

Projet de Recherche Doctoral Concours IPV 2021

Intitulé du Projet de Recherche Doctoral :

Assemblage de la matrice extracellulaire d'un biofilm multi-espèces en microspectrométrie Raman comprimée.

Directeur de Thèse porteur du projet (titulaire d'une HDR) :

NOM : **HENRY** Prénom : **Nelly** Prénom : **Nelly**
Titre : **Directrice de Recherche CNRS**
e-mail : nelly.henry@upmc.fr
Adresse Campus Jussieu - T 32_33 - P524
professionnelle : 4 place jussieu – 75252 Paris - France

Unité de Recherche :

Intitulé : Laboratoire Jean perrin
Code : UMR 8237

Equipe de Recherche (au sein de l'unité) :

Intitulé : **Biophysique des Micro-organismes**
Thématique de recherche : Approches quantitatives des bactéries de la cellule unique aux communautés
Responsable d'équipe :

NOM : **HENRY** Prénom : **Nelly**

Ecole Doctorale de rattachement de l'équipe & d'inscription du doctorant :

ED 388 – ChimiePhysique-Chimie Analytique Paris Centre

Doctorants actuellement encadrés par le directeur de thèse (préciser le nombre de doctorants, leur année de 1ere inscription et la quotité d'encadrement) :

1 doctorant inscrits en Octobre 2018

CO-DIRECTION (obligatoire)

Co-Directeur de Thèse (titulaire d'une HDR) :

NOM : **BARBOSA DE AGUIAR** Prénom : **Hilton**
Titre : **Chargé de Recherche CNRS** HDR
e-mail : h.aguiar@lkb.ens.fr

Unité de Recherche :

Intitulé : Laboratoire Kastler-Brossel (LKB)
Code: UMR 8552

Equipe de Recherche (au sein de l'unité) :

Intitulé : **Optique des milieux complexes**
Thématique de recherche :Optique instrumentale et computationnelle
Responsable d'équipe :

NOM : **GIGAN** Prénom : **Sylvain**

Ecole Doctorale de rattachement : ED-PIF
Ou si ED non SU :

Doctorants actuellement encadrés par le co-directeur de thèse (préciser le nombre de doctorants, leur année de 1ere inscription et la quotité d'encadrement) :

1 doctorant inscrits en Novembre 2018 (50%)

Cotutelle internationale : Non Oui, précisez Pays et Université :

Précisez ici les éventuels co-encadrants (non HDR)

Co-encadrant :

NOM :

Prénom :

Titre :

HDR

e-mail :

Unité de Recherche :

Intitulé :

Code :

Equipe de Recherche (au sein de l'unité) :

Intitulé :

Thématique de recherche :

Responsable d'équipe :

NOM :

Prénom :

Ecole Doctorale de rattachement :

Ou si ED non SU :

Résumé (2 000 caractères maximum) :

Les bactéries représentent l'essentiel de la biomasse planétaire. Leur principal mode de vie est celui de la communauté adhérente dite aussi biofilm. Dans cette structure, elles se développent dans une matrice extracellulaire polymère auto-produite qui les stabilise et les protège donnant naissance à un matériau vivant tri-dimensionnel aux propriétés émergentes.

Récemment, nous avons développé au Laboratoire Jean Perrin un suivi *in situ* et en temps réel de la formation d'un biofilm multi-espèces en microscopie optique et commencer à comprendre les principes de la croissance de ces systèmes composites. Nous avons défini plusieurs descripteurs quantitatifs sur la base de rapporteurs exprimés par les cellules. Nous voulons maintenant comprendre comment cette communauté assemble sa matrice extracellulaire dont on sait déjà qu'elle conditionne la structure et la dynamique interne du biofilm^{2,5}. C'est une question totalement nouvelle en contexte multi-espèces. Pour y répondre, il nous faut forger de nouveaux outils.

L'effet Raman offre une sélectivité chimique élevée avec une excellente résolution optique en imagerie sans marquage. On utilise le spectre vibratoire spécifique de chaque espèce moléculaire, ce qui permet d'en démêler les proportions. C'est une spectroscopie de lumière visible, offrant ainsi une résolution de l'ordre de quelques centaines de nanomètres qui devrait permettre une cartographie précise de la matrice extracellulaire du biofilm bactérien. C'est une approche non destructive, ce qui est indispensable si nous voulons comprendre l'assemblage.

Pour cela nous proposons l'association d'une équipe du laboratoire Jean Perrin récemment rattaché à l'Institut de Biologie Paris Seine (IBPS) spécialisée dans l'étude des mécanismes de formation des biofilms bactériens depuis plusieurs années et d'une équipe du Laboratoire Kastler Brossel spécialisée dans le développement de méthodes optiques avancées comme le Raman comprimé.

Joindre en annexe un descriptif du PRD avec références au format pdf (« NOM_2_IPV_2021 » / 3 pages maximum, taille police 11)

AVIS et VALIDATION de l'ECOLE DOCTORALE :

Le projet déposé est en adéquation avec les thématiques portées par l'école doctorale 388. La collaboration avec le laboratoire Kastler Brossel est tout à fait complémentaire et devrait permettre de mener à bien ce projet de thèse. Mme Henry dirige actuellement une thèse dont la soutenance est prévue en 2021. L'école doctorale donne ainsi un avis favorable pour cette demande de financement par le programme IPV



à envoyer simultanément par e-mail à l'ED de rattachement et au programme :
interfaces.pour.le.vivant@listes.upmc.fr avant le lundi 15 février minuit.

Assemblage de la matrice extracellulaire d'un biofilm multi-espèces en microspectrométrie Raman comprimée.

Contexte : Depuis quelques décades, les microbiologistes ont pris conscience que le principal mode de vie des bactéries dans la nature est celui du biofilm, cette architecture vivante que les bactéries forment lorsqu'elles adhèrent aux surfaces où elles se divisent tout en s'en enrobant dans une matrice extracellulaire polymère qu'elles sécrètent elles-mêmes. Dans ces organisations où l'environnement physique et physicochimique est totalement remodelé, les bactéries se développent sur un mode extrêmement dense où les communications inter-cellulaires sont intensifiées. Elles forment ainsi des communautés complexes où elles acquièrent des fonctions spécifiques qui leur confèrent une plus grande tolérance aux agressions diverses et une plus grande persistance dans des environnements hostiles (Watnick and Kolter 2000). La matrice extracellulaire joue un rôle clé dans l'établissement de ces systèmes aussi bien du point de vue structural que fonctionnel (Flemming et al. 2016).

Ces systèmes ont d'abord été étudiés sur la base de modèles expérimentaux mono-espèce mais de plus en plus, il apparaît que les interactions inter-espèces jouent un rôle clé dans le fonctionnement d'ensemble des communautés naturelles. De ce fait et en dépit de la complexité apportée par l'introduction de plusieurs espèces, un mouvement s'est initié pour mettre en place des modèles multi-espèces et commencer à déchiffrer les principales règles qui sous-tendent leur formation et leur survie. De premières recherches ont ainsi permis de mettre en évidence sur ces systèmes simplifiés des comportements observés sur des écosystèmes supérieurs complexes mettant en jeu des interactions sociales telles que coopération, compétition, mutualisme ou autres (Parijs and Steenackers 2018). Dans le contexte de l'anthropocène et des menaces grandissantes qui pèsent sur l'environnement planétaire, on cherche à mettre en évidence, sur ces systèmes simplifiés — aux échelles de taille et de temps permettant à la fois la parallélisation des tests et une contraction temporelle avantageuse — les principales lois reliant les changements des paramètres physiques et physico-chimiques aux comportements des populations et à l'évolution de leurs interactions (Oliveira et al. 2015). Alors que la plupart des études portent sur les bactéries elles-mêmes et leur physiologie dans les biofilms, on sait peu de choses sur la matrice extracellulaire. En particulier, comment les différentes espèces coopèrent ou non pour former le tissu de leur communauté est une question totalement ouverte (Karygianni et al. 2020). Elle est vitale à éclaircir pour mieux comprendre des systèmes bactériens adhérents.

Objectif de la thèse : Nous proposons ici de réaliser une analyse par spectroscopie Raman de la matrice extracellulaire assemblée dans un biofilm bactériens multi-espèces afin de dégager les principes de base de son assemblage en communauté composite.

Stratégie : Nous proposons ici une thèse co-encadrée par **Nelly Henry du Laboratoire Jean Perrin** pour toute la maîtrise du biofilm bactérien multi-espèces et par **Hilton Barbosa de Aguiar du Laboratoire Kastler-Brossel** pour la mise en œuvre de la micro-spectroscopie Raman.

Etudier le biofilm : Nous étudions au Laboratoire Jean Perrin (LJP) depuis plusieurs années, dans le groupe de Biophysique des micro-organismes (MOB), les mécanismes de développement des biofilms bactériens mono-espèces. Nous avons pu mettre en évidence l'importance des interactions et des propriétés physiques de ces systèmes sur leur fonctionnement (refs 1-4) . Récemment, nous avons mis en place au laboratoire un modèle expérimental de biofilm à 4 espèces (4S) se développant sous flux hydrodynamique dans un canal millifluidique millimétrique. En ayant parallélisé et automatisé ce dispositif, nous avons pu montrer que ces 4 espèces issues d'un biofilm naturel coexistent pour former une communauté à l'équilibre après 36 heures de façon déterministe. Nous avons pu établir les propriétés cinétiques du développement et commencé à comprendre les principales lois qui le régissent (thèse Amaury Monmeyran soutenue le 4 novembre 2019 et publication soumise). Pour cela, nous avons développé un suivi *in situ* et en temps réel de la formation de la communauté en microscopie optique et de fluorescence. Nous avons défini plusieurs descripteurs quantitatifs tels que la cinétique de croissance des différentes espèces marquées dans la communauté adhérente, l'hétérogénéité de la distribution spatio-temporelle, la dynamique locale sur la base de rapporteurs exprimés par les cellules. Nous voulons maintenant comprendre comment cette communauté assemble sa matrice extracellulaire dont on sait déjà qu'elle conditionne la structure et la dynamique interne du biofilm. C'est une question totalement nouvelle en contexte multi-espèces. Pour y répondre, il nous faut forger de nouveaux outils car nous devons identifier la signature individuelle de chaque espèce dans la production du matériau polymère constituant la matrice. Nous devons le faire de façon non destructive si nous voulons comprendre l'assemblage.

L'effet Raman offre une sélectivité chimique élevée avec une excellente résolution optique en imagerie sans marquage. On utilise le spectre vibratoire spécifique de chaque espèce moléculaire, ce qui permet d'en démêler les proportions. C'est une spectroscopie de lumière visible, offrant ainsi une résolution de l'ordre de quelques centaines de nanomètres qui devrait permettre une cartographie précise de la matrice extracellulaire du biofilm bactérien. Hilton Barbosa de Aguiar a récemment mis au point une nouvelle technique : l'imagerie par compression Raman inventée pour la quantification chimique à grande vitesse. En effet, en mode traditionnel, la microspectroscopie Raman est une technique lente peu adaptée aux échantillons vivants. L'idée de base du Raman comprimé est d'effectuer l'analyse chimique pendant la phase de mesure, en combinant un échantillonnage spectral non conventionnel avec des algorithmes de reconstruction efficaces. Une telle combinaison d'échantillonnage intelligent et de modélisation mathématique permet une détection plus sensible (refs 5,6) et la bio-imagerie Raman la plus rapide à ce jour (ref 7) . L'augmentation de sensibilité et de vitesse apportée par le cadre d'imagerie Raman comprimé permettra de quantifier les diverses espèces chimiques composant le biofilm et de séparer les informations de la matrice extracellulaire de celles des cellules elles-mêmes. Nous pourrions également utiliser des marquages isotopiques en réalisant la pré-croissance d'une des espèces sur un milieu approprié, ainsi la contribution de l'espèce visée apparaîtra très distinctement. L'analyse de biofilms à combinaison réduite (1,2 ou 3 espèces), telle que nous l'avons déjà pratiquée en microscopie optique, contribuera à déchiffrer l'assemblage complet.

Enjeux : L'enjeu numéro 1 est de réaliser la première analyse chimique *in situ* d'une communauté vivante en croissance. L'enjeu numéro 2 est d'utiliser ces données pour comprendre les mécanismes d'assemblage de la matrice extracellulaire, un organe clé du biofilm bactérien en contexte multi-espèces.

Interface Bio-Physique : Notre stratégie dans ce travail est de coupler les toutes dernières innovations de la physique instrumentale — le Raman comprimé — et la maîtrise d'un système vivant contrôlé mais suffisamment complexe pour fournir un modèle pertinent de communauté écologique — le biofilm bactérien multi-espèces.

Principales références des co-encadrants en relation avec le sujet :

1. P. Thomen, J. D. P. Valentin, A. F. Bitbol, N. Henry, Spatiotemporal pattern formation in E.coli biofilms explained by a simple physical energy balance. *Soft Matter* 16, 494-504 (2020)
2. Monmeyran et al., The inducible chemical-genetic fluorescent marker FAST outperforms classical fluorescent proteins in the quantitative reporting of bacterial biofilm dynamics. *Sci Rep* 8, 10336 (2018)
3. P. Thomen et al., Bacterial biofilm under flow: First a physical struggle to stay, then a matter of breathing. *PLoS ONE* 12, e0175197 (2017)
4. O. Galy et al., Mapping of bacterial biofilm local mechanics by magnetic microparticle actuation. *Biophysical journal* 5, 1400-1408 (2012).
5. S. H. Donaldson Jr., H. B. de Aguiar. Molecular Imaging of Cholesterol and Lipid Distributions in Model Membranes. *J. Phys. Chem. Lett.* 9 1528 (2018)
6. B. Sturm, F. Soldevila, E. Tajahuerce, S. Gigan, H. Rigneault, H. B. de Aguiar. High-sensitivity high-speed compressive spectrometer for Raman imaging. *ACS Photonics* 6, 1409–1415 (2019)
7. F. Soldevila, J. Dong, E. Tajahuerce, S. Gigan, H. B. de Aguiar. Fast compressive Raman bio-imaging via matrix completion. *Optica* 6, 341–346 (2019)

Autre bibliographie :

- Flemming, H. C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice, and S. Kjelleberg. 2016. 'Biofilms: an emergent form of bacterial life', *Nat Rev Microbiol*, 14: 563-75.
- Karygianni, L., Z. Ren, H. Koo, and T. Thurnheer. 2020. 'Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities', *Trends Microbiol*, 28: 668-81.
- Oliveira, N. M., E. Martinez-Garcia, J. Xavier, W. M. Durham, R. Kolter, W. Kim, and K. R. Foster. 2015. 'Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition', *PLoS Biol*, 13: e1002191.
- Parijs, I., and H. P. Steenackers. 2018. 'Competitive inter-species interactions underlie the increased antimicrobial tolerance in multispecies brewery biofilms', *ISME J*, 12: 2061-75.
- Watnick, P., and R. Kolter. 2000. 'Biofilm, city of microbes', *J Bacteriol*, 182: 2675-9.