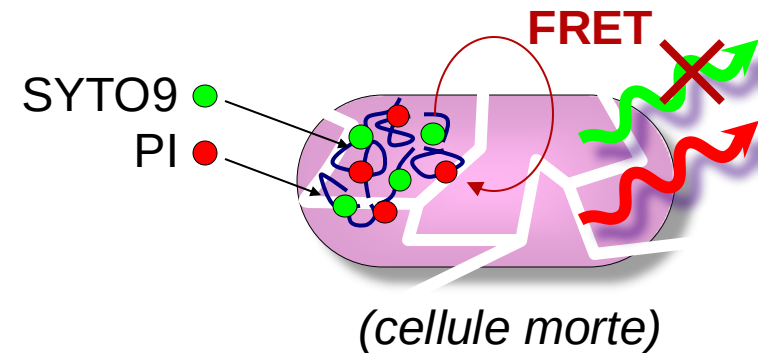
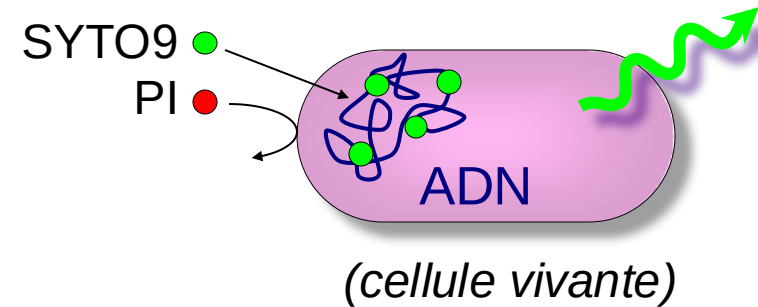
- Développement d'un biofilm en chambre d'écoulement (« flow cell »)
- Structuration du biofilm en « champignon ».

Stratification dans un biofilm de *Shewanella oneidensis*

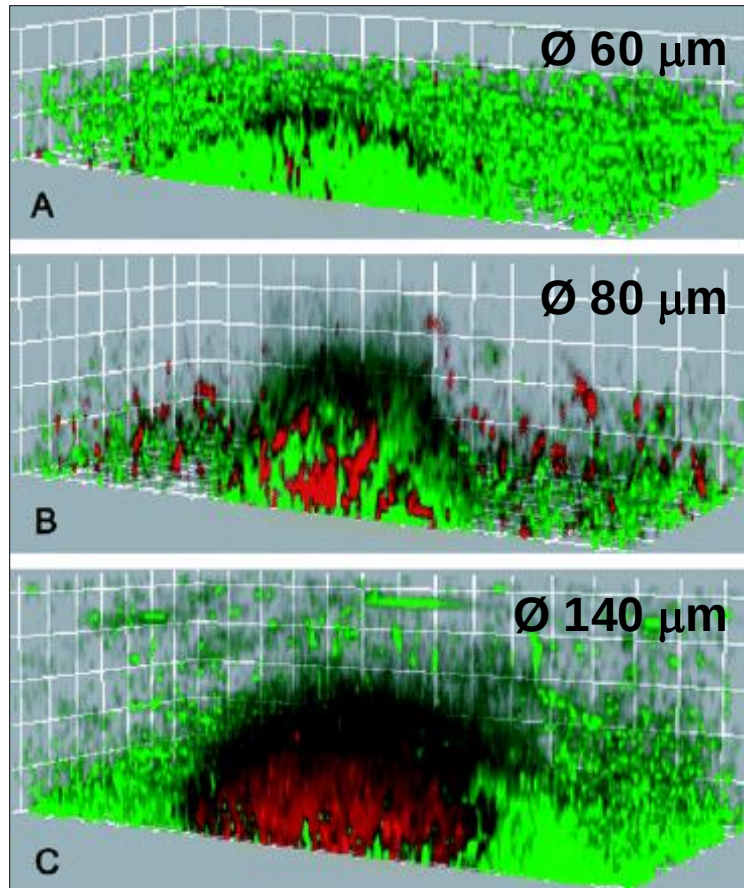


hétérogénéité spatio-temporelle

Live/Dead BacLight (Molecular Probes)



Stratification dans un biofilm de *Shewanella oneidensis*



(grille : 10 µm × 10 µm)

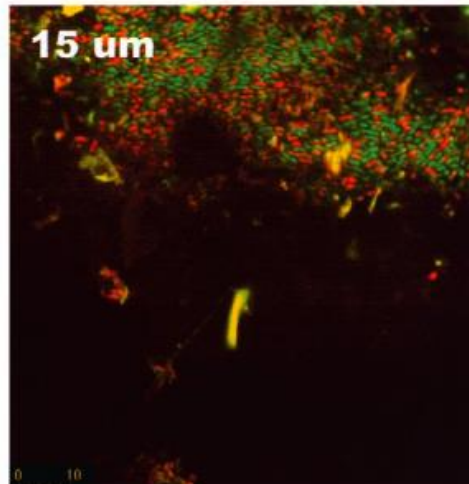
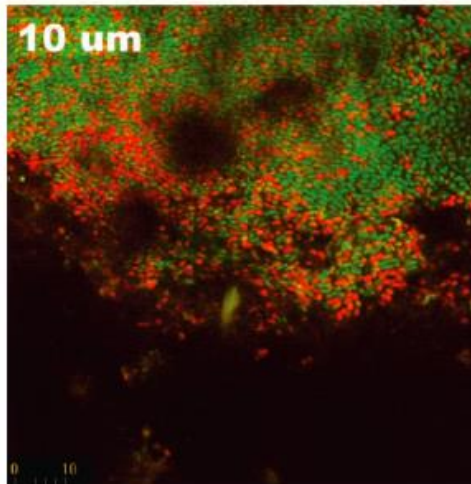
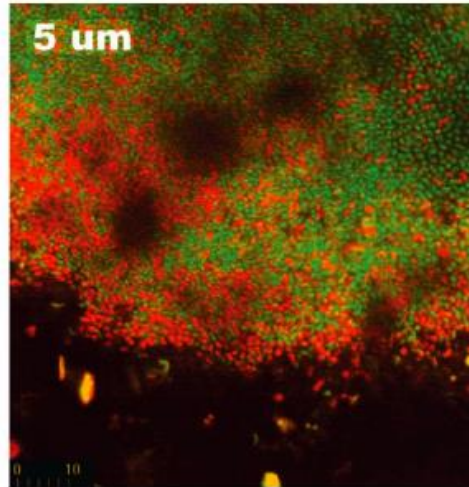
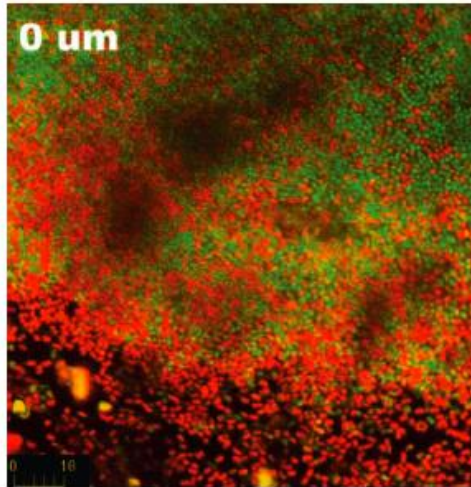
hétérogénéité spatio-temporelle

Marquage : Live/Dead BacLight
(Molecular Probes)

vert : cellules « vivantes »
rouge : cellules « mortes »

- lorsque la biomasse est faible la plupart des cellules du biofilm sont marquées « vivantes ».
- avec la croissance du biofilm de plus en plus de cellules sont marquées « mortes » au centre de la structure.

Hétérogénéité en biofilm et viabilité



Microscopie de fluorescence confocale laser à balayage.

Biofilm de 5 jours développé sur un coupon porté par une machine à papier.

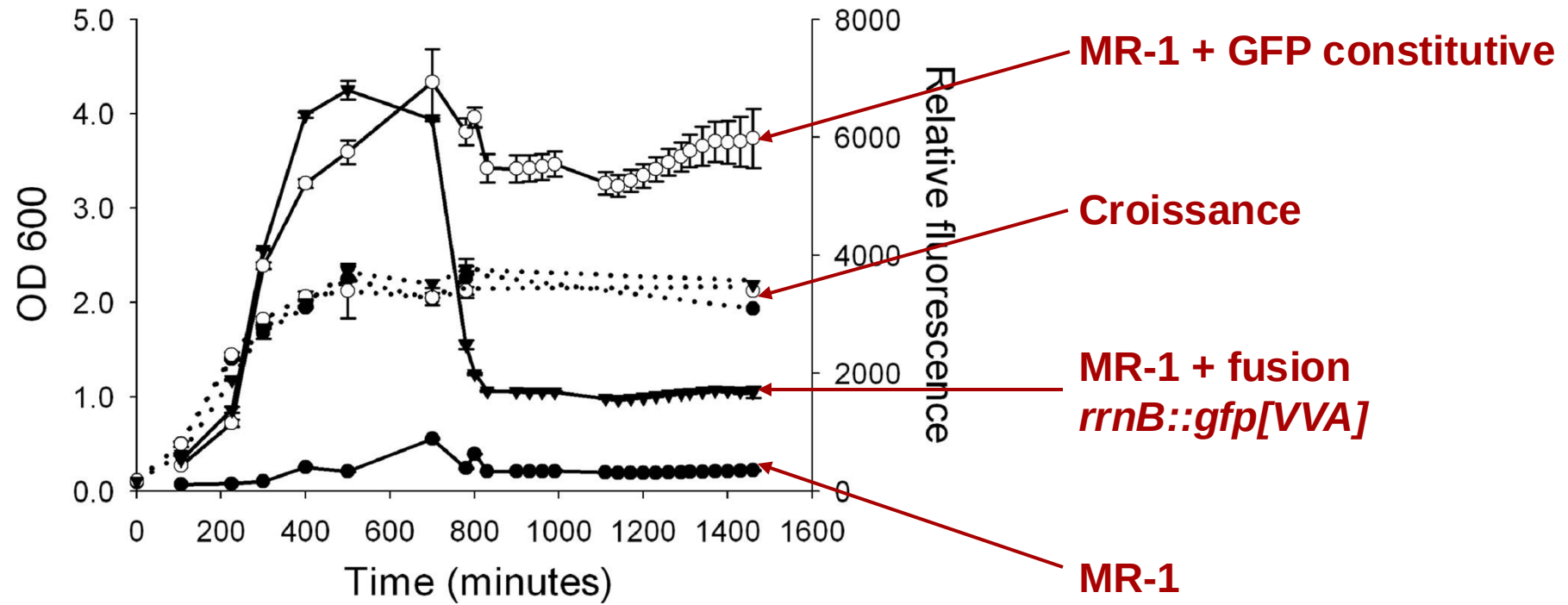
Sections de 1 μm analysées à 4 profondeurs (distance du support en μm).

Marquage SYTO 9 (cellules vivantes / vertes) + Iodure de propidium (cellules mortes / rouges).

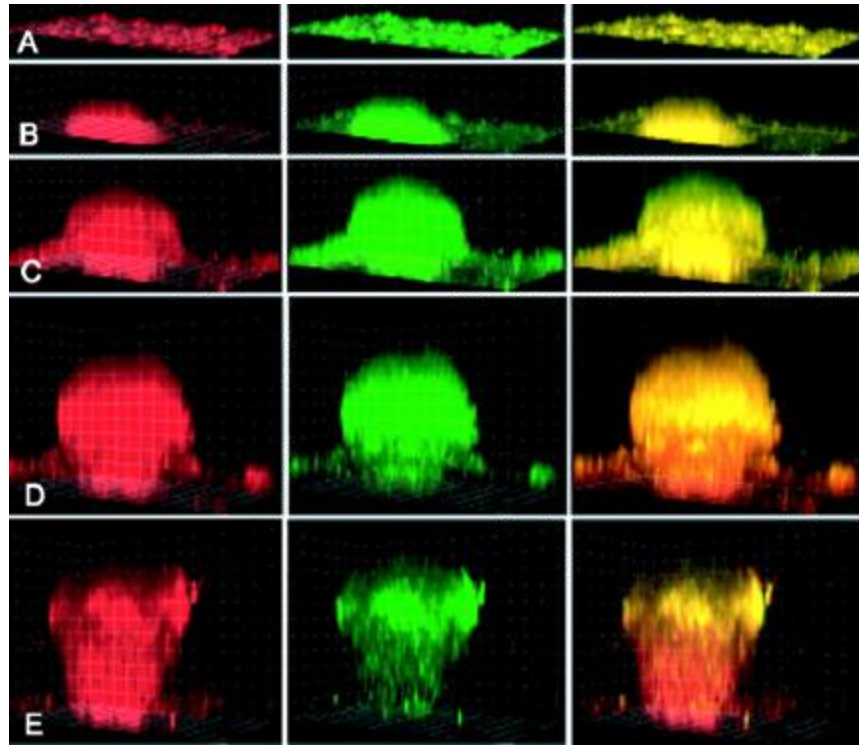
Les cellules mortes se situent principalement en périphérie et à proximité du support.

Stratification dans un biofilm de *Shewanella oneidensis*

cellules en croissance : outils génétiques



Stratification dans un biofilm de *Shewanella oneidensis*



↑
ecfp
constitutif

↑
fusion *rrnB*::
GFP[VVA]

↑
combinaison

(grille : 10 μm $\times$ 10 μm)

cellules en croissance

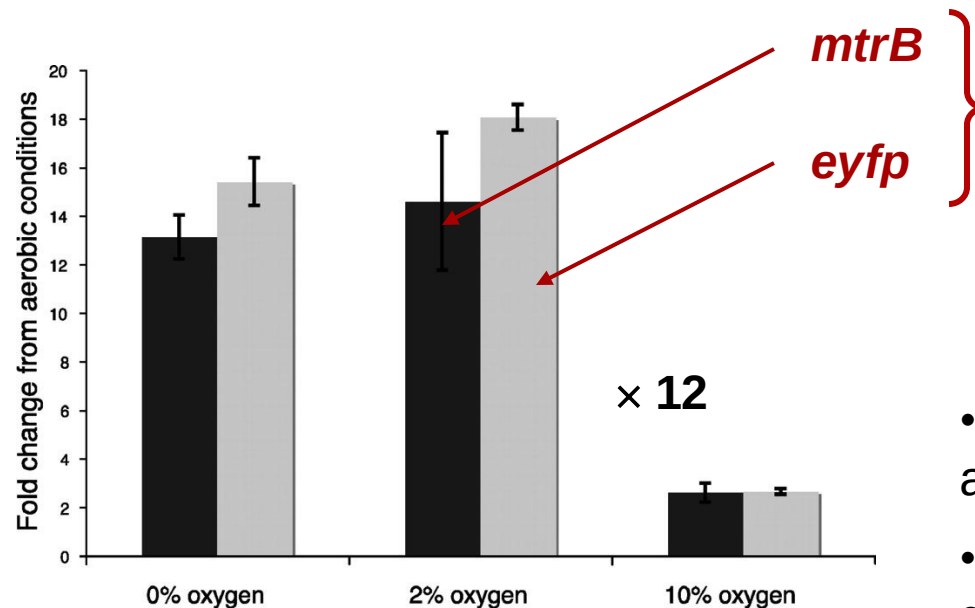
- Cellules fluorescent de manière constitutive dans le cyan (rouge = fausse couleur).
- Evolution du biofilm au cours du temps [A: 18h (8 μm); B: 28h (18 μm); C: 41h (52 μm); D: 65h (92 μm) ; E: 77h (112 μm)].
- Fusion *rrnB*::*GFP[VVA]*:
 - expression uniforme au début
 - expression prédominante dans le chapeau du « champignon »

... correspondance croissance & activité?

Stratification dans un biofilm de *Shewanella oneidensis*

cellules actives : outils génétiques

Problématique : trouver un système de fusion qui s'exprime dans les profondeurs du biofilm où l' O_2 est épuisé (à partir de 30 μm environ).

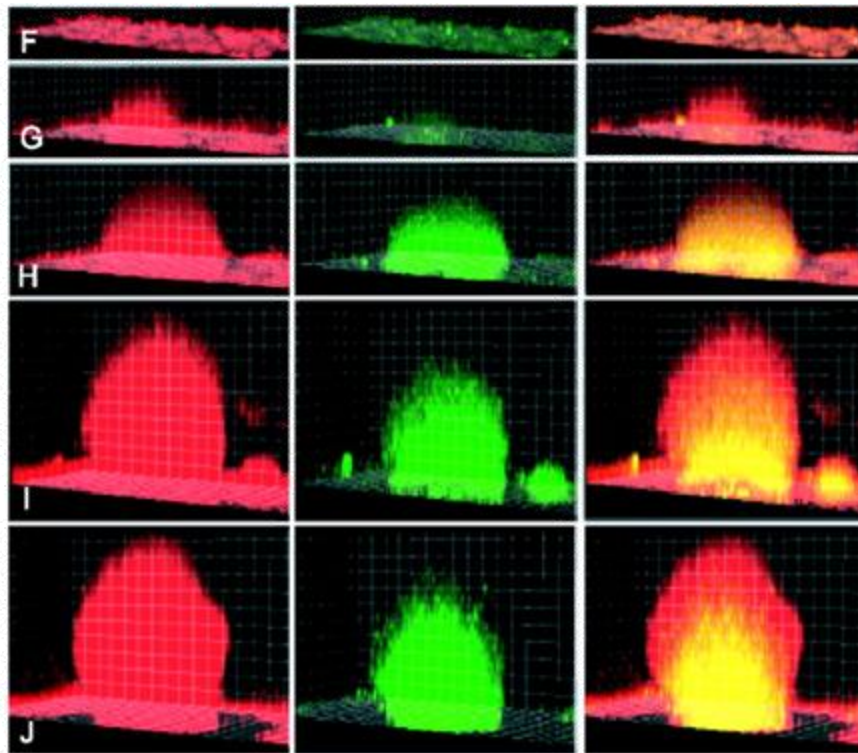


**Dosage des transcrits
par PCR quantitative**

**(dans une souche dérivée
de MR-1 contenant la
fusion *mtrB::eyfp[VVA]*)**

- *mtrB* = gènes activé pour la respiration anaérobie sur métaux.
- fusion *mtrB::eyfp[VVA]*, fluorescence quand $[O_2]$ basse.

Stratification dans un biofilm de *Shewanella oneidensis*



↑
ecfp
constitutif

↑
fusion *mtrB::*
eyfp[VVA]

↑
combinaison

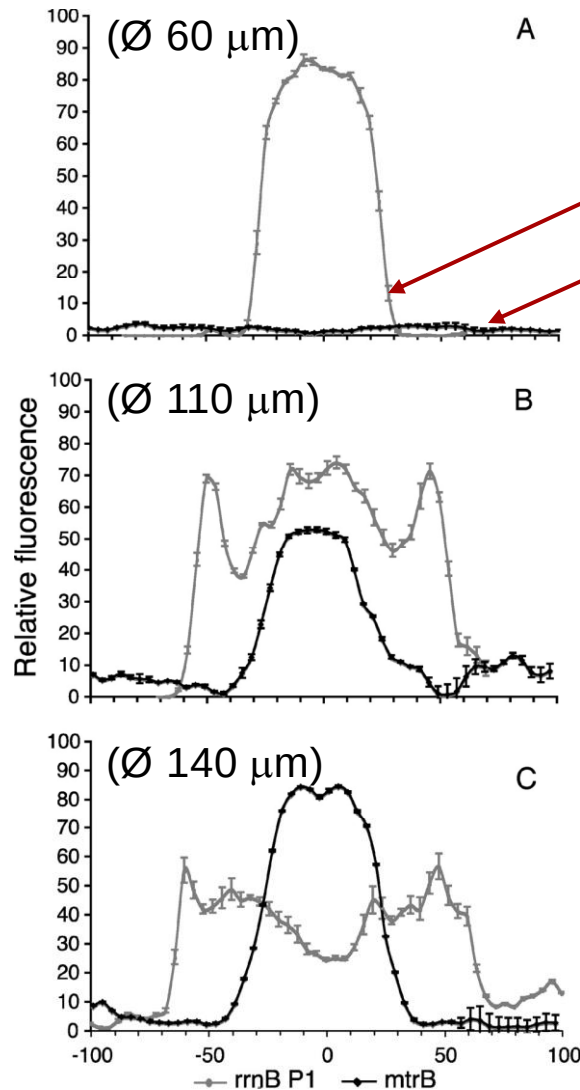
(grille : 10 μm $\times$ 10 μm)

cellules actives

- Cellules fluorescent de manière constitutive dans le cyan (rouge = fausse couleur).
- Evolution du biofilm au cours du temps [F: 17h (8 μm); G: 29h (18 μm); H: 47h (58 μm); I: 71h (104 μm) ; J: 85h (118 μm)].
- Fusion *mtrB::eyfp[VVA]*:
 - pas d'expression avant que le biofilm n'est atteint 60 μm .
 - expression prédominante dans les zones supposées sans O_2 .

... correspondance croissance & activité?

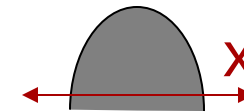
Stratification dans un biofilm de *Shewanella oneidensis*



correspondance croissance et activité

fusion *rrnB*::GFP[VVA]
fusion *mtrB*::eyfp[VVA]

- analyse des profiles de fluorescence selon l'axe x.



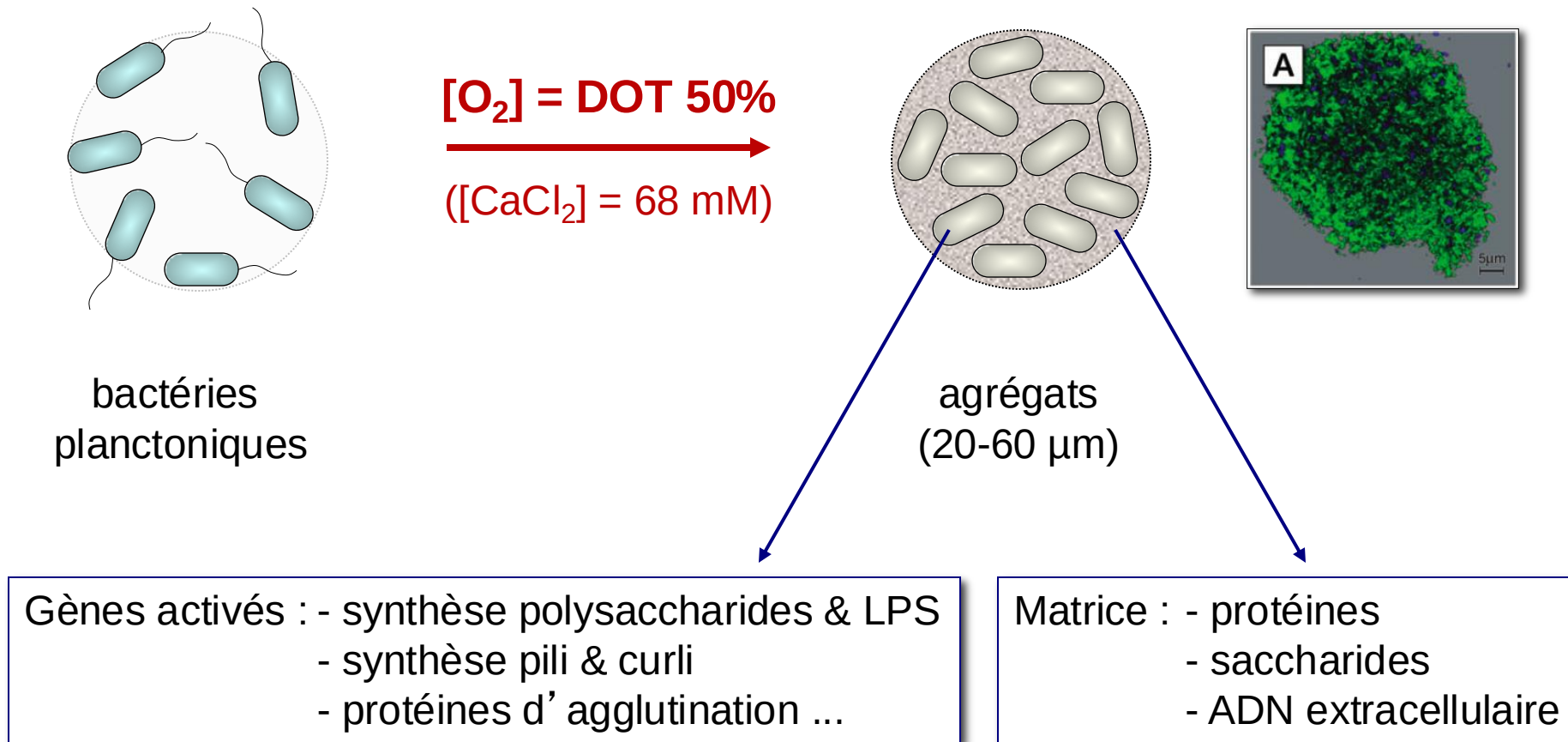
- les profiles observés dépendent de la taille de la structure (et non de l'âge).
- le profile d'expression de *mtrB* (« activité induite en anaérobie ») est inverse de celui de *rrnB* (« croissance »).

distance du centre (μm)



Agrégation de *S. oneidensis* MR-1

Influence de la $[O_2]$ sur l'agrégation



DOT = tension en oxygène

Stratification dans un biofilm de *Shewanella oneidensis*

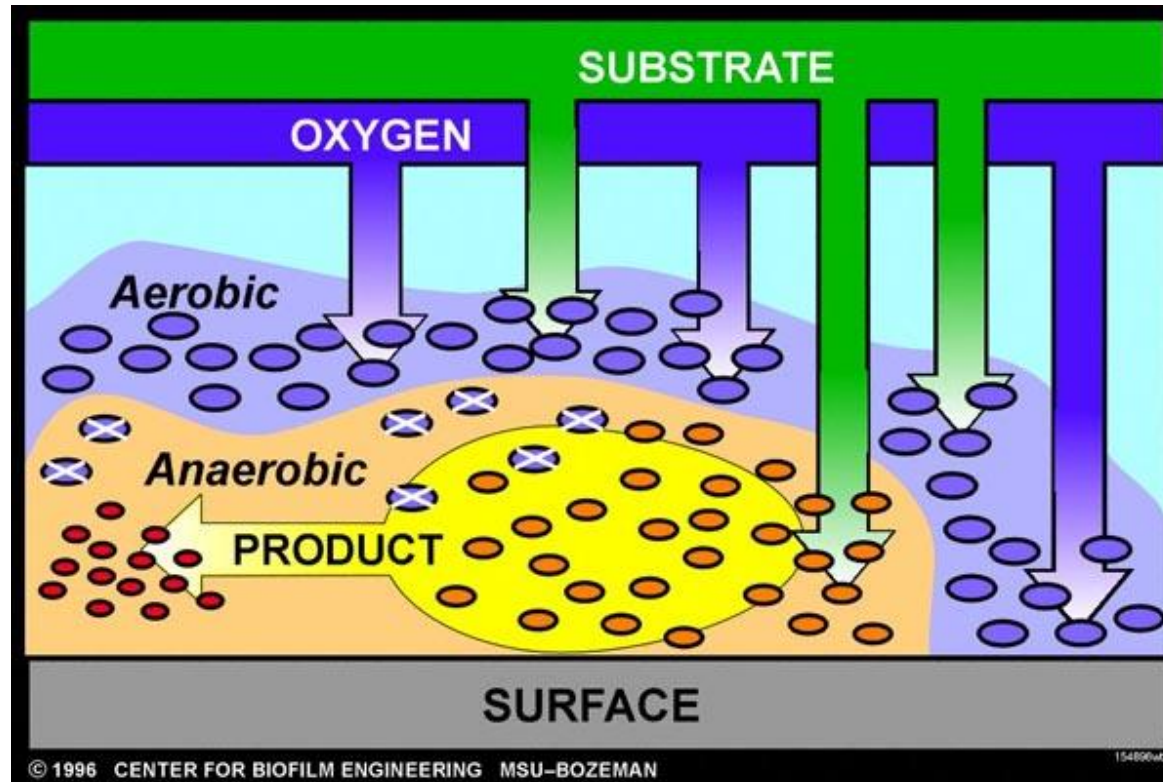


Conclusion :

- Limitation du système de marquage LIVE/DEAD (SYTO9 & PI).
- activité métabolique pas forcément couplée à la croissance :
 - (1) des zones du biofilm qui ne sont pas en croissance peuvent rester actives métaboliquement.*
 - (2) notion de stratification.*
- Influence des paramètres environnementaux

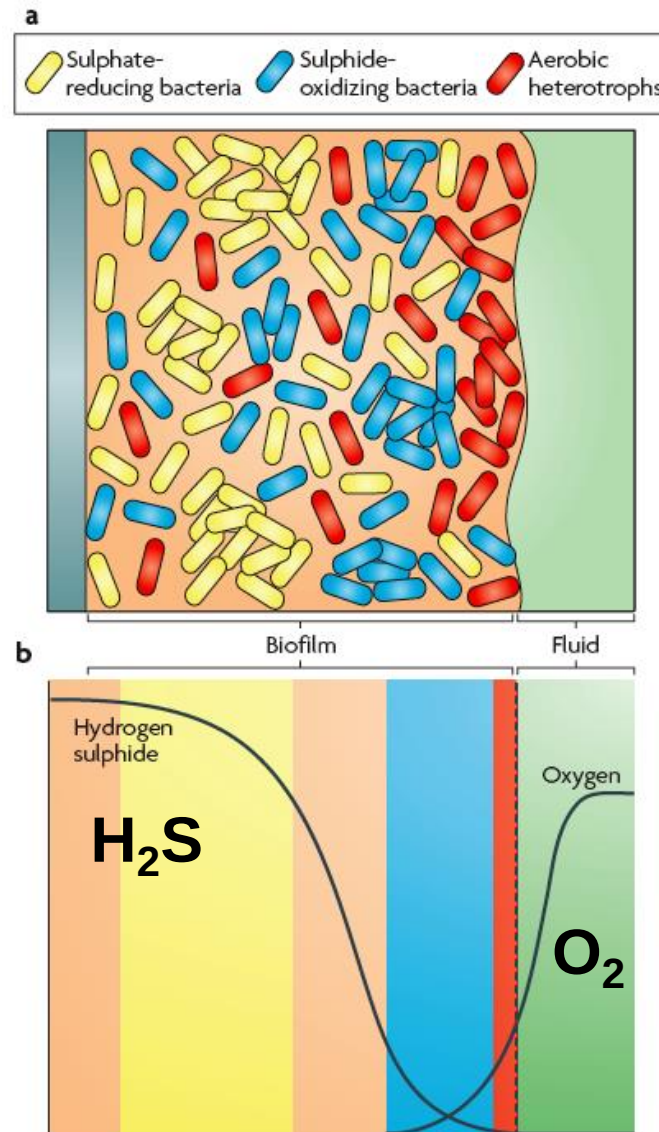
Avantage du mode biofilm

Cas des biofilms complexes (multi-espèces)



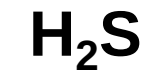
Répartition aérobies / anaérobies selon $[O_2]$
Déchets des uns = substrat des autres

Hétérogénéité physiologique en biofilm complexe

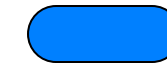


(anaérobies)

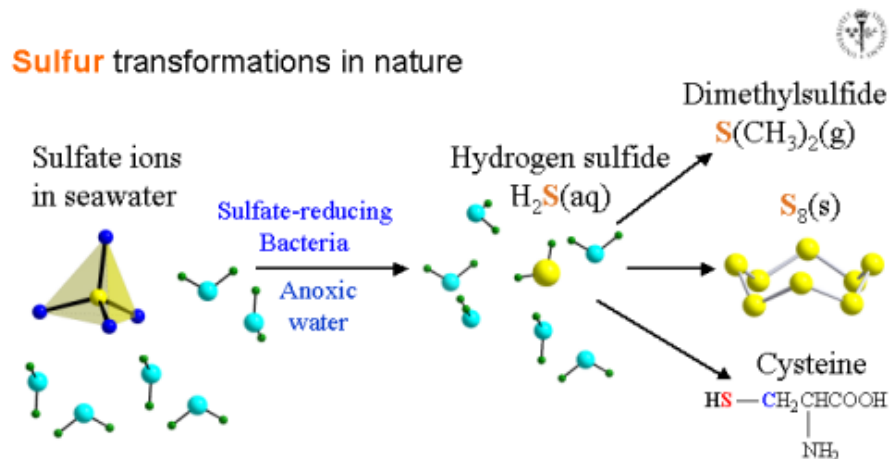
SRB
bactéries sulphato-reductrices



oxydation
du sulfure



Sulfur transformations in nature



Les tapis microbiens photosynthétiques

« photosynthetic microbial mats »



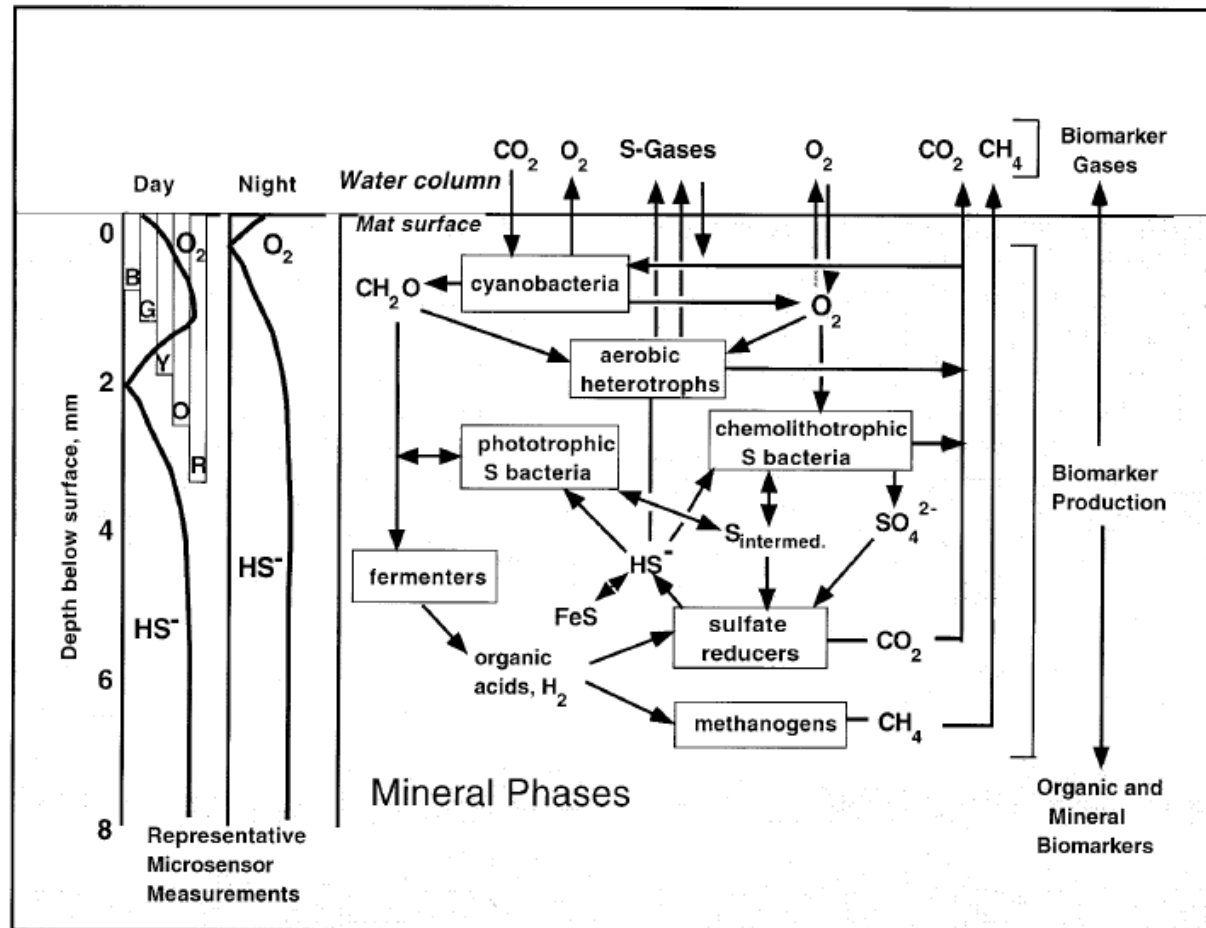
(piscine d' eau chaude, Yellowstone, USA)



tapis bactérien photosynthétique

Tapis microbiens photosynthétiques

« Ecosystème autonome »



Rq : S-bacteria = bactéries sulfureuses
oxydent H_2S en S_n

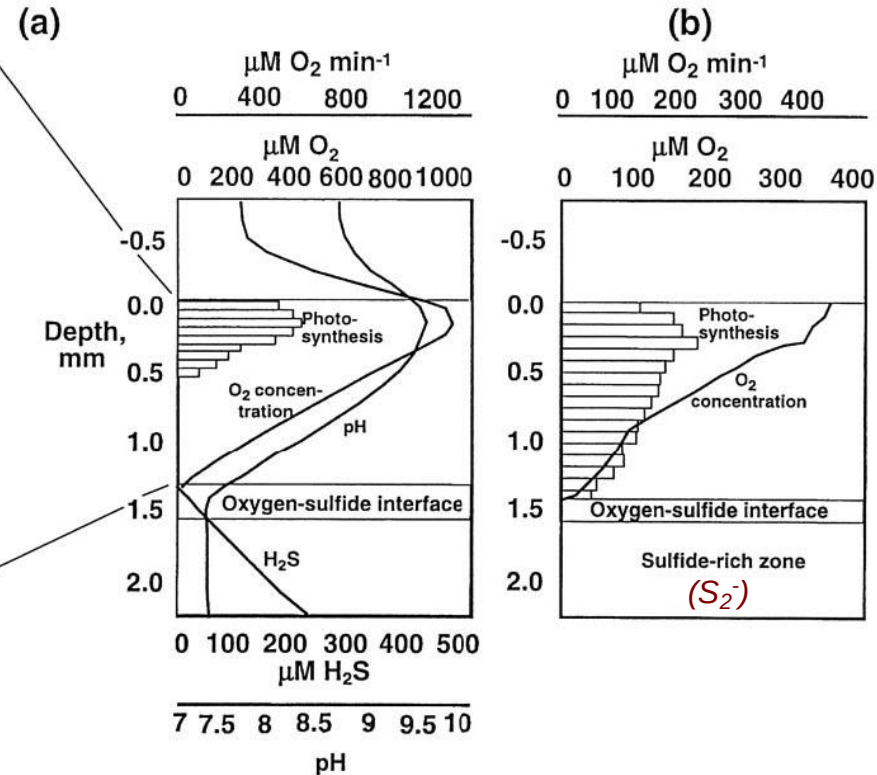
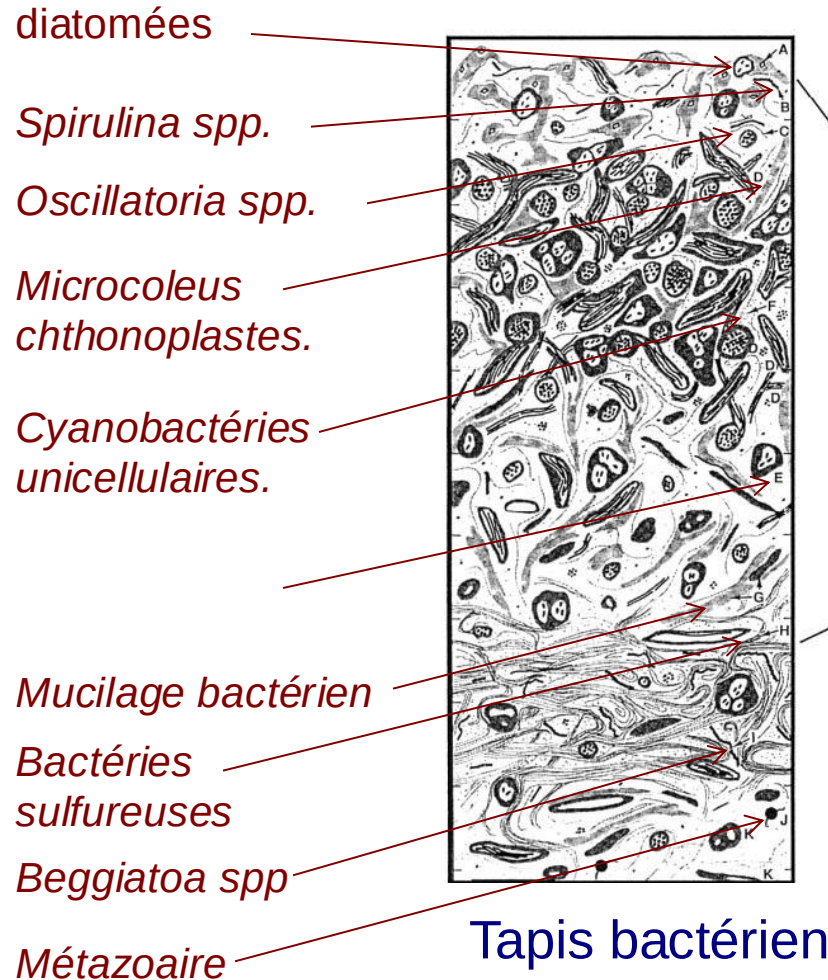
Tapis microbiens photosynthétiques

« Ecosystème autonome »

- Cyanobactéries : bactéries photosynthétiques $\text{CO}_2 \xrightarrow{h\nu} \text{M.O.} + \text{O}_2$
- Hétérotrophes : source de C. organique
- Phototrophes : source d'énergie = $h\nu$
- Chimiolithotrophes : source d'énergie chimique (inorganique)
- S-bacteria = bactéries sulfureuses (qui oxydent les sulfures)
- Respiration sur sulfate : $\text{SO}_4^{2-} + 8\text{e}^- + 8\text{H}^+ \longrightarrow \text{S}^{2-} + \text{H}_2\text{O}$
- Méthanogènes : archéobactéries autotrophes qui tirent leur énergie à partir de réactions formant du méthane.

Tapis microbiens photosynthétiques

« Ecosystème autonome »



mise en place de gradients



Techniques d'étude disponibles

Table 1 | **Advantages and limitations of experimental techniques for mapping physiological activities in biofilms**

Technique	Advantages	Limitations
Analysis of respiratory activity by CTC staining	A strong, stable fluorescence signal allows the localization of respiratory activity. Minimal sample processing required.	Only detects general respiratory activity. Not specific for other cellular activities. Not applicable to some anaerobic biofilms. Destructive and, therefore, only allows end-point analyses.
Differential membrane permeability staining	Allows the localization of cell-membrane integrity at the single-cell level. Useful for characterizing the effectiveness of antimicrobials. Simple commercial kit available.	Prone to artefacts, including incomplete stain penetration, matrix staining and false staining of live cells as dead.
DNA synthetic activity	Strong, stable fluorescence signal. Minimal sample processing required. Has a record of successful application to eukaryotes.	Useful for general DNA-synthesis activity. Not specific for other cellular activities. Requires uptake of BrdU substrate. Destructive and, therefore, only allows end-point analyses.
Reporter genes	No exogenous inducer or substrate required. Non-destructive and, therefore, allows continuous monitoring of gene expression over time. Allows the expression of specific genes to be monitored, rather than general metabolic activity. Different coloured fluorescent proteins allow several genes to be monitored simultaneously.	Requires genetically engineered strains and the reintroduction of engineered strains into the environment. The energy that is required for expression of the reporter genes might affect cell physiology. GFP requires oxygen for the activation of fluorescence.
FISH	Effective for localizing species diversity in natural biofilms. Engineered strains and exogenous substrates are not required and, therefore, any biofilm can be analysed.	Effective at quantifying cell numbers, but questionable as a quantitative method for gene expression. Not effective for low abundance RNAs without amplification.
MAR	Can be used in combination with FISH to characterize the activities of diverse microorganisms in natural biofilm assemblages at the single-cell level.	Only biosynthetic (substrate uptake) activity can be detected. Less effective for catabolic processes and, therefore, only semi-quantitative. Requires radioactive material and long exposure times. FISH and MAR are destructive and, therefore, only allow end-point analyses.
Fluorescent lectin staining of extracellular products	Lectin specificity and differential labelling allows the detection of multiple types of polysaccharides simultaneously.	Lectin must be specific for the polysaccharides that are produced by the particular microorganisms which are being tested. Lectins might not fully penetrate into the biofilm.
Laser capture microdissection microscopy and qRT-PCR	Allows the isolation of small groups of cells from defined locations in biofilms. Sensitive quantification of low-abundance mRNA transcripts, without prior genetic engineering of the bacteria. Multiplex qRT-PCR allows the quantification of several genes simultaneously.	Destructive and, therefore, only allows end-point analyses. Monitoring is not continuous.

CTC, 5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; GFP, green fluorescent protein; MAR, microautoradiography; qRT-PCR, quantitative reverse transcriptase real-time PCR.

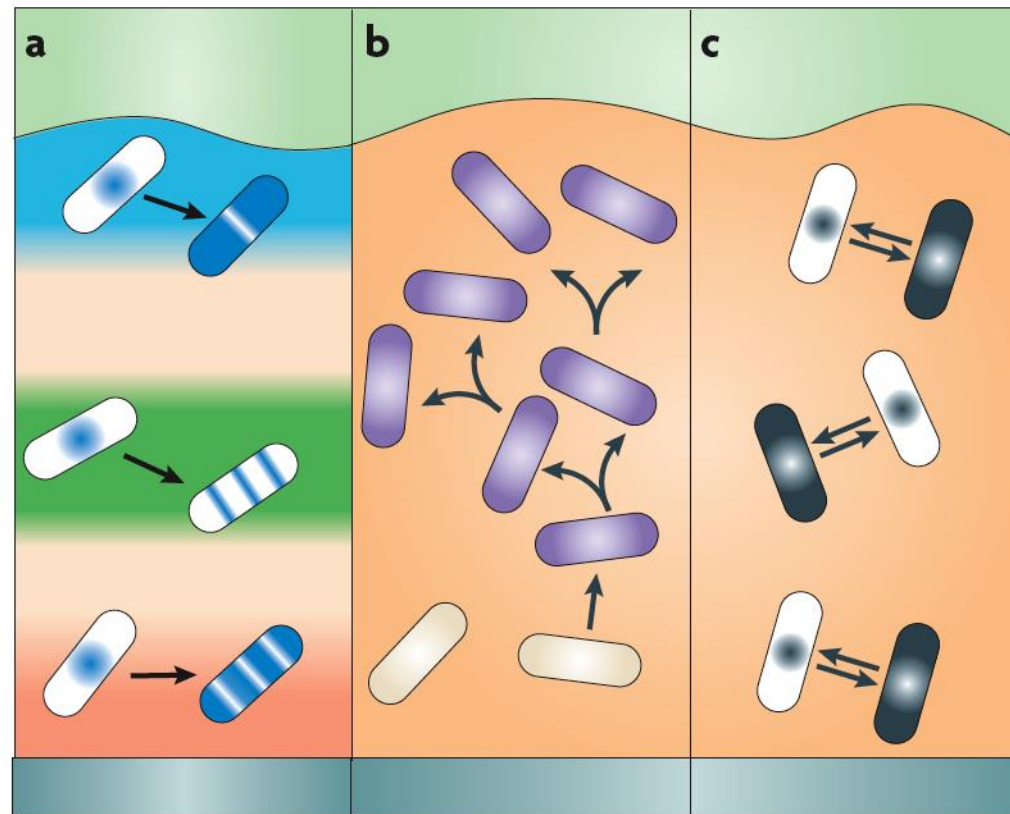
Incidence du facteur génétique sur la formation et l'hétérogénéité des biofilms

Origine de la multiplicité des états physiologiques en biofilm - hypothèses

Adaptation physiologique
à l'environnement local

Variation génotypique
et sélection naturelle

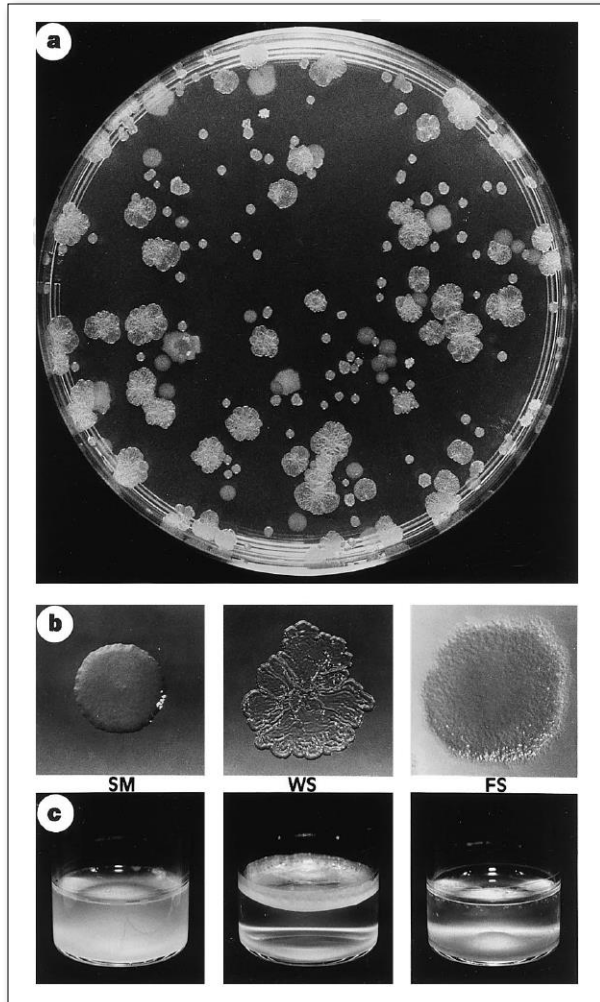
Alternance aléatoire
de l'expression de gènes



Une diversification génétique pré-biofilm peut contribuer significativement à la formation du biofilm.

Mécanismes? Diversification en biofilm?

Diversification génétique (*P.f.*)



Ancêtre

Pseudomonas fluorescence
Croissance en milieu hétérogène
(milieu King B - 7 jours - pas d'agitation)



diversification phénotypique
(aspect de colonies)



préférences marquées
de certains morphotypes
pour certaines niches.

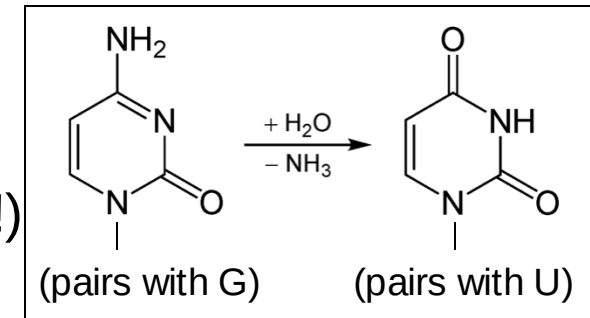


Mutations

Processus qui conduit à une altération de la séquence de l'ADN - source de variété des allèles

- Sources.

- erreur de réplication
- lésion chimique (radiations, mutagènes,..., l'eau!)
- ADN mobile (transposons, ...)



*ex. désamination de la
cytosine en uracile par H₂O*

- Mutations simples.

- transition (A ⇌ G ou T ⇌ C) & transversion (purine ⇌ pyrimidine)
- insertion & délétion de nucléotides

- Mutations plus complexe.

- éléments génétiques mobiles (insertion de transposons,...)
- réarrangements de chromosomes (inversion, délétion....)

Taux de mutations spontanées

Taille du génome
(b ou pb)

nombre de mutations
par pb par réplication

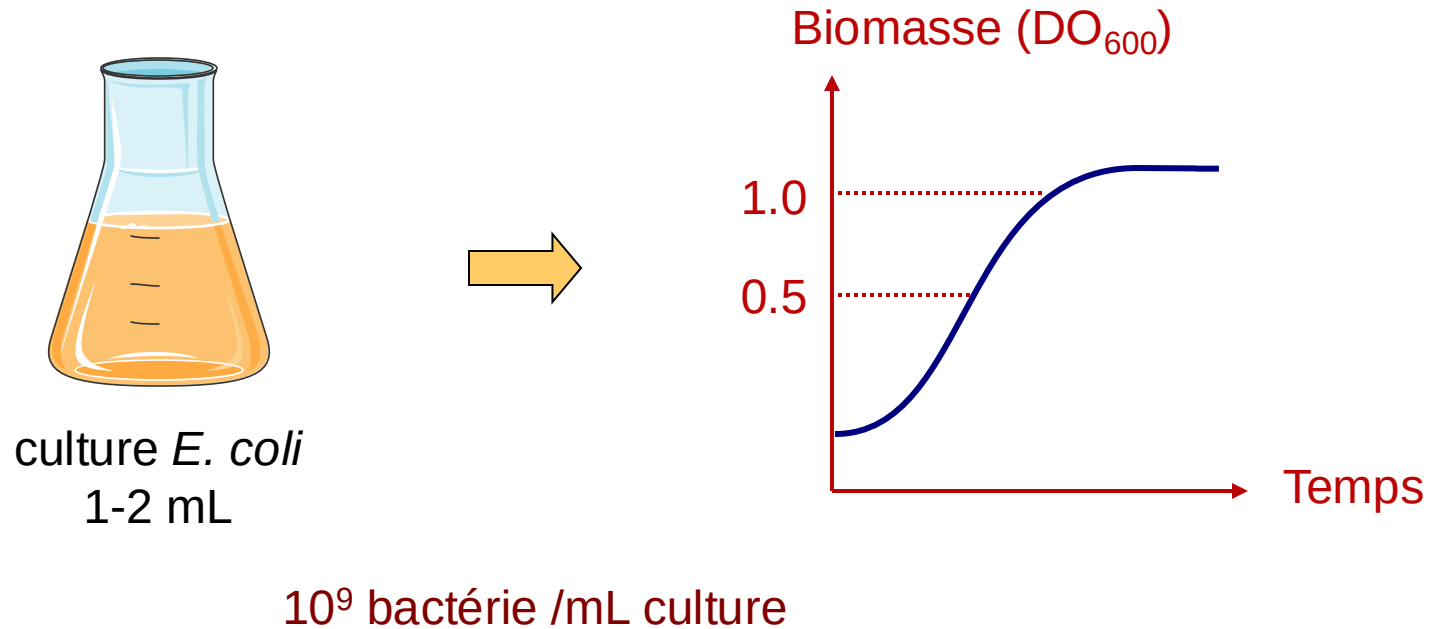
nombre de mutations
par génome par réplication

TABLE 3. Mutation Rates in Microbes with DNA Chromosomes^{1,19}

Organism	G^a	μ_b^b	μ_g^c
Bacteriophage M13	6.4×10^3	7.2×10^{-7}	0.0046
Bacteriophage λ	4.9×10^4	7.7×10^{-8}	0.0038
Bacteriophages T2 and T4	1.7×10^5	2.4×10^{-8}	0.0040
<i>Escherichia coli</i>	4.6×10^6	5.4×10^{-10}	0.0025
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.2×10^7	2.2×10^{-10}	0.0027
<i>Neurospora crassa</i>	4.2×10^7	7.2×10^{-11}	0.0030
Mean			0.0034

NOTE: G = genome size in bases or base pairs. μ_b = mutations per base pair per genome replication. μ_g = mutations per genome per genome replication = $G \times \mu_b$.

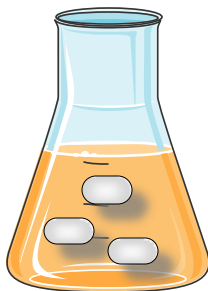
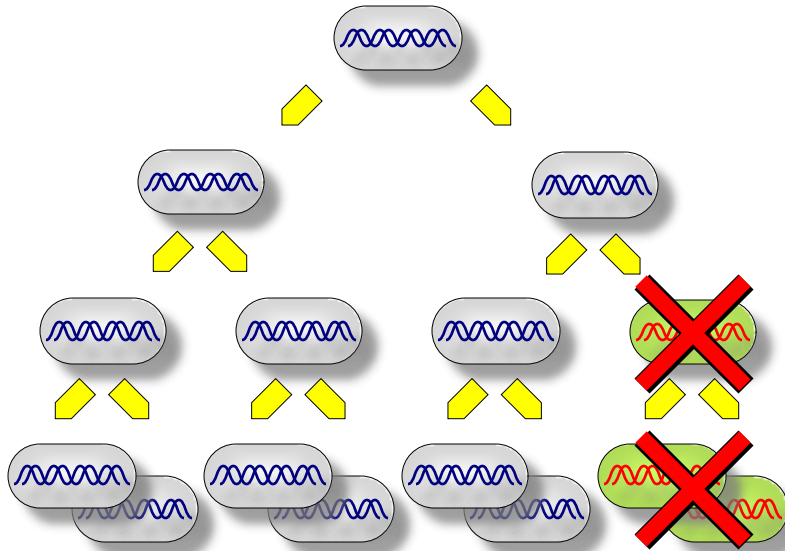
Taux de mutations spontanées



A l'échelle d'une culture, il existe un mutant pour
chaque nucléotide du génome!

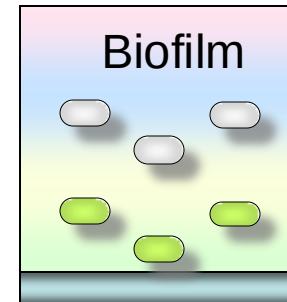
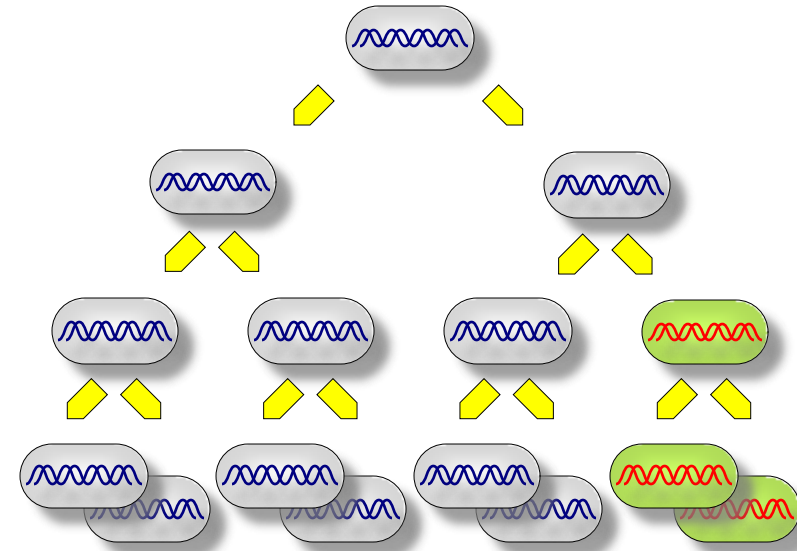
les dures lois de la sélection...

Environnement homogène



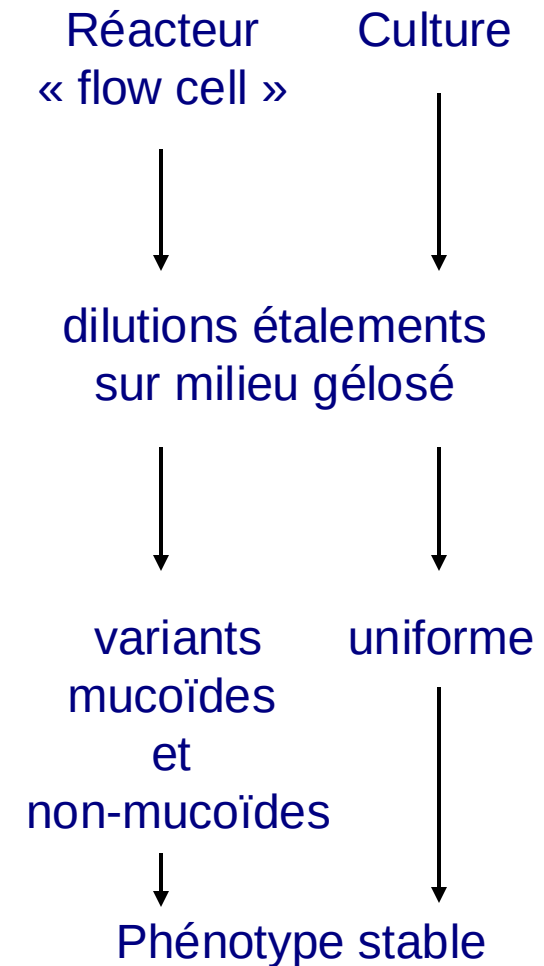
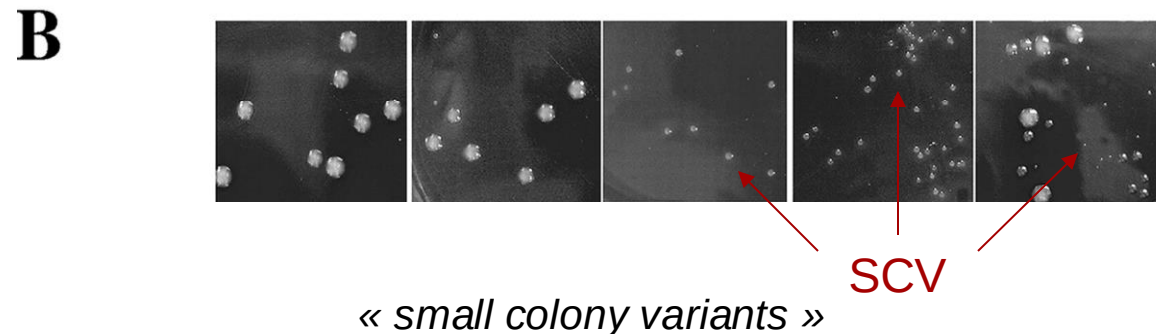
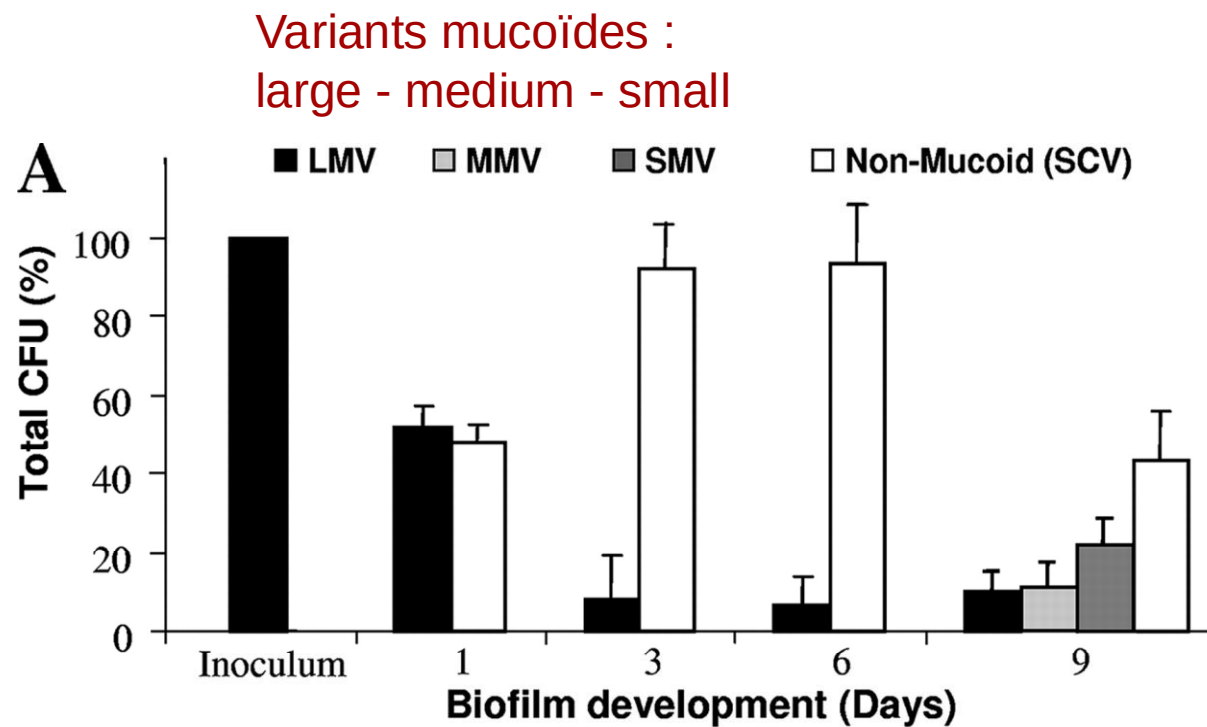
1 type de bactérie
adapté à
1 type de niche

Environnement stratifié



différents variants
différentes « fitness »

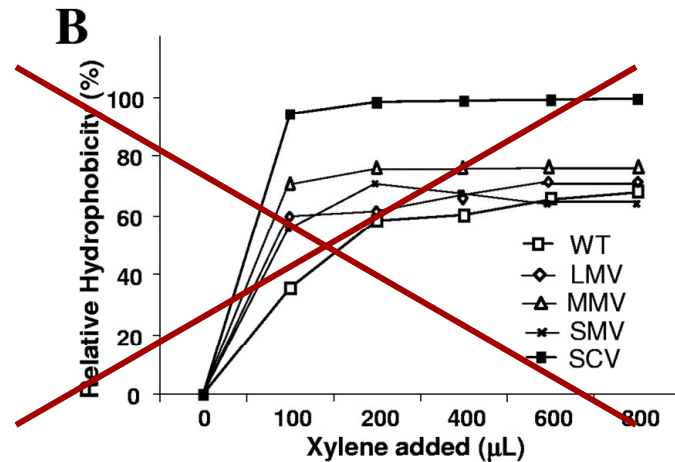
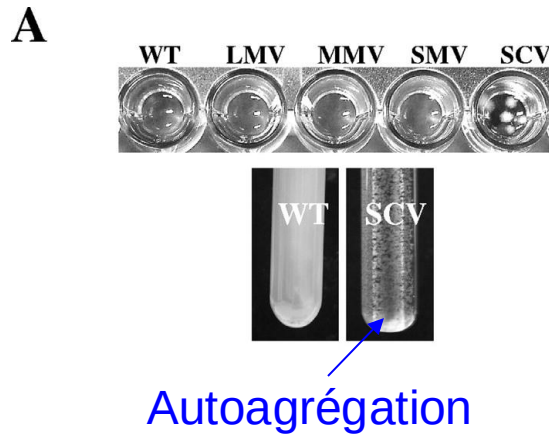
Emergence de variants durant la formation de biofilms de *Streptococcus pneumoniae*





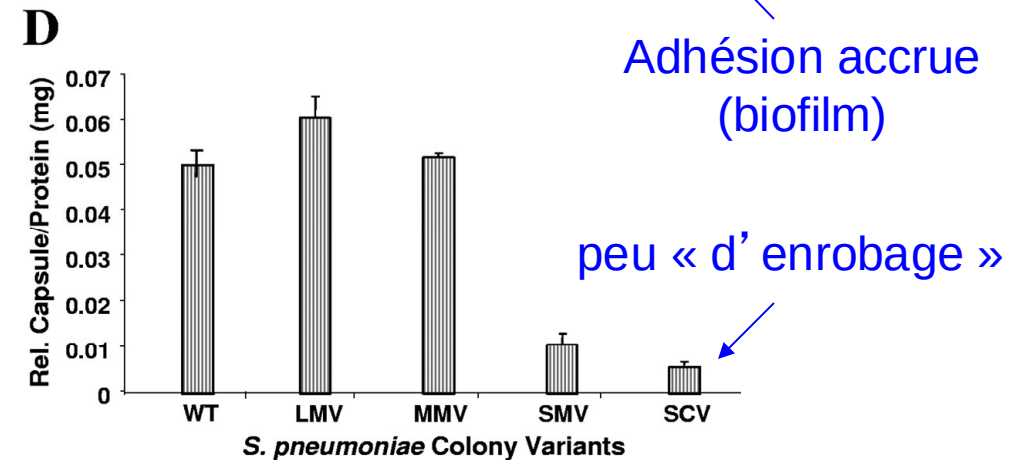
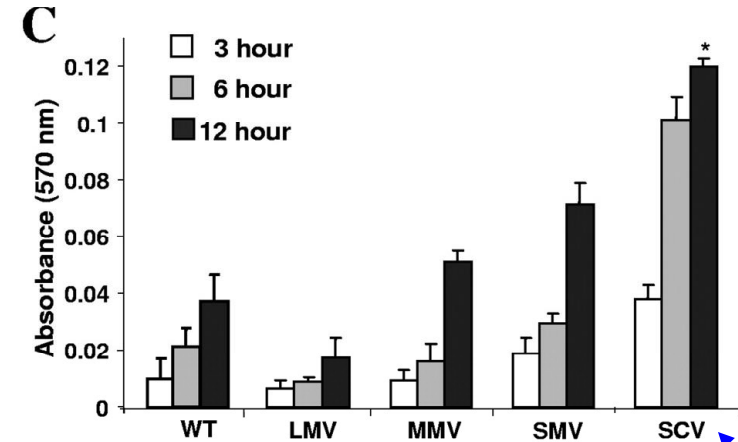
Caractéristiques des variants non mucoïdes

Cultures liquides



Tests MATHS

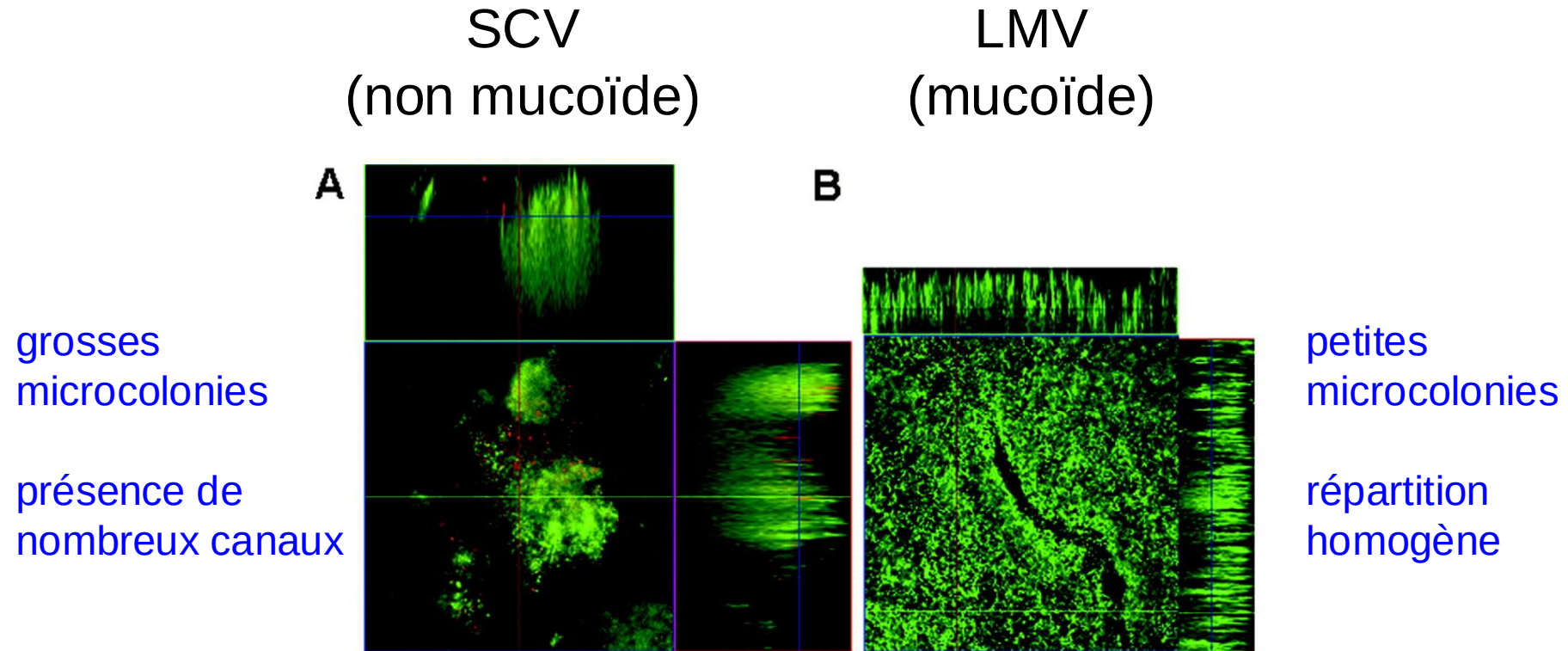
Tests d'adhésion en microplaque



Production de capsule



Architecture des biofilms formés



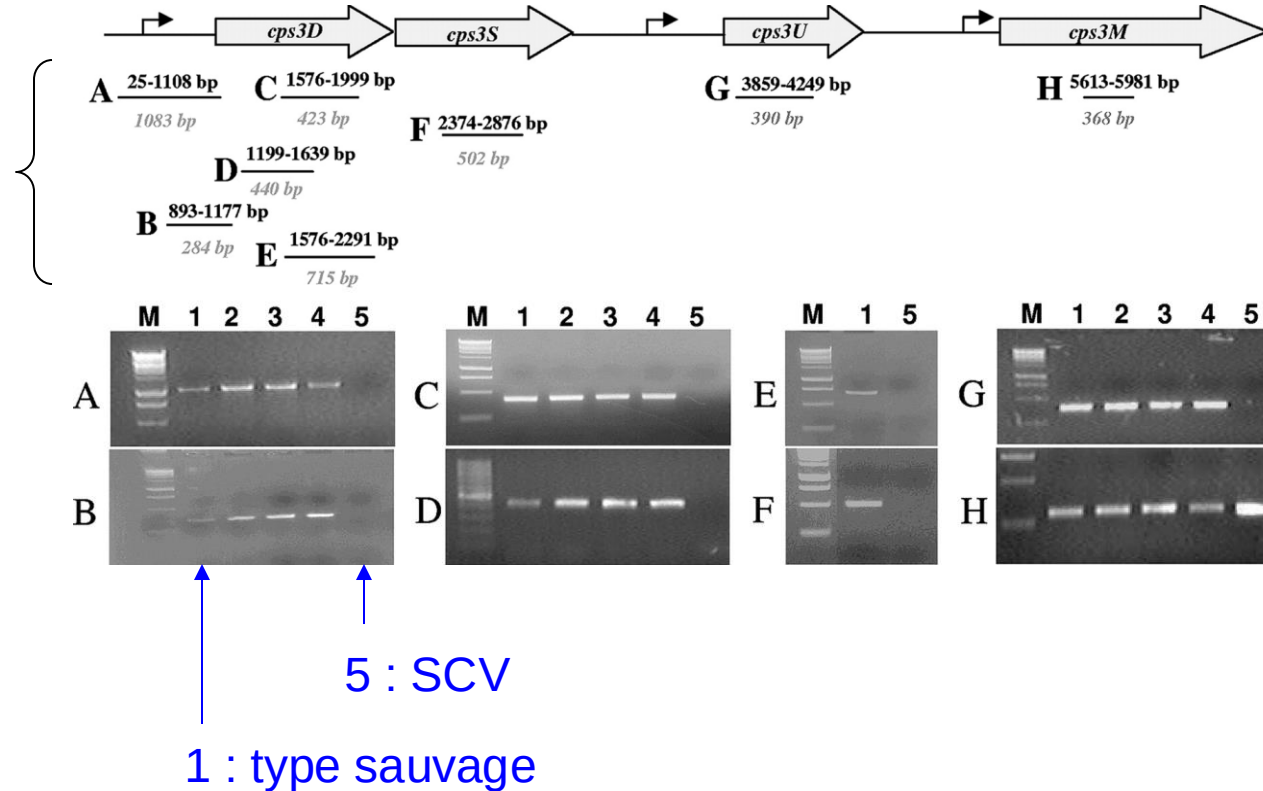
microscopie de fluorescence confocale après marquage Live/Dead BackLight



Le variant non-mucoide résulte d'une délétion dans le locus *cps*

cps : synthèse de la capsule polysaccharidique

Régions
détectées
par PCR



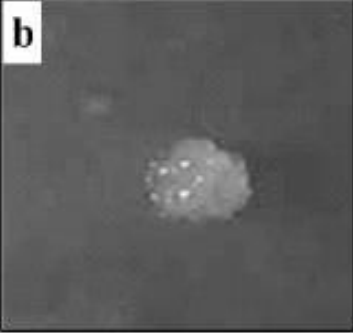
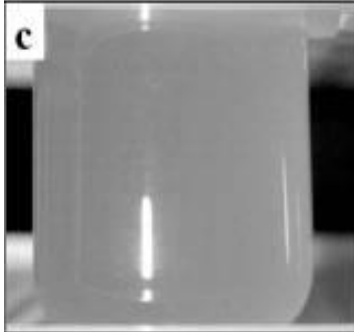
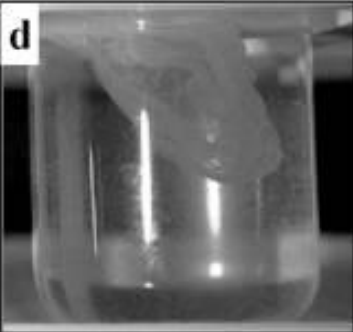
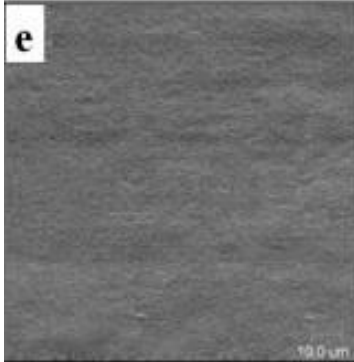
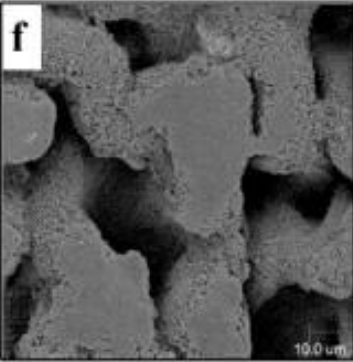


Variation génétique chez *S. pneumoniae*

- Apparition de variant phénotypique au cours de la formation de biofilm.
- Variation phénotypique liée à la synthèse de la capsule
- Variation phénotypique liée à une délétion de >7 kb
- Avantage sélectif du variant en biofilm



Variation génétique chez *P. aeruginosa*

	Type sauvage	Variant	
morphologie des colonies sur milieu solide.			colonies « fripées »
Aspect des cultures en bouillon			agrégation
Aspect des biofilms (flow cell en tube) (MEB)			Aspect « froissé »

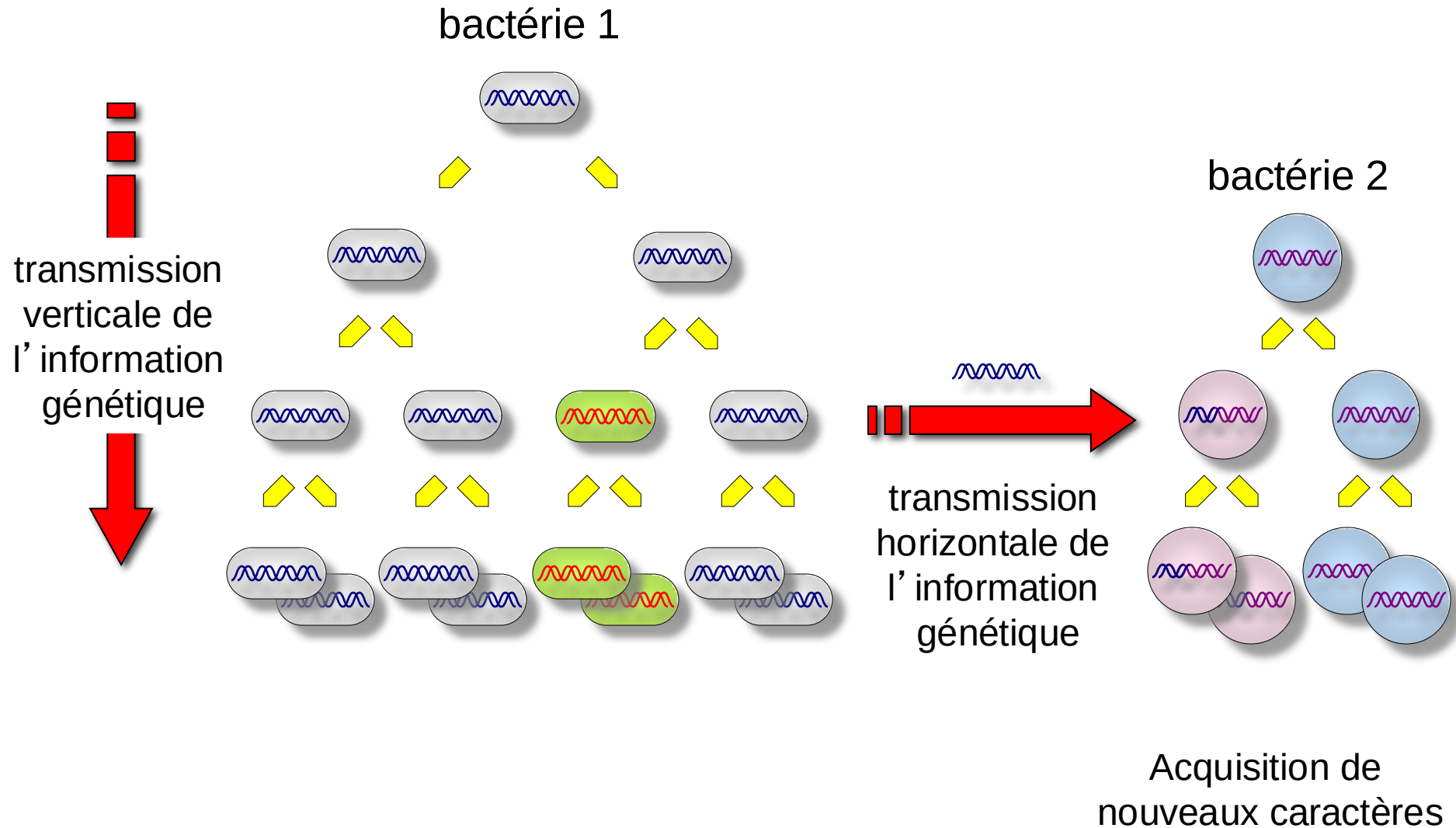


- (-) expression des gènes de la synthèse de la capsule
- (+) expression des gènes *pil* (formation des pili)
- (-) expression des gènes *fli* (formation du flagelle)
- (+) expression des gènes *psl* (« polysaccharide synthesis locus » - essentiels pour la formation de biofilms)
- (+) expression des gènes *pel* (formation de la matrice extracellulaire - pellicule à l'interface air/liquide)
- (+) expression des gènes du quorum sensing (« vie en communauté »)*
- (+) expression des gènes de dénitrification ($\text{NO}_3^- \gg \text{N}_2$, respiration anaérobie)*

Kirisits et coll. (2005) AppL Environ. Microbiol. 71:4809-4821.

Les échanges génétiques en biofilm

Le transfert de gènes horizontal



Avantage du mode biofilm

(majoritaire en conditions naturelles)

Mise en place d'un habitat favorable : ... gradients, gradients, gradients

- structure pluricellulaire / coopération entre microorganismes
- limitation des fluctuations environnementales / effet tampon
- séquestration des nutriments

Résistance aux agents antimicrobiens : (10 à 1000 × plus résistantes)

- effet barrière (de la matrice) à la diffusion
- physiologie différentes des bactéries...
- résistance à la phagocytose / prédateurs (effet de taille)

Echanges génétiques favorisé : (10 à 600 × plus de transfert)