

Université du Québec
Centre de microbiologie et biotechnologie
INRS-Institut Armand-Frappier

**Implication des rhamnolipides produits par la souche
Pseudomonas aeruginosa 57RP durant l'évolution d'un biofilm**

Par
Anna-Maria Donetti

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Examineur externe	Jean Barbeau Faculté de médecine dentaire Université de Montréal
Examineur interne	Claude Dupont, Centre de microbiologie et biotechnologie INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Richard Villemur, Centre de microbiologie et biotechnologie INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Plusieurs études ont porté sur les étapes d'initiation et de maturation de biofilms. Cependant, peu d'entre elles ont porté sur les mécanismes impliqués dans la dispersion des biofilms matures. Un biofilm est un microcosme composé de micro-colonies attachées à une surface et entourées d'une matrice de polymères. Nous avons étudié une souche de *Pseudomonas aeruginosa* capable de dégrader des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des *n*-alcanes. Cette souche, appelée souche 57RP était aussi capable de produire des biosurfactants de type rhamnolipides et de former un biofilm. Le rôle des rhamnolipides est encore mal connu. Une des hypothèses émises est que la souche 57RP produit des biosurfactants à la maturation du biofilm pour favoriser le détachement et la dispersion des cellules. Par conséquent, l'objectif poursuivi dans ce projet était de voir l'effet des rhamnolipides sur la dispersion des cellules du biofilm.

Méthodologie : Pour vérifier cette hypothèse, nous avons introduit le gène codant pour la protéine fluorescente verte, dénommé la GFP, dans la souche 57RP. La souche 57RP ayant acquis la GFP était devenue la souche PM18. De plus, nous avons étudié une souche 57RP mutante (57RP-98) dans laquelle la synthèse des rhamnolipides a été inactivée. La 57RP-98 a été mutée au niveau du gène *rhlA*. Ces deux souches ont été cultivées séparément, puis ensemble dans des cultures en cuvées et dans des chambres à flux continu pour la formation de biofilms. Les biofilms ont été visualisés au microscope confocal à balayage au laser. Pour visualiser les cellules de la souche 57RP-98, une hybridation *in situ* avec une sonde universelle aux eubactéries (Eub338) a été faite.

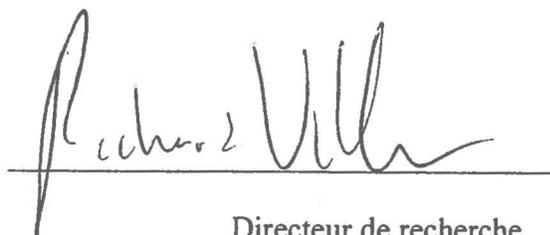
Résultats : L'examen au microscope confocal a révélé que l'architecture du biofilm de la souche 57RP-98 et de celui de la souche PM18 était presque identique. Cependant, les biofilms de PM18 étaient plus minces que ceux de 57RP-98. Ces résultats suggéraient que les rhamnolipides étaient impliqués dans la dispersion des cellules. Pour appuyer ces observations, une solution de rhamnolipides de 0,1% a été ajoutée aux biofilms de PM18 et de 57RP-98. Les résultats ont montré que les rhamnolipides favorisaient la dispersion des cellules de 57RP-98 et peu celles de PM18. En outre,

l'examen des biofilms composés des deux souches a montré que les cellules de PM18 étaient dominantes à la surface du biofilm tandis que les cellules de 57RP-98 l'étaient près de la surface d'attachement. Ces observations suggéraient que les rhamnolipides étaient aussi impliqués dans le phénomène de fourmillement (swarming). Des résultats obtenus dans le laboratoire de Richard Villemur impliqueraient le gène *rhlA* directement dans le mouvement de fourmillement chez la 57RP.

Conclusion : La GFP constitue un outil intéressant pour l'étude des biofilms en temps réel. Les rhamnolipides semblent n'avoir aucun impact sur l'architecture du biofilm. Cependant, ils pourraient être impliqués dans la dispersion des cellules. Les résultats ont montré aussi que l'un des gènes responsable de la synthèse des rhamnolipides, le gène *rhlA* pourrait être particulièrement responsable du phénomène de fourmillement. Le fourmillement est probablement une façon de permettre aux bactéries de se déplacer dans un biofilm pour se disperser.



Étudiant



Directeur de recherche

Remerciements

Mes remerciements vont à mon directeur de maîtrise, Dr. Richard Villemur pour sa généreuse disponibilité, sa confiance et son appui constant.

Je désire aussi remercier toute l'équipe du département de microbiologie appliquée, surtout le groupe du laboratoire de Richard Villemur pour l'agréable atmosphère de travail. Un merci particulier à Éric Déziel pour sa collaboration et ses conseils durant nos nombreuses discussions.

Je remercie également Francine Turcotte pour ses connaissances techniques et Marcel Desrosiers pour ses connaissances en microscopie confocale et sa disponibilité pour les analyses des biofilms.

Un merci particulier à mon "habibi" Denis pour m'avoir soutenu en tout temps, pour ses précieux conseils, sa patience et ses encouragements.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	v
Table des matières	vii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations	xiv
Introduction	1
Revue de littérature	5
1. Les biofilms	6
1.1 <i>Structure des biofilms</i>	7
1.2 <i>Le cycle de vie des biofilms</i>	8
2. Souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
3. Les biosurfactants	17
3.1 <i>Rhamnolipides de P. aeruginosa</i>	18
4. Techniques de fluorescence permettant l'examen des biofilms	22
4.1 <i>Fluorescence et fluorochromes</i>	22
4.2 <i>Hybridation in situ avec des sondes fluorescentes</i>	23
4.3 <i>Immunofluorescence</i>	25
4.4 <i>Les gènes marqueurs et/ou rapporteurs</i>	25
4.5 <i>La protéine fluorescente verte</i>	26
5. Chambre à flux continu.....	33
6. Microscopes utilisés pour l'étude des biofilms.....	33
6.1 <i>Microscope à épifluorescence</i>	33
6.2 <i>Microscope confocal à balayage au laser</i>	34

Approche expérimentale	37
1. Souches étudiées	38
2. Vecteurs et souches employés	38
3. Extraction de l'ADN plasmidique	39
4. Digestion de l'ADN par les enzymes de restrictions	40
5. Électrophorèse sur gel d'agarose	41
6. Transformation bactérienne	41
7. Mini-préparation d'ADN plasmidique avec lyse alcaline	42
8. Congélation des souches	43
9. Conjugaison entre <i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i>	43
10. Visualisation des transconjugants en microscopie à épifluorescence.....	44
11. Méthodes directes pour mesurer la production de biosurfactants.....	44
11.1 Gélouses bleues Siegmund-Wagner (SW).....	45
12. Détection de la dégradation du phénanthrène et du naphthalène.....	45
13. Traçage de la courbe de croissance des transconjugants ayant acquis le gène <i>gfp</i> et celle de la souche 57RP	46
14. Quantification de la biomasse de la souche PM18 et celle de la souche 57RP-98 .	46
15. Effet de l'ajout d'une solution de rhamnolipides de 0,1 % sur le dispersement des cellules	47
16. Culture en cuvée de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98	48
17. Développement de biofilms dans des chambres à flux continu.....	49
17.1 Établissement du système.....	49
17.2 Fixation et enrobage du biofilm.....	50
17.3 Hybridation <i>in situ</i> avec la sonde <i>Cy3-Eub338</i>	52
18. Microscope confocal à balayage au laser.....	53
Résultats.....	55
1. Introduction du gène codant pour la protéine fluorescente verte dans la souche <i>P. aeruginosa</i> 57RP.....	56
2. Vérification de la production de biosurfactants et de la dégradation de substrats hydrophobes par les transconjugants ayant acquis le gène <i>gfp</i>	59

3. Comparaison de la densité cellulaire entre la souche PM18 et la souche 57RP-98 dans les milieux BDT et Swarm	64
4. Effet de l'ajout de rhamnolipides sur le dispersement de la biomasse formée par la souche PM18 et celle formée par la souche 57RP-98.....	66
5. Culture en cuvée de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98 en milieu BDT et Swarm pendant 288 heures	67
6. Développement de biofilms avec les souches <i>P. aeruginosa</i> PM18 et 57RP-98 dans un système à flux continu	81
6.1 Développement de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98 dans des chambres à flux continu pendant 96 heures en milieu BDT.....	81
6.2 Développement de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98 dans des chambres à flux continu pendant 192 heures en milieu BDT.....	84
6.3 Développement de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98 pendant 192 h en milieu Swarm	89
6.4 Comparaison de la densité cellulaire entre PM18 et 57RP-98 à l'intérieur du biofilm cultivé en milieu BDT ou Swarm.....	93
6.5 Test d'étalement d'une goutte.....	93
Discussion	96
1. Introduction du gène codant pour la protéine fluorescente verte, la GFP, dans le chromosome de <i>P. aeruginosa</i> et sélection des transconjugants	97
2. Suivi de la formation et de la dispersion des biomasses des souches PM18 et 57RP-98 en milieu BDT et Swarm	98
3. Effet des rhamnolipides sur la dispersion des cellules.....	99
4. Comparaison des biofilms formés par la souche PM18 à ceux formés par la souche 57RP-98 en milieu BDT et Swarm	100
5. Comparaison des biofilms formés par les souches PM18 et 57RP-98 ensemble en milieu BDT et Swarm	104
6. Effet des conditions d'hybridation et de préparation des biofilms sur la détection de la fluorescence et la résolution des images	106
Conclusion	109

Liste des figures

Figure 1 : Architecture d'un biofilm.....	6
Figure 2 : Étapes de formation d'un biofilm.....	9
Figure 3 : Les facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	15
Figure 4 : Le système de senseur de quorum de <i>P. aeruginosa</i>	17
Figure 5 : Les principales sortes de rhamnolipides chez <i>P. aeruginosa</i>	20
Figure 6 : Les gènes <i>rhlABRI</i>	20
Figure 7 : Mécanisme de formation du chromophore de la GFP	28
Figure 8 : Microscope à épifluorescence.....	34
Figure 9 : Principe de fonctionnement du microscope confocal à balayage au laser	36
Figure 10 : Culture en cuvée	49
Figure 11 : Système à flux continu (A) et chambre à flux continu (B).....	51
Figure 12 : Schéma illustrant le balayage optique d'un biofilm.....	54
Figure 13 : Cassette de GFP constituée des éléments du transposon mini-Tn5, le promoteur pLac et le gène codant pour la GFP stable.....	57
Figure 14 : Vecteur pUT mini-Tn5.	58
Figure 15 : A) Conjugaison du vecteur pUT-mini Tn5/GFP de la souche <i>E. coli</i> S17-1 λ -pir à <i>P. aeruginosa</i> 57RP et B) Expression de la GFP chez les transconjugants de <i>P. aeruginosa</i>	60
Figure 16 : Courbe de croissance des neuf transconjugants ayant acquis le gène <i>gfp</i> et de la souche 57RP.....	63
Figure 17 : Quantification de la biomasse formée par les souches PM18 et 57RP-98 en fonction du temps.....	65
Figure 18 : Quantification de la biomasse formée par les souches PM18 et 57RP-98 en fonction du temps.....	65
Figure 19 : Effet de l'ajout d'une solution de rhamnolipides de 0,1% sur la biomasse formée par les souches <i>P. aeruginosa</i> PM18 et 57RP-98 en milieu BDT.....	67
Figure 20 : Schéma d'un biofilm	70
Figure 21 : Superposition des images du biofilm balayé dans le vert et dans le rouge...	71

Figure 22 : Coupes horizontales (XY) des biofilms de la souche PM18 en milieu Swarm (I) et en milieu BDT (II)	72
Figure 23 : Coupe sagittal (XZ) du biofilm de PM18 en A) milieu Swarm et B) en milieu BDT.	74
Figure 24 : Coupes horizontales (XY) des biofilms de 57RP-98 en milieu Swarm (I) et en milieu BDT (II)	75
Figure 25 : Sectionnement sagittal (XZ) du biofilm de 57RP-98 en A) milieu Swarm et B) en milieu BDT.....	77
Figure 26 : Coupes horizontales (XY) des biofilms composés des souches PM18 et 57RP-98 en milieu Swarm (I) et en milieu BDT (II).....	78
Figure 27 : Sectionnement sagittal (XZ) du biofilm de 57RP-98 et de PM18 ensemble en A) milieu Swarm et B) en milieu BDT.....	80
Figure 28 : Biofilm formé par les souches PM18 et 57RP-98 en milieu BDT.....	83
Figure 29 : Biofilm formé par de la souche 57RP-98 en milieu BDT.	86
Figure 30 : Biofilm formé par la souche PM18 en milieu BDT.....	87
Figure 31 : Biofilm formé par les souches PM18 et 57RP-98 en milieu BDT.....	88
Figure 32 : Biofilm formé par la souche 57RP-98 en milieu Swarm.	90
Figure 33 : Biofilm formé par la souche PM18 en milieu Swarm..	91
Figure 34 : Biofilm formé par les souches PM18 et 57RP-98 en milieu Swarm..	92

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques de quelques fluorochromes les plus utilisés dans la technique FISH et en écologie microbienne	23
Tableau 2 : Variantes de GFP instables et leurs demi-vies dans <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas putida</i>	30
Tableau 3 : Caractérisation des transconjugants ayant acquis le gène <i>gfp</i>	62
Tableau 4 : Dénombrement des cellules de PM18 et de 57RP-98 dans des biofilms cultivés en milieu BDT ou Swarm.....	94
Tableau 5 : Détection de la présence des rhamnolipides dans le surnageant de cultures via le test d'étalement d'une goutte	95

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
BDT :	Bushnell-Haas, dextrose, tryptone
CaCl ₂ :	Chlorure de calcium
CTAB :	Bromure d'hexadecyltriméthylammonium
D.O. :	Densité optique
EDTA :	Acide éthylènediaminetétraacétique
EtOH :	Éthanol
g :	Gramme
g :	Force gravitationnelle
h :	Heure (s)
H ₂ O :	Eau
INRS-IAF :	Institut national de la recherche scientifique-Institut Armand Frappier
KCl :	Chlorure de potassium
l :	Litre
LB :	Bouillon Luria Burtani
λ :	Longueur d'onde
M :	Molaire
mM :	Millimolaire
μm :	Micromètre
ml :	Millilitre
mm :	Millimètre
MgCl ₂ :	Chlorure de magnésium
ng :	Nanogramme
NaOH :	Hydroxyde de sodium
rpm :	Rotation par minute
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
SW :	Siegmund-Wagner
TE :	Tris-EDTA

Introduction

Depuis l'époque de Pasteur, les microbiologistes ont toujours conduit leurs études avec des cultures de bactéries en suspension. Cependant, la majorité des bactéries dans leur milieu naturel vivent en communautés sous forme de biofilms. On rencontre les biofilms dans les habitats naturels, industriels et médicaux. Les biofilms se forment lorsque les bactéries adhèrent à une surface dans un environnement aqueux. Lorsque les bactéries s'attachent à une surface, elles subissent des changements au niveau phénotypique et au niveau d'expression des gènes. Le changement le plus apparent est la sécrétion d'une substance visqueuse constituée de polymères d'exopolysaccharides qui leur sert de matrice et leur permet de s'ancrer à des matériaux comme les métaux, les plastiques et les particules de sols. Ces changements font en sorte que le comportement des bactéries en biofilms est très différent de celui des bactéries en suspension.

Les biofilms causent des dommages considérables aux industries et dans le milieu médical. Le coût estimé pour les éliminer s'élève à plusieurs millions de dollars annuellement. Jusqu'à présent, les méthodes conventionnelles (ex : désinfectants, antibiotiques) se sont avérées peu efficaces contre les biofilms. Les doses requises pour se débarrasser des biofilms sont si grandes qu'elles sont inacceptables du point de vue environnemental et impraticables médicalement. Ainsi, une meilleure compréhension des modes d'attachement, de maturation et de détachement des bactéries permettra de développer de nouvelles stratégies de luttés contre les biofilms. Également, les biofilms pourront être utilisés pour restaurer des sites contaminés, filtrer les effluents industriels et former des barrières biologiques.

Durant ces dernières années, plusieurs travaux ont porté sur les étapes d'initiation et de maturation des biofilms. Cependant, peu d'entre eux ont porté sur les mécanismes impliqués dans la dispersion des biofilms matures. Le mécanisme de dispersion de biofilm se définit comme étant le détachement de fragments de biomasses du biofilm, attachée à un substratum et leur transport dans le compartiment fluide dans lequel le biofilm baigne. Cinq mécanismes sont impliqués dans le détachement du biofilm :

l'abrasion, l'érosion, l'intervention humaine, la prédation et le dépouillement. La dispersion du biofilm représente pour les cellules une stratégie importante afin d'assurer leur survie et leur prédominance dans un écosystème aquatique.

Dans notre laboratoire, nous possédons deux souches de *Pseudomonas aeruginosa*, la 57RP et la 57RP-98. La souche 57RP a été isolée d'un sol contaminé aux hydrocarbures pétroliers (Déziel et *al.*, 1996 b). Cette souche produit de biosurfactants de type rhamnolipides, dégrade des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des *n*-alcanes et forme un biofilm. La souche 57RP-98 issue de 57RP possède les mêmes propriétés. Cependant, elle est incapable de synthétiser des rhamnolipides. Dans une étude portant sur la dégradation de l'hexadécane, il a été observé que la biomasse formée par 57RP sur la surface des gouttelettes d'hexadécane se dispersait après dégradation du substrat. À l'inverse, la biomasse formée par 57RP-98 est restée adhérente à la surface des gouttelettes d'hexadécane (Déziel et *al.*, 1999). De plus, d'autres travaux ont démontré que le phénotype des bactéries croissant sur l'hexadécane est similaire à celui des bactéries des biofilms (Déziel et *al.*, 1999). Ainsi, la biomasse qui s'est formée sur la surface des gouttelettes d'hexadécane serait un biofilm. Comme la seule différence entre la 57RP et la 57RP-98 est la synthèse des rhamnolipides, nous avons émis l'hypothèse que les rhamnolipides seraient impliqués dans la dispersion des cellules de *P. aeruginosa* du biofilm.

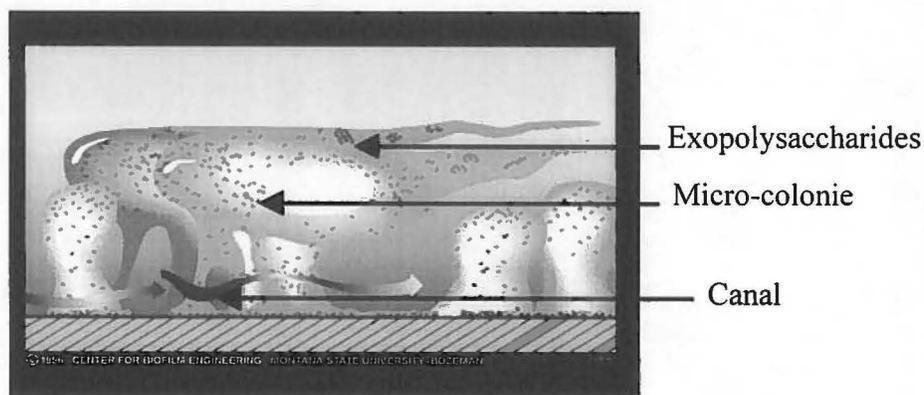
Les objectifs de ce projet ont été de développer une méthode sensible permettant le suivi de *P. aeruginosa* en temps réel et comprendre l'implication des rhamnolipides dans la dispersion des biofilms. Ainsi, le gène codant pour la protéine fluorescente verte, la GFP, a été utilisé comme gène rapporteur de la souche 57RP. La GFP ne requiert aucun substrat pour s'exprimer. De plus, elle n'altère pas les fonctions métaboliques de la bactérie et elle est facile à détecter. En conséquence, cet outil moléculaire nous a permis de mieux visualiser l'impact de certains facteurs sur la formation ou la dispersion des biofilms. Le projet a été divisé en six étapes :

- 1) Introduire le gène *gfp* dans les souches 57RP et 57RP-98 ;
- 2) Culture en cuvée de biofilms avec les souches 57RP et 57RP-98 ;
- 3) Cultiver des biofilms dans un système à flux continu avec les souches 57RP et 57RP-98;
- 4) Examiner les biofilms à l'aide du microscope confocal à balayage au laser ;
- 5) Étudier la structure des biofilms des souches 57RP et 57RP-98
- 6) Observer la distribution des cellules de 57RP et celles de 57RP-98 dans le biofilm lorsque cultivées ensemble.

Revue de littérature

1. Les biofilms

La majorité des micro-organismes ne vivent pas sous formes planctoniques mais plutôt en communautés complexes, attachées à une surface appelées biofilm. Un biofilm est un microcosme composé de micro-colonies attachées à une surface et entre elles et enveloppées dans une matrice d'exopolysaccharides (EPS). À travers ces micro-colonies, des canaux sont présents pour acheminer la nourriture et l'oxygène à toutes les cellules et débarrassant de plus celles-ci de leurs déchets (Costerton *et al.*, 1995; Costerton *et al.*, 1994) (Figure 1). Les bactéries des biofilms sont en général morphologiquement et métaboliquement différentes des bactéries planctoniques. Toute bactérie peut également former un biofilm lorsqu'elle a trouvé une place pour adhérer (Potera, 1996) en l'occurrence de *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *Escherichia coli*.



Adaptée du CBE (Center for biofilm Engineering, Montana, É. U.)

Figure 1 : Architecture d'un biofilm.

1.1 Structure des biofilms

Un biofilm est un système multicellulaire très organisé. La structure et l'architecture d'un biofilm peuvent influencer les processus métaboliques, la réponse aux nutriments, la résistance aux agents antimicrobiens, la prédation et autres (Lawrence et *al.*, 1991). Les biofilms microbiens ont une structure hétérogène (Costerton et *al.*, 1995). Des études ont montré que la distribution des cellules et des agrégats de cellules ainsi que leurs polymères extracellulaires et les canaux est variable à l'intérieur d'un biofilm (Wolfaardt et *al.*, 1994; Stewart et *al.*, 1993; Caldwell et *al.*, 1992; Lawrence et *al.*, 1991).

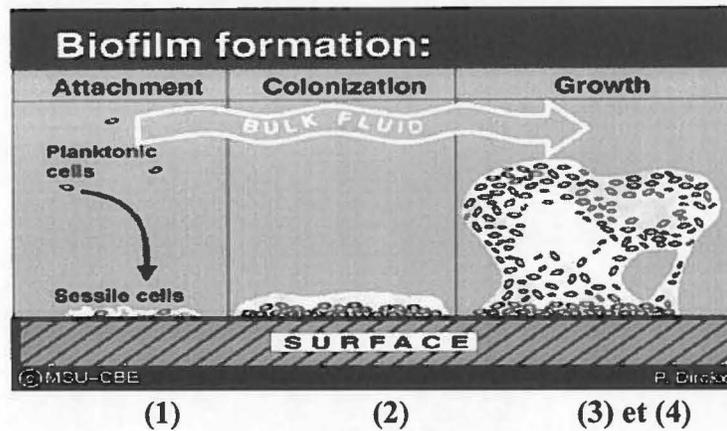
La structure du biofilm varie selon les espèces, le substrat sur lequel les bactéries croissent et la nature de la source de carbone (Costerton et *al.*, 1995). Lawrence et *al.* (1991) ont comparé la structure de trois biofilms formé par *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* et *Vibrio parahaemolyticus*. Après 24 h d'incubation, la distribution des bactéries à l'intérieur du biofilm était hétérogène sur le plan horizontal et vertical. De plus, la zone de la plus haute densité cellulaire variait selon l'espèce. Chez *P. aeruginosa*, la plus grande densité cellulaire était localisée près de la base (27 % de la biomasse) alors que celle de *V. parahaemolyticus* était localisée près de l'interface liquide-biofilm. Stewart et *al.* (1993) ont analysé à l'aide du microscope optique la variabilité de la profondeur d'un biofilm formé par *P. aeruginosa*. La profondeur moyenne du biofilm était de 33 μm avec une variation allant de 13,3 à 60 μm .

Wolfaardt et *al.* (1994) ont analysé à l'aide de la microscopie confocale la structure du biofilm d'un consortium bactérien dégradant le méthylchlorofop (herbicide). Lorsque la seule source de carbone était le méthylchlorofop, l'épaisseur du biofilm a augmenté et la relation spatiale entre les différentes espèces était bien définie après 14-21 jours de développement. Il y a eu formation de groupes de cocci en forme de grappe et présence d'un consortium de bactéries côniques. Lorsque le même consortium a été alimenté avec

une source de carbone plus labile, le biofilm formé était plus homogène, moins épais et la présence d'une association entre les différentes espèces était moins évidente. Dans les travaux de Trulear (1980), il a été démontré que lorsque la souche *P. aeruginosa* était cultivée seule, l'épaisseur du biofilm a atteint 30 - 40 μm alors que lorsqu'elle était cultivée avec une souche anaérobie, l'épaisseur du biofilm a atteint environ 130 μm . Cette observation a montré clairement que l'oxygène est un facteur important dans la croissance verticale du biofilm de *P. aeruginosa*.

1.2 Le cycle de vie des biofilms

Il y a quatre étapes menant à la formation d'un biofilm. La première étape consiste à permettre l'adhésion des cellules à une surface (1). Une fois que les cellules se sont attachées à une surface, elles commencent à croître et à se multiplier. Puis, les cellules commencent à se déplacer le long de la surface formant dans un premier temps une monocouche. Ensuite, les cellules forment des agrégats appelés micro-colonies (2). Ces micro-colonies se différencient pour former la structure tridimensionnelle d'un biofilm avec sa matrice d'exopolysaccharides (EPS) (3). L'étape finale dans le cycle de vie du biofilm est le détachement de cellules de la matrice pour coloniser de nouvelles surfaces (4) (Watnick et Kolter, 2000) (Figure 2).



Adaptée du CBE (Center for biofilm Engineering, Montana, É. U.)

Figure 2 : Étapes de formation d'un biofilm. À l'étape (1), les cellules adhèrent à la surface. Ensuite, les cellules forment des micro-colonies (étape 2). Plus tard, ces micro-colonies se différencient en un biofilm (étape 3). L'étape finale dans le cycle de vie du biofilm est le détachement de fragments de biomasses du biofilm pour aller coloniser d'autres surfaces (étape 4).

1.2.1 Attachement initial des cellules

La première étape dans le développement du biofilm est l'attachement des cellules à une surface. Les cellules planctoniques s'y attachent lorsque le milieu est favorable. Différents mécanismes peuvent être utilisés par les bactéries pour s'attacher à une surface. Ben-Ari (1999) a mentionné les travaux de Kolter et ses collègues où ces derniers ont montré que, chez *Vibrio cholerae*, différentes molécules spécifiques peuvent être utilisées selon que la surface est inerte ou vivante. O'Toole et Kolter (1998) ont aussi décrit deux classes de souches mutantes de *P. aeruginosa*, appelés *sad* pour « surface attachement defective ». Les souches mutantes de la première classe, mutées au niveau des flagelles et de la motilité, étaient incapables d'adhérer au plastique. Dans la deuxième classe, les souches mutées au niveau des pili de type IV ont formé une

monocouche de cellules sur la surface, mais contrairement à la souche d'origine, elles étaient incapables de former des microcolonies. Les pili de type IV sont responsables de la motilité de type « twitching » qu'on retrouve parmi les bactéries Gram négatives. Pour *P. fluorescens* et *P. aeruginosa*, la motilité flagellaire est nécessaire pour établir un contact cellule-surface alors que la motilité de type « twitching » permet l'initiation de la formation du biofilm (O'Toole et Kolter, 1998; Pratt et Kolter, 1999). Par contre, ces deux types de motilité ne sont pas absolument requis pour initier la formation d'un biofilm. Dans certaines conditions, les bactéries, pour pallier au manque d'un ou des deux types(s) de motilité, utilisent d'autres mécanismes (Pratt et Kolter, 1999). Par conséquent, la motilité de type flagellaire et/ou pilaire fournit aux micro-organismes Gram négatifs des mécanismes leur permettant de s'attacher à des surfaces et de se déplacer le long de ces surfaces pour développer ainsi, la structure initiale du biofilm.

1.2.2 Formation de micro-colonies

Suite à l'adhésion à une surface, les cellules subissent des changements au niveau phénotypiques. Ces changements phénotypiques sont exprimés à partir des gènes sous le contrôle du facteur transcriptionnel σ . Ce facteur induit des changements de l'expression des protéines au niveau de la paroi cellulaire, de la membrane cellulaire et du cytoplasme (Deretic et al., 1990; Deretic et al., 1994; Martin et al., 1994). Le premier changement ayant lieu est la production d'adhésines par des protéines membranaires permettant aux bactéries de bien s'attacher à la surface et de former un biofilm (Pratt et Kolter, 1999). Le pilus type I permet à *Escherichia coli* de former un biofilm lorsque celle-ci est cultivée dans un milieu riche sur des surfaces comme le polyvinyl chloride (PVC), le polycarbonate, le polystyrène et le borosilicate (Pratt et Kolter, 1998). D'autres études effectuées sur *V. cholerae* El Tor par Watnick et al. (1999) ont montré que c'est le pilus hémagglutinine de type IV qui sert à la formation du biofilm lorsque la souche a été cultivée sur du borosilicate dans un milieu riche. L'autre changement se produisant est l'activation de la transcription de gènes spécifiques pour synthétiser des

exopolysaccharides (EPS). À l'aide des gènes rapporteurs avec un promoteur exprimant soit le gène *algC*, *algD* ou *algU* chez *P. aeruginosa*, il a été démontré que *algC* et *algD* sont exprimés suite à l'étape de l'adhésion et qu'ils sont responsables de la synthèse d'EPS (Davies et al., 1993; Hoyle et al., 1993). Dans le cas de *P. aeruginosa*, l'exopolysaccharide sécrété est l'alginate. Des études parallèles avec les bactéries Gram positives ont montré que plusieurs enzymes produisant des EPS sont activées suite à l'adhésion (Costerton et al., 1995). Les protéines adhésines, synthétisées à la surface de la cellule, et les EPS jouent un rôle important dans l'établissement d'interactions constructives entre les cellules et les surfaces (Pratt et Kolter, 1999; Costerton et al., 1995).

1.2.3 Maturation des bactéries attachées et formation d'un biofilm défini

Suite à l'étape de formation de micro-colonies, celles-ci se différencient pour former des structures tridimensionnelles bien définies. Nous observons des micro-colonies en forme de « champignons » entourées d'une matrice d'exopolysaccharides au travers desquelles circulent des canaux. Le développement d'un biofilm mature est déclenché par des molécules signalitiques spécifiques appelées signaux de senseur de quorum (SQ) (quorum-sensing). Lorsque la densité cellulaire atteint un point critique, ces molécules s'accumulent et déclenchent l'expression d'une série de gènes spécifiques. La production de facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* et la bioluminescence chez certaines bactéries marines sont les résultats du senseur de quorum (Ben-Ari, 1999; Costerton et al., 1999; Fuqua et al., 1996).

Davies et al. (1998) ont caractérisé deux systèmes de SQ chez *P. aeruginosa*. Le premier est le système LasR-LasI. Ce système contrôle l'expression d'une batterie de facteurs de virulence en plus du deuxième système SQ : le système RhlR-RhlI. Le gène *lasI* contrôle la synthèse de L-(3-oxododécanoyl)-N-homosérine lactone et le gène *rhlI*, la

synthèse de L-butyryl-N-homosérine lactone. Comme le SQ requiert une forte densité cellulaire, les signaux de *P. aeruginosa* ne sont impliqués qu'au stade de différenciation du biofilm. Comme résultat, ils ont observé que la souche d'origine ainsi que les mutants *lasI* et *rhlI* peuvent tous les trois coloniser des surfaces et former des micro-colonies. Cependant, le mutant *rhlI* et la souche d'origine étaient capables de se différencier en un biofilm structuré, épais et résistant aux biocides tandis que le mutant *lasI* formait un biofilm mince, non-structuré et sensible aux détergents. Ces résultats ont suggéré que la différenciation d'un biofilm requiert un signal de SQ spécifique (Davies et al., 1998; Costerton et al., 1999; De Kievit et Iglewski, 1999; Parsek et Greenberg, 1999).

1.2.4 Détachement et dispersion des cellules planctoniques du biofilm

Le processus de détachement d'un biofilm fait référence au transport à l'interphase de fragments de biomasse provenant du biofilm, attachés à une surface, jusqu'au compartiment de fluide dans lequel le biofilm baigne (Stewart, 1993). Lorsqu'un biofilm mature atteint un certain âge et que le nombre de cellules atteint un nombre critique, des cellules planctoniques se détachent du biofilm pour aller coloniser d'autres surfaces. Peu d'études ont porté sur les mécanismes de dispersion de cellules du biofilm. Cependant, le mécanisme de dispersion des cellules est un mécanisme qui contrôle le taux de croissance microbienne à l'intérieur du biofilm. De plus, il permet le développement d'un biofilm hétérogène et de fournir un inoculum de cellules pour la colonisation d'autres surfaces. Parmi les mécanismes responsables du détachement des cellules du biofilm, nous retrouvons la réversibilité du facteur σ et la production d'alginate lyase. Le facteur σ serait responsable du changement phénotypique chez les cellules lors du passage de la forme planctonique à la forme sessile. La réversibilité de celui-ci produira des cellules planctoniques. Un autre mécanisme serait la production d'une enzyme, l'alginate lyase, responsable de la dégradation des exopolysaccharides et de la libération des cellules. La production d'alginate lyase a lieu sous condition famélique («starvation») (Boyd et Chakrabarty, 1994; Allison et al., 1998).

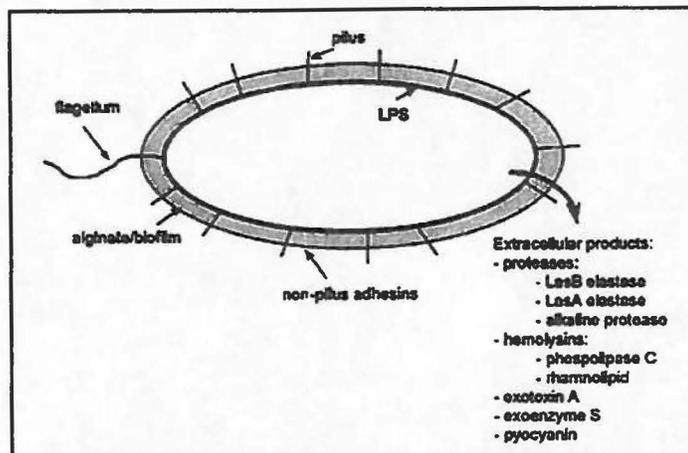
Costerton et *al.* (1995) ont observé que des cellules planctoniques se détachent du biofilm à un rythme constant et que ce détachement est parfois sous le contrôle d'un facteur physiologique et même diurne (Boyd et Chakrabarty, 1994; Costerton et *al.*, 1995; Applegate et Bryers, 1991). Le détachement contrôlé de cellules planctoniques des biofilms représente une stratégie importante pour assurer la survie et la prédominance des bactéries dans un écosystème aquatique (Costerton et *al.*, 1995).

D'autres mécanismes sont responsables du détachement des cellules de la matrice. Quatre mécanismes ont été identifiés : l'érosion, le dépouillement (« sloughing »), l'abrasion, la prédation (Bryers, 1988). L'érosion fait référence au détachement de cellules individuelles ou groupes de cellules de la surface du biofilm. Le dépouillement est un mécanisme où de larges fragments de biomasse se détache du biofilm. Cette biomasse peut atteindre une taille comparable à l'épaisseur du biofilm. Le mécanisme de l'érosion est un mécanisme continu tandis que celui du dépouillement se produit au hasard, de façon sporadique. L'érosion et le dépouillement ont lieu lorsque la quantité d'oxygène ou de source de carbone devient limitée (Applegate et Bryers, 1991; Stewart, 1993). L'abrasion et la prédation sont les résultats de forces externes agissant sur le biofilm (Applegate et Bryers, 1991; Stewart, 1993; Morgenroth et Wilderer, 2000; Xu et *al.*, 1998).

2. Souche *Pseudomonas aeruginosa*

La souche *P. aeruginosa* est étudiée depuis longtemps et constitue maintenant un modèle d'étude largement utilisé. Dans le cadre de ce projet, *P. aeruginosa* a été utilisée parce qu'elle était déjà étudiée dans le laboratoire du Dr. Richard Villemur. Les études portaient principalement sur le rôle physiologique des rhamnolipides.

P. aeruginosa est une bactérie aérobie, Gram négative, motile et en forme de bacille. *P. aeruginosa* occupe des niches diverses. C'est un micro-organisme opportuniste pathogène pour les humains et les plantes. C'est aussi un micro-organisme ubiquitaire qui peut causer des pertes considérables aux industries (Hassett et al., 1999; Costerton et al., 1994). La capacité de *P. aeruginosa* à causer des infections et à se répandre partout est due aux facteurs de virulence. L'expression de ces gènes de virulence est sous le contrôle des SQ (Pearson et al., 1997). *P. aeruginosa* possède des facteurs de virulence associés à la cellule comme le flagelle, le pilus, les adhésines, l'alginate (biofilm), les lipopolysaccharides (LPS) et des facteurs extracellulaires de virulence comme des protéases (élastase, protéase LasA et protéase alcaline), les hémolysines (phospholipase et rhamnolipides) et des toxines (exotoxine A et exoenzyme S) (Figure 3). L'exotoxine A est responsable des infections et de l'invasion bactérienne. L'exoenzyme S est responsable de la destruction des tissus dans les infections pulmonaires et de la dissémination bactérienne. Les deux hémolysines, le phospholipase C et les rhamnolipides agissent ensemble pour dégrader les lipides et les lécithines. Les rhamnolipides ont une propriété hémolytique et surfactante, c'est à dire qu'ils possèdent une structure semblable à un détergent qui les aide à solubiliser les phospholipides pour les rendre plus accessibles. Les protéases jouent un rôle important dans les infections aiguës. Le flagelle, les pili, l'alginate et les adhésines jouent un rôle dans l'établissement d'un biofilm. L'alginate procure, de plus, une protection aux bactéries contre la phagocytose, les antibiotiques et les détergents (Van Delden et Iglewski, 1998; Passador et al., 1993; Gray, 1997; Pratt et Kolter, 1999; Costerton et al., 1995). L'expression des facteurs de virulence dépend de stimuli environnementaux particuliers comme la disponibilité de fer, d'azote, la température, ou l'osmolarité. De façon générale, l'expression des gènes de virulence n'a lieu qu'en présence d'une forte densité cellulaire (Pearson et al., 1997).



(Adaptée de Van Delden et Iglewski, 1998)

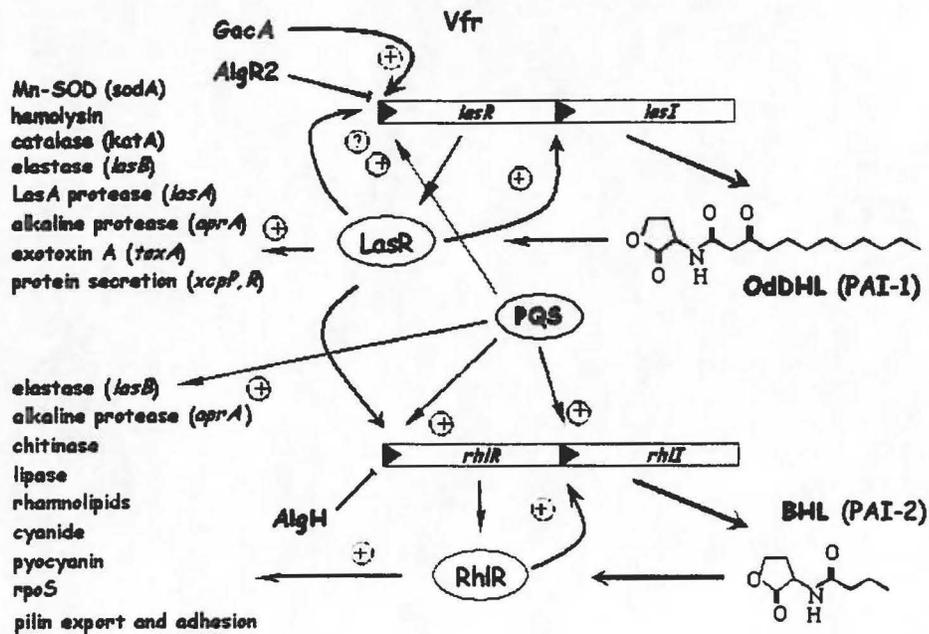
Figure 3 : Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

Chez les bactéries Gram négatives, la majorité des systèmes SQ consiste en un activateur transcriptionnel de type LuxR (protéine R) et une molécule d'homosérine lactone acylée (autoinducteur). Lorsque la densité d'une population bactérienne croît, la concentration d'autoinducteur augmente jusqu'à atteindre une quantité suffisante pour pouvoir se lier et en conséquence activer la protéine R. Lorsque la protéine R est activée, celle-ci stimule l'expression de gènes spécifiques (Fuqua et al., 1996). *P. aeruginosa* possède deux systèmes de SQ, le système *las* et le système *rhl*. Le système *las* fut le premier système à être décrit chez cette bactérie et consiste en l'activateur transcriptionnel LasR et en l'autoinducteur, le L-(3-oxododécanoyle)-N-homosérine lactone (HSL-C₁₂-oxo) dont la synthèse est dirigée par la synthétase d'autoinducteur LasI (Passador et al., 1993). Ce système contrôle l'expression de *lasB*. Il est requis pour la production optimale d'autres facteurs de virulence extracellulaires comme la protéase LasA et l'exotoxine A. Il a été aussi démontré que le système *las* est positivement contrôlé par l'activateur global appelé GacA (Reimann et al., 1997) et le Vfr (Albus et al., 1997). Semblable au système *las*, le système *rhl* se compose aussi d'un activateur transcriptionnel

RhlR et d'un autoinducteur, le L-butyryle-N-homosérine lactone (HSL-C₄) dont la synthèse est dirigée par la synthétase d'autoinducteur RhlI (Ochsner et *al.*, 1994a; Ochsner et Reiser, 1995a). Ce système contrôle l'expression de l'opéron *rhlAB*. L'opéron *rhlAB* code pour la rhamnosyltransférase. La rhamnosyltransférase est requise pour la synthèse des rhamnolipides (Ochsner et *al.*, 1994a, 1994b). Le système *rhl* est aussi requis pour la production optimale d'élastase LasB, la protéase LasA et le *vsm* pour métabolite secondaire de virulence (Figure 4).

En plus des deux types d'autoinducteurs d'homosérines lactones, la présence d'une troisième molécule signalitique intracellulaire chez *P. aeruginosa* appelée le signal quinolone (QUI) a été rapporté. Le QUI a été identifié comme étant un 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone. Sa production a lieu seulement en présence de la forme active de LasR et sa bioactivité est dépendante de RhlR. De plus, le QUI a été trouvé pour contrôler le système *rhl* à un niveau transcriptionnel. Le QUI induit positivement *rhlI* et faiblement le *rhlR* et *lasR*. Ces résultats indiquent que le QUI fait partie de la hiérarchie de SQ. En d'autres termes, il fournit un lien entre les systèmes SQ *las* et *rhl* (McKnight et *al.*, 2000). La production de QUI atteint son maximum à la fin de la phase stationnaire, indiquant que ce signal n'est pas impliqué dans la détection de la densité cellulaire (McKnight et *al.*, 2000).

The 'quorum sensing' cascade in *P. aeruginosa*



(Adaptée de: Mikro.biologie.tu-muenchen.de/microbio/eberl/topics.html)

Figure 4 : Le système de senseur de quorum de *P. aeruginosa*

3. Les biosurfactants

Les biosurfactants constituent un groupe varié de molécules amphiphiles synthétisés par des micro-organismes (Desai et Banat, 1997). Ces molécules amphiphiles composées d'un pôle hydrophile et d'un pôle hydrophobe, ont une affinité pour les interfaces possédant des polarités différentes. Le pôle hydrophile est composé de mono- di- ou polysaccharides, d'acides carboxyliques, d'acides aminés ou de peptides. Le pôle hydrophobe, lui, est composé d'acides gras saturés, non-saturés ou hydroxylés (Ochsner et *al.*, 1995c; Georgiou et *al.*, 1992). Les biosurfactants sont des composés tensioactifs, c'est-à-dire qu'ils diminuent la tension de surface d'un liquide en altérant la

formation de liens hydrogènes et les interactions hydrophiles-hydrophobes (Georgiou et *al.*, 1992). De plus, ils se caractérisent par leur aptitude à former des agrégats et des micelles. Les micelles se définissent comme étant un arrangement thermodynamiquement stable de molécules amphiphiles sous la forme d'une sphère possédant un extérieur hydrophile et un intérieur hydrophobe (Volkering et *al.*, 1995). Les propriétés physico-chimiques des biosurfactants sont discutées plus en détail par Déziel (1996a). Le rôle physiologique des biosurfactants est l'émulsification de substances hydrophobes (Zhang et Miller, 1992), ainsi que la protection contre des micro-organismes étrangers (Ochsner et *al.*, 1995c).

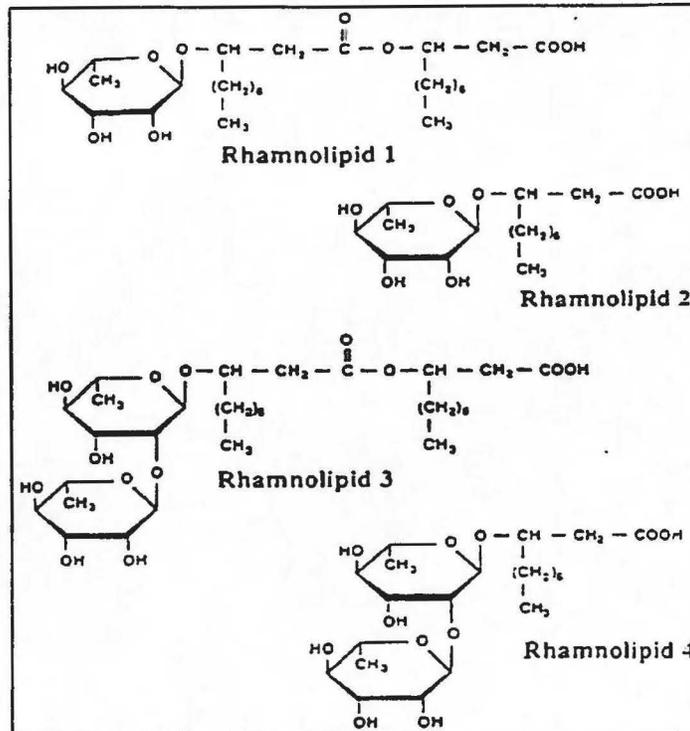
Les biosurfactants sont des métabolites secondaires. Leur production commence à la fin de la phase de croissance exponentielle (Mulligan et Gibbs, 1989) car les enzymes impliqués dans la biosynthèse sont normalement réprimés durant le début de la phase de croissance (Behal, 1986). La nature du substrat carboné utilisé peut affecter la production de biosurfactants, la structure et donc, les propriétés des biosurfactants et pourrait aussi déterminer s'ils seront extracellulaires ou associés à la membrane. La productivité et la structure sont aussi affectées par la concentration de phosphore, d'azote, de manganèse et de fer dans le milieu de culture et par les conditions de culture comme le pH, la température et l'agitation (Ochsner et *al.*, 1995c; Guerra-Santos et *al.*, 1986).

3.1 Rhamnolipides de *P. aeruginosa*

En 1971, Hisatsuka et *al.* ont identifié une substance produite par une souche de *P. aeruginosa* qui stimulait la croissance sur le *n*-hexadécane. Cette substance avait des propriétés tensioactives et émulsionnantes et fut identifiée comme étant un rhamnolipide. *P. aeruginosa* produit deux principales sortes de rhamnolipides en cultures liquides, le L-rhamnosyl-L-rhamnosyl- β -hydroxydécanyol- β -hydroxydécanoate ou (R1) et le L-rhamnosyl- β -hydroxydécanyol- β -hydroxydécanoate ou (R2). Les deux autres sortes de

rhamnolipides, R3 et R4 contenant seulement une portion de β -hydroxydécanoyl sont présumés être les produits de dégradation provenant de l'hydrolyse des rhamnolipides 1 et 2 (Ochsner et *al.*, 1995c) (Figure 5). Rendell et *al.* (1990) ont purifié des rhamnolipides homologues contenant des acides gras C₈, C₁₂ ou C_{12:1}. Les principaux groupes de rhamnolipides semblent être spécifiques à chaque souche et dépendent jusqu'à une certaine limite des conditions environnementales et de la composition du milieu de culture (Ochsner et *al.*, 1995c).

Les gènes impliqués dans la biosynthèse des rhamnolipides ont été isolés et caractérisés par Ochsner et *al.* (1994a, 1994b, 1995a, 1995b). Quatre gènes sont responsables de la synthèse des rhamnolipides. Ces gènes sont les gènes *rhlABRI*. Ces gènes sont sous le contrôle du système *rhl*, l'un des systèmes de SQ chez *P. aeruginosa*. Le gène régulateur (*rhlR*) code pour un activateur transcriptionnel, le RhlR. Cette protéine régulatrice est activée par un autoinducteur, le RhlI, le produit d'une synthétase codée par le gène *rhlI*. Le complexe RhlR-RhlI formé va activer l'opéron *rhlAB* qui va coder pour la rhamnosyltransférase. La rhamnosyltransférase est une enzyme responsable de la synthèse des rhamnolipides (Figure 6).



(Adaptée de Fiechter, 1992)

Figure 5 : Les principales sortes de rhamnolipides chez *P. aeruginosa*

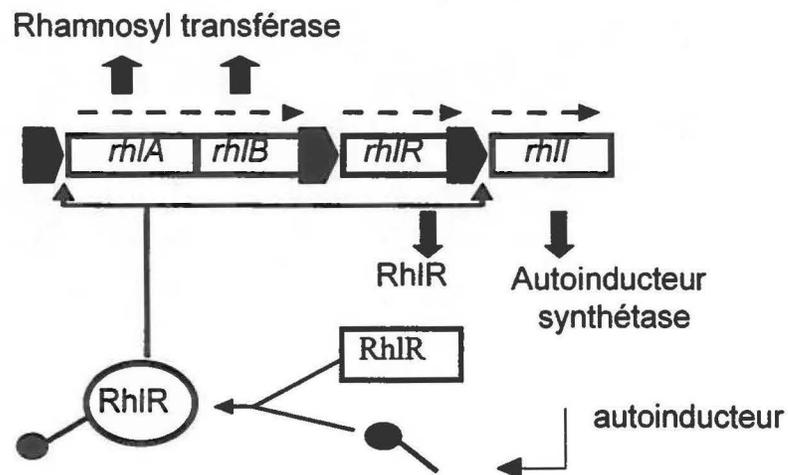


Figure 6 : Les gènes *rhlABRI*

En 1971, Itoh et *al.* ont trouvé que les rhamnolipides favorisaient la croissance de *P. aeruginosa* sur la paraffine (liquide). Plus tard, Oberbremer et Muller-Hurtig (1989) ont observé que la production de biosurfactants favorisaient la dégradation de composés moins solubles en diminuant la tension interfacielle lors d'une étude de biodégradation d'une mixture d'hydrocarbures en réacteurs contenant une suspension sol-eau. Shafeeq et *al.* (1989) ont observé à leur tour, que *P. aeruginosa* souche S8 produisait du biosurfactant lorsque cultivée sur différents alcanes. Depuis, la littérature souligne un lien entre la croissance microbienne sur des substrats insolubles, surtout les alcanes linéaires liquides et autres huiles, et la production de biosurfactants (Hommel, 1990). En effet, les rhamnolipides pourraient favoriser l'assimilation de substrats faiblement disponibles vue leurs caractéristiques émulsifiantes. Deux types de mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle des biosurfactants dans la dégradation des alcanes (Hommel, 1990). Le premier est que les biosurfactants ioniques extracellulaires comme les rhamnolipides émulsifient le substrat aliphatique le rendant plus biodisponible par augmentation de la surface d'échange. Dans le deuxième modèle, les biosurfactants ne sont pas relâchés à l'extérieur de la cellule. À l'inverse, ils restent attachés à la paroi cellulaire et la rendent hydrophobe, favorisant ainsi le contact avec les hydrocarbures pour faciliter leur diffusion dans la cellule. Cependant, il existe peu de preuves directes montrant que les micro-organismes produisent des biosurfactants pour favoriser l'assimilation des substrats insolubles. La seule preuve directe a été obtenue par le groupe de Ochsner et *al.* (1994b) qui ont prouvé que la synthèse des rhamnolipides facilite la croissance des bactéries sur des alcanes linéaires liquides. En effet, ils ont démontré que la mutation des gènes *rhlAB* codant pour la rhamnosyltransférase ralentit la croissance des mutants sur l'hexadécane. Le même résultat a été obtenu par le groupe de Shreve et *al.* (1995). Par ailleurs, Déziel et *al.* (1996b) ont isolé des souches de *Pseudomonas* produisant des biosurfactants lorsque cultivées avec des HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) de faible poids moléculaire. Ils ont observé que la production de biosurfactants favorisait l'assimilation des substrats hydrophobes par la bactérie par solubilisation. Même s'il existe un lien entre la production de biosurfactants et la dégradation de substrats hydrophobes, le mécanisme par lequel les rhamnolipides aident la bactérie productrice demeure inconnu.

4. Techniques de fluorescence permettant l'examen des biofilms

4.1 Fluorescence et fluorochromes

Les fluorochromes sont des molécules capables d'émettre de la lumière à une longueur d'onde précise. La fluorescence est le résultat d'un processus divisé en trois étapes. Lorsque le fluorochrome est excité avec une source d'excitation (lampe ou rayon laser) il absorbe un photon d'une longueur d'onde précise. Celui-ci acquiert un niveau d'énergie supérieur (Étape 1). Cet état d'excitation ne dure que très peu de temps ($1-10 \times 10^{-9}$ secondes). Aussitôt, le fluorochrome change de conformation et dissipe cette énergie partiellement pour parvenir à un état d'excitation moindre (Étape 2). Ensuite, le fluorochrome émet encore de l'énergie à une longueur d'onde précise et retourne à son état initial (Étape 3). C'est cette énergie émise qui est à l'origine de la fluorescence. Due à l'énergie dissipée durant l'état d'excitation (Étape 2), l'énergie du photon d'émission est plus faible que celle du photon d'excitation. En conséquence, la longueur d'onde d'émission est plus longue que la longueur d'onde d'excitation. La différence de l'énergie entre les deux longueurs d'onde est appelée le «Stokes shift» (Johnson, 1996). Les fluorochromes peuvent être liés à des sondes spécifiques, oligonucléotides ou anticorps. Ils peuvent aussi se lier ou réagir avec certaines molécules telles que les protéines, l'ADN ou l'ARN.

Plusieurs centaines de fluorochromes différents sont disponibles sur le marché. Les principaux fluorochromes dérivent de la fluorescéine ou de la rhodamine. Ces substances fluorescent avec grande intensité lorsqu'elles sont excitées avec une longueur d'onde appropriée. Cependant, ils sont sensibles au pH, possèdent une faible photostabilité et un pic d'émission plutôt large rendant leur utilisation moins intéressante. Récemment, des colorants de cyanines, fluorochromes synthétisés à partir de cyanure, ont été développés. Ces colorants ont l'avantage d'être photostables et d'avoir des bandes étroites d'émissions. Lorsque plusieurs fluorochromes sont utilisés ensemble, il est important

que les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ne se chevauchent pas ou peu. Les caractéristiques de quelques fluorochromes les plus utilisés en écologie microbienne sont résumées dans le tableau 1 (Korber et *al.*, 1999).

Tableau 1 : Caractéristiques de quelques fluorochromes les plus utilisés dans la technique FISH et en écologie microbienne

Fluorochrome	Couleur de la fluorescence	Maximum d'absorption (nm)	Maximum d'émission (nm)	Coefficient d'extinction ($M^{-1} cm^{-1}$)
FITC	Vert	494	520	-
Fluorescéine	Vert	495	519	-
Alexa 488	Vert	490	520	62,000
Carboxytetraméthyl-rhodamine	Orange	550	576	93,000
Cy3	Orange	550	565	150,000
Tetraméthylrhodamine	Orange	555	580	80,000
	Orange	555	570	104,000
Alexa 546	Rouge	596	615	85,000
Texas Red	Rouge lointain	649	670	250,000
Cy5				

(©Tirée de Korber et *al.*, 1999)

4.2 Hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes

L'étude de biofilms composés de plusieurs espèces bactériennes requiert des méthodes fiables permettant la localisation d'une population microbienne spécifique par

rapport à d'autres populations en plus de tirer des informations sur son activité. L'application de méthodes moléculaires comme l'hybridation ADN-ADN et les sondes ADN ribosomal (ADNr) 16S et 23S ont permis l'identification des bactéries à partir d'échantillons environnementaux et industriels. (Korber et *al.*, 1999).

L'hybridation *in situ* avec des sondes fluorescentes appelée aussi FISH, est basée sur la tendance qu'a l'ADN ou l'ARN à s'hybrider de manière spécifique à son complément sous conditions dénaturantes (Giovannoni et *al.*, 1988). La technique de FISH nécessite l'utilisation d'oligonucléotides d'une longueur de 15 à 25 nucléotides et qui sont couplés à une molécule fluorescente. Ces oligonucléotides, appelés aussi sondes moléculaires, sont complémentaires à l'ARN ribosomal 16S ou 23S (Schut et *al.*, 1998). Les avantages à utiliser des sondes moléculaires complémentaires à l'ARN ribosomal (ARNr) sont nombreuses. L'utilisation de l'ARN ribosomal comme cible permet de synthétiser des sondes possédant différents degrés de spécificité, puisque l'ARN 16S est très utilisé comme marqueur phylogénétique ou taxonomique. De plus, les molécules d'ARN ribosomal contiennent à la fois des séquences conservées, hypervariables et des séquences de variation intermédiaire. Également, une banque de séquences ARNr extensif est disponible, surtout pour l'ARNr 16S. Ces séquences sont disponibles dans des banques de données comme GeneBank ou le Ribosomal Database Project (Schut et *al.*, 1998). Ensuite, les ribosomes se retrouvent en grande quantité dans le cytoplasme de façon à ce que tout le contenu de la cellule devienne fluorescent lors de l'hybridation avec une sonde spécifique. Finalement, le nombre de ribosome par cellule peut-être utilisé comme indice de la croissance et de l'activité des cellules dans un biofilm (Korber et *al.*, 1999).

4.3 Immunofluorescence

L'immunofluorescence ou (IF) est une technique qui favorise l'utilisation d'anticorps fluorescents. L'utilisation des anticorps fluorescents mono et polyclonaux est peu destructive, peu coûteuse (dans le cas de polyclonaux) et leur signal se distingue bien du bruit de fond. Cependant, cette technique comporte plusieurs désavantages. D'abord, la fabrication d'anticorps monoclonaux exige que la bactérie soit bien connue et bien caractérisée. De plus c'est une méthode laborieuse (Korber et *al.*, 1999). Ensuite, comme il est très difficile de fabriquer des anticorps monoclonaux spécifiques à un groupe, il faut refaire un nouvel anticorps à chaque fois que l'on veut visualiser un nouveau micro-organisme. Finalement, il est fréquent que la technique d'immunofluorescence ne permette pas l'obtention de signaux intenses, ceci à cause de faibles titres en antigènes dans les échantillons (Schut et *al.*, 1998).

4.4 Les gènes marqueurs et/ou rapporteurs

Plusieurs efforts ont été faits pour isoler de façon sélective et quantifier les micro-organismes présents dans leur habitat naturel, mais aussi pour mettre au point des méthodes de détection pour suivre les micro-organismes manipulés génétiquement après leur introduction dans l'environnement (Errampalli et *al.*, 1999). Le rôle d'un micro-organisme particulier dans un écosystème est déterminé seulement lorsque suffisamment d'informations sur son abondance et son activité sont disponibles (Lindow, 1995). Parmi les méthodes mises au point, on retrouve les milieux spécifiques pour isoler des groupes particuliers de micro-organismes et les marqueurs génétiques pour isoler un micro-organisme particulier (Atlas et *al.*, 1992).

Les techniques de l'ADN recombinant sont des plus avantageuses pour l'étude de l'écologie microbienne. L'introduction de gènes permettant de transmettre le phénotype afin d'isoler et de différencier des micro-organismes sont de plusieurs types. Il y a les gènes qui permettent une sélection directe via la résistance aux antibiotiques comme l' amino glycoside phosphotransférase (*aphII*) et le chloramphénicol acétyltransférase (*cat*). Il y a aussi les gènes qui permettent de différencier des souches spécifiques en leur conférant un phénotype particulier comme la production de bioluminescence (luciférase *luc* ou *luxAB*) ou des enzymes capables de cliver des substrats appropriés pour donner des produits pigmentés ou fluorescents (catéchol 2,3-dioxygénase (*xyIE*), β -galactosidase (*lacZ*), tyrosinase (*mel*)) (Sugiyama et al., 1990). Plusieurs revues exhaustives existent sur ces gènes marqueurs (Akkermans et al., 1994; Atlas et al., 1992; Burlage et Kuo, 1994; Kluepfel, 1993; Lindow, 1995; Prosser, 1994; Sayler et Layton, 1990).

4.5 La protéine fluorescente verte

L'étude de la distribution et le comportement d'une bactérie dans un biofilm est possible lorsque des marqueurs moléculaires comme le gène codant pour la protéine fluorescente verte ou une enzyme capable de cliver des substrats appropriés pour donner des produits pigmentés ou fluorescents sont utilisés. Ces gènes rapporteurs peuvent être utilisés non seulement comme marqueurs mais aussi pour suivre l'activité de gènes spécifiques en les fusionnant à des promoteurs spécifiques.

4.5.1 Origine de la protéine fluorescente verte

La protéine fluorescente verte, dénommée par l'abréviation GFP pour « Green Fluorescent Protein » a été découverte par Shimomura et al. (1962) comme étant une protéine accompagnant l'aequorine. L'aequorine est une protéine chémiluminescente

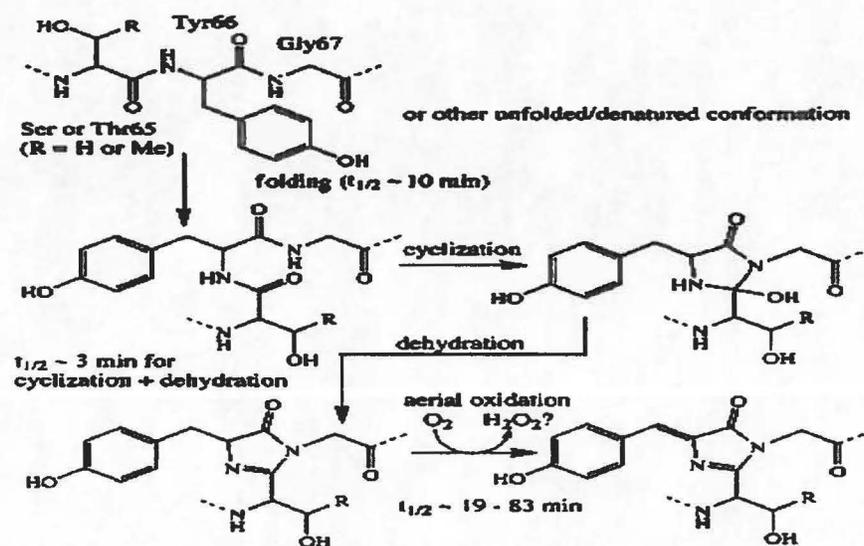
provenant de la méduse *Aequorea Victoria*. Elle émet de la lumière par la simple addition de calcium. Lors de la purification de l'aequorine, ils ont noté que cette protéine donnait une solution de couleur verte lorsque éclairée aux U.V. La GFP atteignait son optimum d'émission à 508 nm, alors que la chémiluminescence de l'aequorine pure était bleue et son optimum d'émission était de 470 nm. Ceci suggérait que la GFP convertit l'émission en bleu de l'aequorine en vert fluorescent chez les cellules intactes. Quelques années plus tard, Morin et Hastings (1971) observèrent le même changement de couleur chez les cœlentérés *Obelia* et *Renilla* et furent les premiers à suggérer un transfert d'énergie sans radiation pour exciter la GFP des cœlentérés *in vivo*. Prendergast et Mann (1978) ont été les premiers à obtenir un estimé clair sur le poids moléculaire du monomère. En 1979, Shimomura a protéolysé la GFP dénaturée, analysé le peptide qui retenait une absorbance visible et conclua que le chromophore était un 4-(*p*-hydroxybenzylidene) imidazolidine-5 attaché au peptide à travers les positions 1 et 2 sur l'anneau.

L'intérêt pour la GFP a pris une toute autre dimension lorsque Prasher *et al.* (1992) ont réussi à cloner le gène codant pour la GFP et que Chalfie *et al.* (1994) et Inouye et Tsuji (1994) ont démontré que l'expression du gène *gfp* dans d'autres micro-organismes produisait de la fluorescence. En conséquence, le gène *gfp* contient toutes les informations nécessaires pour la synthèse postraductionnelle du chromophore et qu'aucune enzyme spécifique provenant de la méduse n'est requise.

4.5.2 Formation du chromophore

Le chromophore est un *p*-hydroxybenzylideneimidazolinone formé à partir des résidus 65-67 qui sont Ser-Tyr-Gly dans la protéine native (Prasher *et al.*, 1992 ; Cody *et al.*, 1993). Le mécanisme de formation du chromophore est le suivant (Figure 7): En premier lieu, la GFP se replie de façon à avoir une conformation quasi native. Ensuite,

l'imidazolinone est formé suite à l'attaque nucléophile de l'amide de Gly67 sur le carbonyle du résidu 65, suivi d'une déshydratation. Finalement, les molécules d'oxygène déshydrogènent les liens α - β du résidu 66 pour insérer son groupe aromatique en conjugaison avec l'imidazolinone. Seulement à ce stade, le chromophore acquiert de l'absorbance et de la fluorescence visible (Heim *et al.*, 1994 ; Reid et Flynn, 1997).



(© Adaptée de Tsien, 1998)

Figure 7 : Mécanisme de formation du chromophore de la GFP

4.5.3 Classification des GFP

En 1996, Cormack *et al.* ont muté le gène *gfp* cloné dans *Escherichia coli* et ont isolé les mutants par cytométrie. Ils ont distingué trois classes de mutants. La classe GFPmut1 possédait une double substitution : F64L, S65T. La GFPmut2 possédait une triple substitution : S65A, V68L, S72A. La GFPmut3a et GFPmut3b possédaient la

même double substitution : S65G, S72A. C'est la GFPmut3b qui a été utilisée dans nos expériences. Les bactéries exprimant les GFP mutantes fluorescaient 100 fois plus que les bactéries exprimant la GFP d'origine. Cette différence dans l'intensité de la fluorescence entre la protéine d'origine et mutante serait due à différents facteurs. Ces facteurs peuvent être soit l'augmentation de l'expression de la protéine, un meilleur repliement de la protéine, une augmentation de son absorbance ou la formation plus rapide du chromophore. De plus, Cormack et *al.* (1996) ont observé que la majorité de GFP d'origine se retrouvait dans les corps d'inclusions de *E. coli* comme étant des protéines insolubles non-fluorescentes. À l'inverse, lorsque les GFP mutantes étaient exprimées dans les mêmes conditions, 90 % des GFPmut1 et quasiment la totalité des GFPmut2 ou GFPmut3 étaient solubles. L'effet de la mutation sur la propriété de la fluorescence de la protéine s'explique par un changement dans le spectre d'excitation. Les GFP mutantes sont excitées à une longueur d'onde variant entre 480 nm et 501 nm comparativement à la GFP d'origine qui est excitée à une longueur d'onde de 395 nm. Ce changement d'environ 100 nm dans le spectre d'excitation permet une meilleure excitation de la GFP à 488 nm. Cette longueur d'onde est utilisée dans plusieurs appareils de fluorescence (laser, filtres dichromatiques) pour l'observation de la fluorescéine.

4.5.4 Variantes de la GFP

L'extrême stabilité de la GFP est désavantageuse lorsqu'on veut suivre le changement de l'expression d'un gène, d'une bactérie spécifique. Dans le cas de la GFP, le contenu intracellulaire en GFP ne sera pas immédiatement affecté par une réduction du niveau d'expression du gène, mais plutôt par la prolifération continue des cellules, qui a pour conséquence la dilution de la protéine. Ainsi, pour contrer ce problème, Andersen et *al.* (1998) ont construit des variétés de GFP dite instables. Ces protéines sont rendues susceptibles à la dégradation par l'addition d'une séquence cible reconnue par des protéases intracellulaires. Cette séquence ajoutée au bout du C-terminal de la GFP est :

AANDENYAXXX. La variation dans les trois dernières positions (XXX) de cette séquence résulte en une variation des demi-vies des protéines dans les cellules vivantes (Tableau 2). Comme les protéases intracellulaires se retrouvent dans une gamme de bactéries Gram négatives et positives, ceci rend l'utilisation des GFP instables dans différentes espèces de micro-organismes possibles (Christensen et *al.*, 1999).

Tableau 2 : Variantes de GFP instables et leurs demi-vies dans *Escherichia coli* et *Pseudomonas putida*

Nom	$T_{1/2}$ (minutes)	
	<i>E. coli</i> (MT102)	<i>P. putida</i> KT2442
Gfpmut3	∞	∞
Gfp(LAA)	40	60
Gfp(LVA)	40	190
Gfp(AAV)	60	190
Gfp(ASV)	110	190
Gfp(AGA)	300-500	non déterminé

(© Tirée de Christensen et *al.*, 1999)

4.5.6 Les applications de la GFP dans les études environnementales

La GFP a été utilisée pour étudier la dynamique et/ou la distribution des bactéries dans le sol, les systèmes d'eaux, les rhizosphères, les boues activées, les biofilms et les nodules des racines. Elle a aussi été utilisée pour étudier le transfert des gènes entre des populations microbiennes dans un biofilm et sur des phylloplanes, pour étudier l'expression des gènes chez les bactéries.

Errampalli et al. (1999) ont présenté une revue des applications de la GFP en environnement. Ils ont mentionné les travaux de Gage et al. (1996) qui ont marqué *Rhizobium meliloti* avec la GFP et ont observé l'infection d'une racine et la formation d'un nodule par cette bactérie. Il y a aussi les travaux de Bloemberg et al. (1997) qui ont étudié la distribution de *Pseudomonas fluorescens* sur la surface de la racine.

L'utilisation de la GFP est idéale pour étudier des biofilms composés de plusieurs espèces bactériennes. Möller et al. (1998) ont étudié l'expression de gènes spécifiques à l'intérieur d'un biofilm composé de populations mixtes dégradant le toluène. Une approche directe pour déterminer la fonction d'un organisme *in situ* est d'étudier l'expression de ses gènes. Ainsi, ils ont fusionné indépendamment le promoteur de la voie supérieure de dégradation de toluène, *Pu*, et le promoteur de la voie méta, *Pm*, du plasmide TOL au gène codant pour la GFP. L'expression de ces promoteurs a été étudiée dans *Pseudomonas putida* R1. L'analyse au microscope a révélé que *P. putida* R1, exprimant le promoteur *Pu*, dominait la partie exposée à l'extérieur tandis que *Acinetobacter* sp. C6, un autre organisme important composant le biofilm, dominait plus au niveau basal.

Skillman et al. (1998) ont utilisé la GFP comme outil pour examiner les interactions entre deux espèces bactériennes, *Enterobacter agglomerans* marquée à l'aide de la GFP et *Klebsiella pneumoniae* G1 colorée avec de l'iodure de propidium, et voir leur effets sur le développement du biofilm. Le biofilm formé montra une augmentation de la croissance et de l'adhésion de ces deux bactéries comparé au biofilm formé seulement par *E. agglomerans* ou *K. pneumoniae*. Ceci suggère que la coopération entre ces deux bactéries serait le résultat d'un mécanisme d'adhésion spécifique qui accroît leur attachement.

On peut aussi utiliser la GFP pour étudier la distribution ou la survie de bactéries à l'intérieur des boues activées. Eberl et *al.* (1997) ont marqué les cellules de *P. putida* avec la GFP et les ont introduites dans des boues activées. Après trois jours d'incubation, seulement quelques cellules fluorescentes ont été détectées entre les floccs de boues. La plupart des cellules se sont incorporées dans les floccs de boues, suggérant que ces dernières ont servi de protection pour les bactéries contre leurs prédateurs, les protozoaires.

Dans les études de biodégradation, la GFP a été utilisée pour suivre des micro-organismes capables de dégrader un polluant. Tresse et *al.* (1998) ont marqué la souche *Moraxella* avec la GFP pour étudier sa survie dans un sol contaminé au *p*-nitrophénol (PNP). La souche avait dégradé 1440 pM de PNP à la même vitesse que la souche originale et était toujours détectée dans le sol après deux semaines suivant l'inoculation. Errampalli et *al.* (1998) ont pu aussi détecter *Pseudomonas* sp. UG14Gr, marquée avec la GFP, jusqu'à 13 mois après inoculation dans un sol contaminé au crésote.

D'autres applications de la GFP existent. Parmi celles-ci, on a l'étude du mouvement des bactéries à travers une matrice environnementale. Le transport des bactéries à travers une matrice dépend de facteurs comme la porosité du sol et la minéralogie, l'hétérogénéité de la taille des particules de sol et la réponse des bactéries à leur environnement. Burlage et *al.* (1996) ont suivi *P. putida* et *E. coli*, marquées avec la GFP, à travers une colonne composée de sol de quartz à l'aide d'un spectrophotomètre. Les autres applications sont l'étude des interactions entre bactéries et protozoaires (Eberl et *al.*, 1997) et le transfert horizontal de gènes entre micro-organismes (Christensen et *al.*, 1996).

5. Chambre à flux continu

Plusieurs appareils ont été développés pour l'étude du développement des biofilms. Parmi ceux-ci, nous retrouvons la chambre à flux continu (Palmer, 1999). La chambre à flux continu est un appareil largement utilisé pour l'étude de la physiologie et la croissance de cellules stationnaires. Cet appareil offre plusieurs avantages. Il permet d'observer un biofilm en direct sous le microscope. Sa conception permet d'obtenir un flux laminaire à l'intérieur des chambres permettant, ainsi d'obtenir un environnement stable et défini. Le fait de cultiver les bactéries dans des chambres parallèles, les paramètres comme le débit, la température, la source de carbone peuvent tous être contrôlés. Finalement, différents types de matériaux pouvant servir comme substratum peuvent être utilisés pour sa fabrication (Palmer, 1999; Wolfaardt et *al.*, 1994; Christensen et *al.*, 1999).

6. Microscopes utilisés pour l'étude des biofilms

6.1 Microscope à épifluorescence

Le microscope à épifluorescence est un excellent outil pour étudier des spécimens fluorescents. Certaines molécules, lorsqu'elles absorbent une énergie radiante deviennent excitées et ensuite libèrent une grande partie de cette énergie sous forme de lumière. Dans le cas de microscope de fluorescence, l'échantillon est éclairé avec une lumière ultra-violette bleu ou avec une lampe à mercure, et la lumière fluorescente résultante produira l'image de l'objet. La lumière passe au travers d'un filtre d'excitation qui transmet seulement la longueur d'onde désirée. Un condenseur à fond noir donne un fond sombre sur lequel les objets fluorescents rayonnent. Le microscope à épifluorescence peut aussi permettre la visualisation des spécimens autofluorescents,

mais la technique la plus utilisée est de marquer les échantillons à l'aide de fluorochrome. Le fluorochrome, exposé à une longueur d'onde lumineuse spécifique, absorbe de l'énergie, devient excité et produit de la fluorescence. Dépendant du fluorochrome utilisé, celui-ci va émettre de la fluorescence bleue, verte ou rouge. Le microscope forme une image des micro-organismes marqués au fluorochrome avec la lumière émise par les composés fluorescents. (Lawrence et *al.*, 1997; Prescott et *al.*, 1993) (Figure 8).

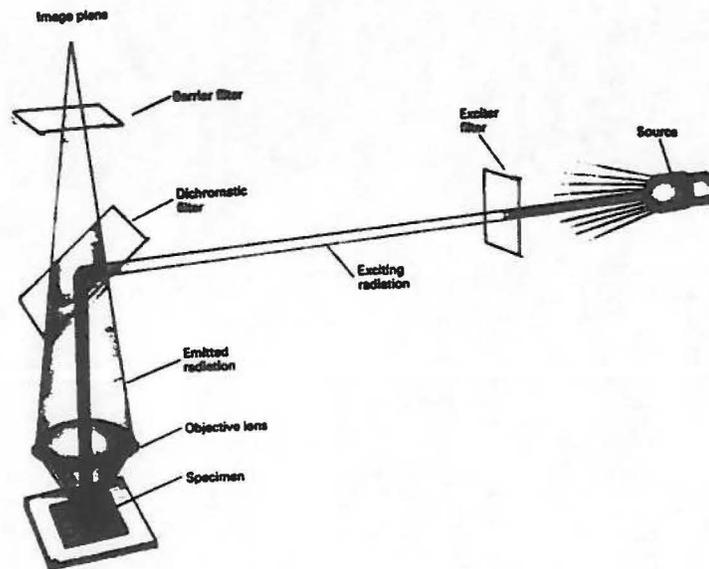


Figure 8 : Microscope à épifluorescence

6.2 Microscope confocal à balayage au laser

Avec l'arrivé du microscope confocal à balayage au laser, l'étude des biofilms fut grandement facilitée (Paddock, 1999). D'autres instruments comme les micro-électrodes permettent d'examiner, de façon indirecte, la nature chimique et physique du biofilm (Costerton et *al.*, 1995; Caldwell et *al.*, 1992; Palmer et Sternberg, 1999).

Le microscope confocal à balayage au laser ou le CLSM est un microscope à épifluorescence amélioré auquel il a été ajouté un laser, des équipements spécialisés pour un balayage optique et pour obtenir des images digitalisées. Le CLSM permet d'étudier des biofilms de façon non destructive. L'avantage d'utiliser le CLSM par rapport au microscope à épifluorescence est qu'il permet de faire des sectionnements optiques minces. Le sectionnement optique élimine les informations hors foyer, ce qui permet d'obtenir des images claires avec des résolutions dans les plans XY et XZ améliorées. Outre l'aspect du microscope confocal, il permet de visualiser des images acquises en trois dimensions (Lawrence et Neu, 1999).

Dans le CLSM, le rayon laser est orienté à l'aide d'un miroir dichroïque de façon à balayer l'échantillon point par point et ligne par ligne. Le miroir dichroïque est relié au balayeur optique. Le faisceau laser permet d'exciter une variété de fluorochromes et peut même aller jusqu'à en exciter trois à la fois. Le fluorochrome excité par le rayon laser émet de la fluorescence qui est dirigée vers le photomultiplicateur. Également, des ouvertures positionnées de façon confocale en amont de la lumière incidente provenant du laser, et en amont du détecteur de photomultiplicateur empêchent les signaux hors foyer d'atteindre le photodétecteur (Figure 9) (Lawrence et *al.*, 1997; Lawrence et Neu, 1999). Les images acquises sont digitalisées et peuvent ensuite être améliorées et analysées à l'aide de programmes informatiques. Le seul inconvénient du CLSM est que la distance de pénétration est limitée à 100 μm . Ce problème peut être contourné en sectionnant l'échantillon à l'aide des mêmes techniques histologiques utilisées pour le microscope à épifluorescence.

SIMPLIFIED OPTICS OF A LSCM

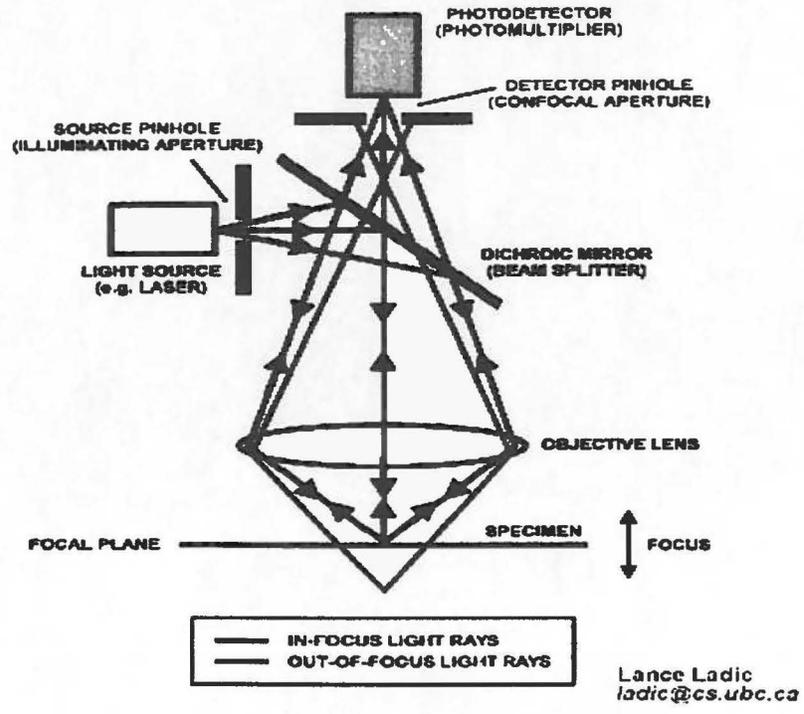


Figure 9 : Principe de fonctionnement du microscope confocal à balayage au laser

Approche expérimentale

1. Souches étudiées

Les souches ayant servi comme modèles d'étude dans ce projet ont été les souches 57RP et 57RP-98 de *Pseudomonas aeruginosa*. La souche *P. aeruginosa* 57RP a été isolée d'un sol (sablère Thouin) fortement contaminé avec des hydrocarbures pétroliers (Déziel, 1996a et 1996b). Elle a été sélectionnée pour sa capacité à dégrader des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) de deux à trois cycles aromatiques, comme le naphthalène et le phénanthrène et aussi, pour sa capacité à produire des biosurfactants de type rhamnolipides et former un biofilm. La souche 57RP-98 (km'), originaire de la souche 57RP, a été choisie pour son incapacité à synthétiser des rhamnolipides (*rhlA*⁻) (Déziel, 1998). Par contre, comme sa souche mère, elle dégrade les HAP de faible poids moléculaire et forme un biofilm (Travaux de Richard Villemur et Éric Déziel).

2. Vecteurs et souches employés

Souches	Caractéristiques	Provenance
<i>Escherichia coli</i> S17-1 (λ-pir)	Tp ^r Sm ^r <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> M ^r , RP4: 2-Tc: Mu: km Tn7, λ pir	Laboratoire de Kenneth Timmis du GBF-National
PM18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 57RP + (P _{A1/04/03} -RBSII- <i>gfp</i> mut3*T ₀ -T ₁)	Ce travail
JB120	<i>E. coli</i> MV1190 (λ-pir) + pJBA28 (Ap ^r ; Km ^r ; plasmide de transfert pour mini-Tn5-km-P _{A1/04/03} -RBSII- <i>gfp</i> mut3*T ₀ -T ₁)	Jens Bo Andersen du laboratoire de Dr. Soren Molin, Technical University of Denmark (Andersen et al., 1998)
JB167	<i>P. putida</i> + pJBA28	

PJBA28	Transposon contenant le promoteur répressif LacI, le site de liaison au ribosome RBSII et le gène codant pour la GFPmut3* stable (S2R, S65G, S72A) (Figure 13)	Jens Bo Andersen du laboratoire de Dr. Soren Molin, Technical University of Denmark (Andersen et al., 1998)
--------	--	---

3. Extraction de l'ADN plasmidique

Le protocole d'extraction de l'ADN plasmidique adopté est celui de Sambrook et al. (1989). Les souches possédant un plasmide ont été étalées sur du milieu solide Luria Burtani (LB) modifié (Bacto tryptone (Difco) 10 g/l, extrait de levure (ICN Biomedicals) 5 g/l, NaCl 4 g/l, agar 15 g/l) contenant de la kanamycine monosulfate (Fisher Scientific) à 50 µg/ml. Les pétris ont été incubés pendant 16 à 18 heures à 37° C. Une colonie a été ensuite repiquée dans 250 ml de milieu LB contenant de la kanamycin monosulfate à 50 µg/ml. La culture bactérienne a été incubée pendant 18 heures à 37° C sous agitation de 225 rpm. Le lendemain, la culture bactérienne a été centrifugée à 10 000 g pendant 10 minutes à 4° C. Le culot résultant a été resuspendu dans 9 ml de TEG (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8 et glucose 50 mM). Ensuite, 1 ml de lysozyme (10 mg/ml dans TEG) (Boehringer Mannheim) a été ajouté. Après 10 minutes d'incubation à 22° C, 30 ml de solution composée de NaOH 0,2 M / SDS 1 % (p/v) ont été ajoutés au mélange. Le tout a été réincubé à 22° C pendant 5 minutes. Ensuite, 1,5 ml de solution d'acétate de potassium 3 M pH 4,8 a été ajoutée au mélange qui a été incubé pendant 15 minutes sur de la glace. Ce mélange a été centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes à 4° C. Le surnageant a été filtré sur du coton à fromage. Après filtration, 0,6 volume d'isopropanol a été ajouté au surnageant. Le tout a été incubé pendant au moins 1 heure à la température de la pièce. Suite à l'incubation, le mélange a été centrifugé à 10 000 g pendant 15 minutes à 22° C. Le culot a été dissous dans 1875 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8 et EDTA 1 mM pH 8). À ce mélange, 625 µl d'acétate d'ammonium 10 M a été ajouté. Le tout a été incubé sur de la glace pendant 20 minutes, suivi d'une centrifugation

de 15 minutes à 10 000 g à 22°C. Le surnageant contenant les acides nucléiques a été mélangé avec 2 volumes d'éthanol puis incubé sur de la glace pendant 20 minutes. Après centrifugation de 15 minutes à 10 000 g à 22°C, le culot a été dissous dans 250 µl de TE; puis l'ARN a été digéré avec 1 µl de ribonucléase A (10 mg/ml) pendant 15 minutes à 37° C.

L'étape suivante consistait à purifier l'ADN par précipitation au polyéthylène glycol (PEG). Des solutions de NaCl 5M (107 µl) et de PEG 30% (p/v) / NaCl 1,5 M (89 µl) ont été ajoutées à l'ADN. Le tout a été incubé sur glace pendant 30 minutes puis centrifugé à 16 000 g pendant 10 minutes à 22°C. Le culot a été dissous dans 450 µl de tampon TE. L'ADN plasmidique a été extrait premièrement avec 1 volume de phénol/ chloroforme/ alcool isoamylique (25 :24 :1), puis avec 1 volume de chloroforme/ alcool isoamylique (24 :1). Ensuite, l'ADN a été précipité avec 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pH 7 et 2 volumes d'éthanol 100% pendant 30 minutes à - 20° C. Le culot d'ADN plasmidique a été récupéré par centrifugation à 16 000 g pendant 10 minutes à 4°C puis dissous dans de l'eau déminéralisée. La concentration d'ADN en µg/ml a été calculée selon la formule suivante :

$$[(DO_{260} - DO_{280}) \times 100] \times \text{dilution} = \text{Concentration d'ADN en } \mu\text{g/ml}$$

4. Digestion de l'ADN par les enzymes de restrictions

Les digestions enzymatiques ont été effectuées à l'aide des enzymes de restriction (Pharmacia) d'intérêts mélangés au tampon « One-Phor-All buffer PLUS » 10X (Tris-acétate 100 mM pH 7,5, acétate de magnésium 100 mM et acétate de potassium 500 mM). La concentration finale du tampon de digestion a été de 1X ou 2X selon les spécifications du fabricant. La durée des digestions a été d'au moins une heure à la température optimale (37° C) pour les réactions enzymatiques.

5. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les échantillons d'ADN ont été mélangés à un tampon de charge LB 6X (glycérol 10% (v/v), EDTA 50 mM, 0,02 % (p/v) de bromophénol bleu et xylène cyanol). Le marqueur utilisé comme contrôle était l'ADN du phage lambda digéré par l'enzyme *Sty I* (Pharmacia). Les échantillons ont été fractionnés par électrophorèse sur des gels composés de 1 à 1,5% d'agarose (ICN Biomedicals) dissous dans du tampon TAE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM pH 8 et acétate 20 mM). Le gel a été ensuite placé dans la chambre électrophorétique (mini SUB DNA CELL, Bio-Rad) remplie de tampon TAE 1X. La durée de la migration était de 45 à 90 minutes à 50-80 volts. Les ADN ont été colorés dans une solution de bromure d'éthidium 0,5 µg/ml (Sigma) pendant 15 minutes puis décolorés dans de l'eau pendant 5 minutes. Les fragments d'ADN obtenus ont été visualisés sous rayonnement U.V. à l'aide de l'appareil Gel Doc 1000 (Bio-Rad).

6. Transformation bactérienne

La souche *E. coli* S17-1 (λ -pir) a été étalée sur du milieu solide SOB (bactotryptone (Difco) 20 g/l, extrait de levure (ICN Biomedicals) 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM et agar (Difco) 15 g/l) et incubées pendant 18 heures à 37° C. Une colonie a été ensemencée dans 30 ml de milieu SOB sans agar. La culture bactérienne a été incubée à 37° C avec agitation de 225 rpm jusqu'à atteindre une D.O._{600 nm} entre 0,4 et 0,6. La culture bactérienne a été ensuite incubée sur glace 15 minutes puis centrifugée pendant 5 minutes à 1800 g à 4° C. Le culot de cellules a été resuspendu dans 20 ml de CaCl₂ 100 mM stérile, puis incubé sur glace pendant 10 minutes. Après centrifugation de 5 minutes à 1800 g à 4°C, le culot a été resuspendu une deuxième fois dans 10 ml de CaCl₂ 100 mM. Le mélange a été placé sur glace pendant 10 minutes. Ensuite, il a été centrifugé une deuxième fois à 1800 g pendant 5 minutes à 4° C. La même opération a été répétée mais cette fois-ci, le culot a été resuspendu dans 1 ml de CaCl₂ 100 mM.

L'ADN (100 - 500 ng ; 1 – 5 µl) a été ajouté à 200 µl de suspension bactérienne. Le tout a été incubé sur glace pendant 30 minutes pour ensuite subir un choc thermique à 42° C pendant 90 secondes afin de permettre aux plasmides de pénétrer les cellules. Après le choc thermique, les cellules ont été placées de nouveau sur glace pendant 2 minutes puis transférées dans 800 µl de milieu SOC (milieu SOB plus glucose 10 mM stérile) et agitées à 225 rpm pendant 45 minutes à 37° C. Ensuite, 200 µl de cellules transformées ont été étalées sur des géloses SOB contenant 50 µg/ml de kanamycine monosulfate (Fisher Scientific) et 100 µg/ml d'ampicilline (Boehringer Mannheim) pour ADN plasmidique et 100 µg/ml d'ampicilline pour Bluescript. Les géloses ont été incubées à 37° C pendant 24 heures. Le plasmide Bluescript (4 ng) a servi comme contrôle pour estimer le taux de transformation. L'identification des transformants a été faite grâce à la fluorescence verte de la GFP.

7. Mini-préparation d'ADN plasmidique avec lyse alcaline

Les colonies transformantes ont été repiquées dans 5 ml de milieu SOB sans agar contenant de la kanamycine à 50 µg/ml et incubées à 37° C toute la nuit avec agitation à 225 rpm. Le protocole utilisé pour extraire l'ADN plasmidique était le même que celui mentionné à l'étape 3. Cependant, l'étape de purification par PEG a été exclue. L'identification des bons transformants a été effectuée par vérification de la présence de fluorescence.

8. Congélation des souches

Après vérification des souches transformantes ayant acquis le vecteur et l'insert, 850 μ l de culture bactérienne ont été mélangés avec 150 μ l de glycérol 15% (v/v) et congelés à -70° C pour usage ultérieur.

9. Conjugaison entre *E. coli* et *P. aeruginosa*

Le protocole de conjugaison a été adapté pour *P. aeruginosa*. Une culture de 16 heures de la souche réceptrice (*P. aeruginosa*) et de la souche donneuse (*E. coli*) ont été diluées à une D.O._{600 nm} égale à 0,3 et 0,5 respectivement. La souche donneuse a été placée à 37° C sous agitation à 200 rpm jusqu'à atteindre une D.O._{600 nm} entre 0,7 et 0,9. La souche réceptrice a été placée à 42° C sans agitation jusqu'à atteindre une D.O._{600 nm} entre 1 et 1,5. Un ratio de volume égal du donneur et du receveur ont été mélangés puis filtré à travers un filtre de nylon de 0,22 μ m (OSMONICS Inc.). Le filtre a été incubé sur du milieu LB modifié pendant 24 heures à 30° C. Le filtre a été ensuite mis dans 5 ml de milieu LB et agité pour libérer les bactéries. Une partie de la suspension bactérienne a été étalée sur du milieu Flo agar (BBL) (pancreatic digest of casein 10 g/l, peptic digest of animal tissue 10 g/l, phosphate dipotassium 1,5 g/l, sulfate de magnésium 1,5 g/l et agar 14 g/l) et incubée pendant 24 h à 37° C. Ce milieu a été adapté de King et *al.* (1954). Le milieu permet la sélection de *P. aeruginosa* grâce à l'ajout de cétrimide ou CTAB (SIGMA) 0,3 g/L. L'ajout de la kanamycin monosulfate à 500 μ g/ml a permis la sélection des bactéries ayant acquis la résistance à cet antibiotique.

10. Visualisation des transconjugants en microscopie à épifluorescence

Les souches *E. coli* et *P. aeruginosa* ayant acquis le gène codant pour la GFP ont été étalées sur du milieu SOB contenant de la kanamycin monosulfate à 50 µg/ml (pour *E. coli*) ou à 500 µg/ml (pour *P. aeruginosa*) et incubées toute la nuit à 37° C. En parallèle, des souches contrôles ont été utilisées. Les souches *E. coli* JB120 et *Pseudomonas putida* JB167, servant comme contrôles positives, ont été étalées sur du milieu SOB. La souche *P. aeruginosa* 57RP, servant comme contrôle négatif, a été étalée sur du milieu SOB sans antibiotique. Les souches ont été incubées toute la nuit à 37° C. Une colonie de chaque souche a été repiquée de façon stérile dans 2 ml de milieu SOB et incubée à 37° C sous agitation à 225 rpm jusqu'à atteindre une D.O._{600 nm} entre 0,5 et 1. Un ml de culture bactérienne a été prélevé et centrifugé à 6000 g pendant 2 minutes à 4° C. Le culot de cellules a été ensuite lavé deux fois avec une solution de PBS pyrophosphate (Na₂HPO₄.7H₂O 10 mM, NaCl 130 mM, NaH₂PO₄.H₂O 10 mM et Na₄P₂O₇.10H₂O 10 mM, pH 7,2) où chaque lavage a été séparé par une centrifugation à 6000 g pendant 2 minutes. Par la suite, le culot a été resuspendu dans 500 µl de PBS pyrophosphate et 5 µl de culture de cellules ont été étalées sur une lame (Fisher Scientific) puis recouvertes d'une lamelle de microscope (Fisher Scientific). Les cellules fluorescentes ont été visualisées au microscope à épifluorescence (Leitz, DIALUX 20) à une longueur d'onde de 488 nm (longueur d'onde requise pour exciter la GFP).

11. Méthodes directes pour mesurer la production de biosurfactants

Les souches *P. aeruginosa* ayant acquis la GFP et la souche *P. aeruginosa* 57RP (contrôle) ont été étalées sur du milieu Luria Burtani (LB) modifié contenant 500 µg/ml de kanamycin monosulfate (sans antibiotique pour 57RP) et incubées à 37° C pendant 18 heures. Une colonie de chaque souche a été inoculée dans 10 ml de milieu minimum liquide SW_f (KH₂PO₄ 0,7 g/l, Na₂HPO₄ 0,9 g/l, NaNO₃ 2 g/l, MgSO₄.7H₂O 0,4 g/l,

CaCl₂.2H₂O 0,1 g/l, mannitol 10 g/l, pH 6,7) enrichie de FeSO₄.7H₂O 0,001 g/l, puis incubée à 30° C avec agitation à 225 rpm pendant 3-5 jours. L'identification de la production de biosurfactants a été faite visuellement par agitation des tubes de culture bactérienne et observation de la formation d'une mousse blanche abondante (ressemblant à la mousse de savon). L'abondance de la mousse formée par les souches ayant acquis la GFP a été comparée avec la souche contrôle 57RP. Le test a été fait en duplicata pour chaque colonie.

11.1 Géloses bleues Siegmund-Wagner (SW)

Un autre test semi-quantitatif et sensible a été effectué pour valider la production de rhamnolipides chez les transconjugants. Ce test consistait à étaler une colonie de chaque clone sur des géloses bleues SW, méthode développée par Siegmund et Wagner (1991). Ces géloses étaient composées du milieu de sels minéraux SW additionné de 0,2 g/l de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (Sigma Chemicals Co), de 0,005 g/l de bleu de méthylène, 20 g/l de substrat et 15 g/l d'agar. La production de biosurfactants chez les transconjugants a été détectée par la formation d'une auréole bleue foncée autour des colonies productrices. La formation d'une auréole bleue foncée était due à la précipitation du bleu de méthylène entraînée par les paires ioniques. Les paires ioniques ont été formées entre le surfactant synthétique cationique inclus dans la gélose et le biosurfactant anionique sécrété par les bactéries (Déziel, 1996a).

12. Détection de la dégradation du phénanthrène et du naphthalène

Les souches *P. aeruginosa* ayant acquis la GFP ont été étalées sur du milieu LB modifié contenant 500 µg/ml de kanamycine monosulfate. La souche *P. aeruginosa* 57RP (contrôle) a été étalée sur du milieu LB modifié, mais sans antibiotique. Les souches ont été incubées à 37° C pendant 18 h. Une colonie de chaque souche a été

déposée sur du milieu BH-Y (Bushnell-Haas (Difco) 3,27 g/l, extrait de levure (ICN Biomedicals) 0,5 g/l et agar (Difco) 15 g/l) puis incubée à 30° C durant 3 heures. Des colonies ont été vaporisées abondamment avec une solution de 2 % (dans acétone) (p/v) de phénanthrène. D'autres ont été vaporisées avec une solution de 2 % (p/v) de naphthalène. Les colonies ont été ensuite incubées durant 7-10 heures à 30° C. L'identification a été faite de façon visuelle grâce à la formation de zones claires autour des colonies ayant dégradé le phénanthrène et le naphthalène. L'expérience a été effectuée en triplicata.

13. Traçage de la courbe de croissance des transconjugants ayant acquis le gène *gfp* et celle de la souche 57RP

Une colonie de chaque transconjugant, ayant acquis la cassette GFP, a été inoculée dans 5 ml de milieu LB liquide modifié contenant 500 µg/ml de kanamycine monosulfate. La souche *P. aeruginosa* 57RP (contrôle) a été inoculée aussi dans du milieu LB liquide modifié, mais sans antibiotique. Les souches ont été incubées pendant 16 h. à 37° C sous agitation à 200 rpm. Les cultures bactériennes ont été placées dans du milieu LB modifié frais à une $D.O._{600\text{ nm}} = 0,17$. Ensuite, la $D.O._{600\text{ nm}}$ des transconjugants et de la souche 57RP a été prise à toute les deux heures pendant 10 h.

14. Quantification de la biomasse de la souche PM18 et celle de la souche 57RP-98

Les souches PM18 et 57RP-98 de *P. aeruginosa* ont été étalées sur du milieu LB (Bacto tryptone (Difco) 10 g/l, extrait de levure (ICN Biomedicals) 5 g/l, NaCl 5 g/l, agar 15 g/l) et incubées toute la nuit à 37° C. Une colonie de chaque souche a été inoculée dans des tubes en polystyrène contenant 500 µl de milieu BDT (0,2 % dextrose (ICN Biomedicals), 0,5 % tryptone(Difco), 3,27 g/l Bushnell-Haas (Difco)) ou de milieu Swarm (0,8 % bouillon nutritif (Difco), 0,5 % dextrose). L'inoculum de départ a été de

D.O._{600 nm} = 0,17. Les tubes ont été incubés à 30° C pendant plusieurs jours. À toutes les 24 heures, trois séries de tubes de chaque souche ont été prélevées, le milieu jeté, puis les tubes ont été rincés à l'eau 2 à 3 fois. La biomasse des cellules adhérentes aux parois des tubes a été colorée avec du cristal violet 1 % (p/v) pendant 10 minutes à 22° C. Ensuite, le colorant a été retiré et 2 ml d'éthanol 95 % ont été ajoutés aux tubes pour solubiliser le cristal violet. Les tubes ont été fortement agités. Pour faciliter le détachement de la biomasse, des billes en verre stériles ont été ajoutées dans les tubes. L'absorbance du cristal violet a été mesurée à une D.O. de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

15. Effet de l'ajout d'une solution de rhamnolipides de 0,1 % sur le dispersement des cellules

La méthode utilisée a été celle de Reid et *al.* (1999). Les souches PM18 et 57RP-98 de *P. aeruginosa* ont été étalées sur du milieu LB et incubées toute la nuit à 37° C. Une colonie de chaque souche a été inoculée à une série de huit tubes en polystyrène de 1,5 ml (une colonie par tube) contenant 500 µl de milieu BDT. L'inoculum de départ avait une D.O._{600 nm} = 0,17. Les tubes ont été incubés à 30° C pendant 8 jours pour permettre la formation d'une biomasse sur les parois des tubes. Le milieu a été ensuite jeté et les tubes ont été rincés à l'eau. Quatre tubes de chaque souche ont servi de contrôles et les quatre autres ont servi pour faire l'essai. Dans les tubes d'essais, 200 µl de solution de rhamnolipides (1 mg/ml d'eau) (purification fait par Sylvain Milot, INRS-IAF) ont été ajoutés aux tubes, suivis d'une incubation à 4° C sous agitation à 10 rpm pendant 4 heures. Pour les tubes contrôles, la même opération a été effectuée sauf que 200 µl d'eau déminéralisé a été ajoutée aux tubes. Après l'incubation, la solution a été retirée et les tubes ont été rincés trois fois avec 200 µl de PBS pyrophosphate. Une solution de cristal violet 1% a été ajoutée aux tubes et le tout a été incubé pendant 10 minutes à la température de la pièce. La biomasse qui a adhéré sur la paroi des tubes a été mesurée comme décrit à la section précédente.

16. Culture en cuvée de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98

La culture en cuvée consistait à cultiver des biofilms dans des tubes avec bouchon à visser de 50 ml (Sarstedt, Allemagne) dans lesquels une lame en polystyrène (Nalgen Nunc) servant de substratum a été insérée à l'intérieur (Figure 10). Les biofilms ont été cultivés dans 30 ml de milieu BDT ou Swarm pendant 12 jours à 30° C. L'inoculum de départ pour les souches PM18 et 57RP-98 a été de $D.O._{600\text{ nm}} = 0,2$. La souche PM18 et la souche 57RP-98 ont été cultivées indépendamment puis ensemble. Les milieux ont été remplacés tous les trois jours.

Après formation d'un biofilm sur le substratum, les cellules ont été fixées avec une solution de paraformaldéhyde (Fisher Scientific) 4% (2 g paraformaldéhyde, 10 μ l NaOH 10 M, 16,5 ml de tampon PBS 3x (NaCl 390 mM, NaPO₄ 30 mM, pH 7,2) et 33 ml d'eau déminéralisé) pendant 1 h à 4° C. Ensuite, une hybridation *in situ* a été faite sur les biofilms de 57RP-98 et sur les biofilms composés de PM18 et de 57RP-98. L'hybridation *in situ* a été effectuée en ajoutant une solution de pré-hybridation (50 μ l) (30 % formamide (ICN), 0,9 M NaCl, 0,1 M Tris-HCl (Fisher Scientific) pH 7,5 et 0,1% (p/v) de SDS (MC et B) sur les biofilms. Les biofilms ont été recouverts d'une lamelle et le tout a été incubé à 37° C pendant 30 minutes. Ensuite, la solution de pré-hybridation a été retirée et la solution d'hybridation (50 μ l) contenant la sonde Eub 338 (5' GCT GCC TCC CGT AGG AGT 3') (position 338-355 au gène de l'ARN 16S ribosomal de *E. coli*) couplée au fluorochrome Cy3 (Medicorps) (2,7 μ g/ml final) a été ajoutée (Amann et al., 1990). Le tout a été incubé à 37° C pendant 3 heures dans une boîte hermétique. Le fluorochrome Cy3 a été choisi parmi d'autres fluorochromes parce que les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de Cy3 chevauchaient peu avec celles de la GFP. Suite à l'hybridation de la sonde aux cellules, deux lavages ont été effectués pour se débarrasser de la sonde qui n'a pas hybridé. Le premier lavage a été effectué avec la solution de pré-hybridation (50 μ l) pendant 30 minutes à 37° C. Le deuxième lavage a été effectué avec une solution contenant de Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 et de NaCl 0,9 M (50

μl) pendant 30 minutes à 37° C. Les biofilms ont été visualisés au microscope confocal (section 20 dans Approche expérimentale).

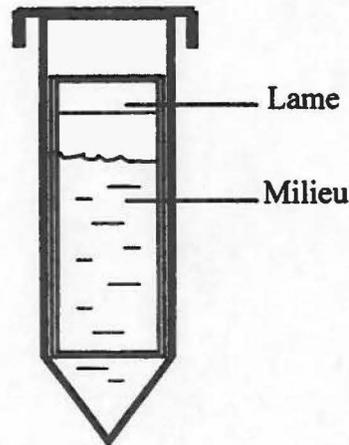


Figure 10 : Culture en cuvée

17. Développement de biofilms dans des chambres à flux continu

17.1 Établissement du système

Le système à flux continu était constitué d'un réservoir de milieu de culture, d'une pompe péristaltique (Masterflex, Cole-Parmer) servant à acheminer le milieu, d'une trappe d'air pour éviter l'accumulation de bulles d'air dans les chambres et de huit chambres creusées dans un bloc de Plexiglas de dimensions de 40 mm de longueur x 4 mm de largeur x 1 mm de profondeur (cadeau de J. Lawrence, National Water Research Institute, Saskatoon) et d'un réservoir pour les effluents (Figure 11A). Une lamelle (50 x 40 mm) a été collée à l'aide d'une colle de silicone RTV clair (Loctite Canada Inc.) sur la partie découverte des chambres afin d'obtenir des chambres fermées et isolées (Figure 11B). Le système a été connecté à l'aide de tubulures faites en silicone (Masterflex,

Cole-Parmer). Ces tubulures ont été connectés aux chambres par la colle de silicone RTV clair (Figure 11A). Préalablement à l'inoculation, le système a été stérilisé avec une solution d'hypochlorite de sodium 0,6 % (v/v) toute la nuit, suivi d'un rinçage avec de l'eau stérile.

Avant l'ensemencement des chambres, la pompe péristaltique a été arrêté et la chambre à flux continu a été déconnectée des tubulures. Des cultures de 16 heures des souches *P. aeruginosa* PM18 et 57RP-98 ont été diluées à une $D.O_{450\text{ nm}} = 0,2$. Ensuite, 300 μl de culture ont été introduits dans la chambre à l'aide d'une seringue (Becton-Dickinson). De chaque extrémité de la chambre, des pinces ont été posées pour éviter l'écoulement du liquide. La chambre a été retournée à l'envers (180°) et les bactéries ont été incubées pendant 1 heure pour permettre l'attachement des cellules au substratum (i.e. la lamelle). Par la suite, la chambre a été reconnectée de nouveau aux tubulures et le système a été remis en marche. Pour obtenir un flux laminaire dans les chambres, le débit a été fixé à 0,28 mm/s (Christensen et al. 1999; Palmer, 1999). Les biofilms ont été cultivés en milieu BDT et en milieu Swarm.

17.2 Fixation et enrobage du biofilm

La fixation du biofilm a été faite à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 4 %. La solution a été acheminée dans les chambres à l'aide d'une seringue (Becton-Dickinson). Préalablement à la fixation, le système a été arrêté et les chambres ont été déconnectées des tubulures. Des pinces ont été posées aux extrémités des chambres pour éviter l'écoulement du liquide. Le biofilm a été incubé dans la solution de paraformaldéhyde pendant 1 heure à 4°C . Après fixation, le système a été reconnecté aux tubulures et le biofilm a été lavé avec une solution de PBS 1X pendant 20 minutes à un débit de 10 ml/h. Ensuite, une solution de polyacrylamide (Bio Rad) 20 % (p/v) (acrylamide-bisacrylamide 200 : 1) a été ajoutée aux chambres afin de conserver la

structure tridimensionnelle du biofilm et faciliter sa manipulation. Après polymérisation, le biofilm a été retiré de la chambre en enlevant la lamelle (Figure 11B).

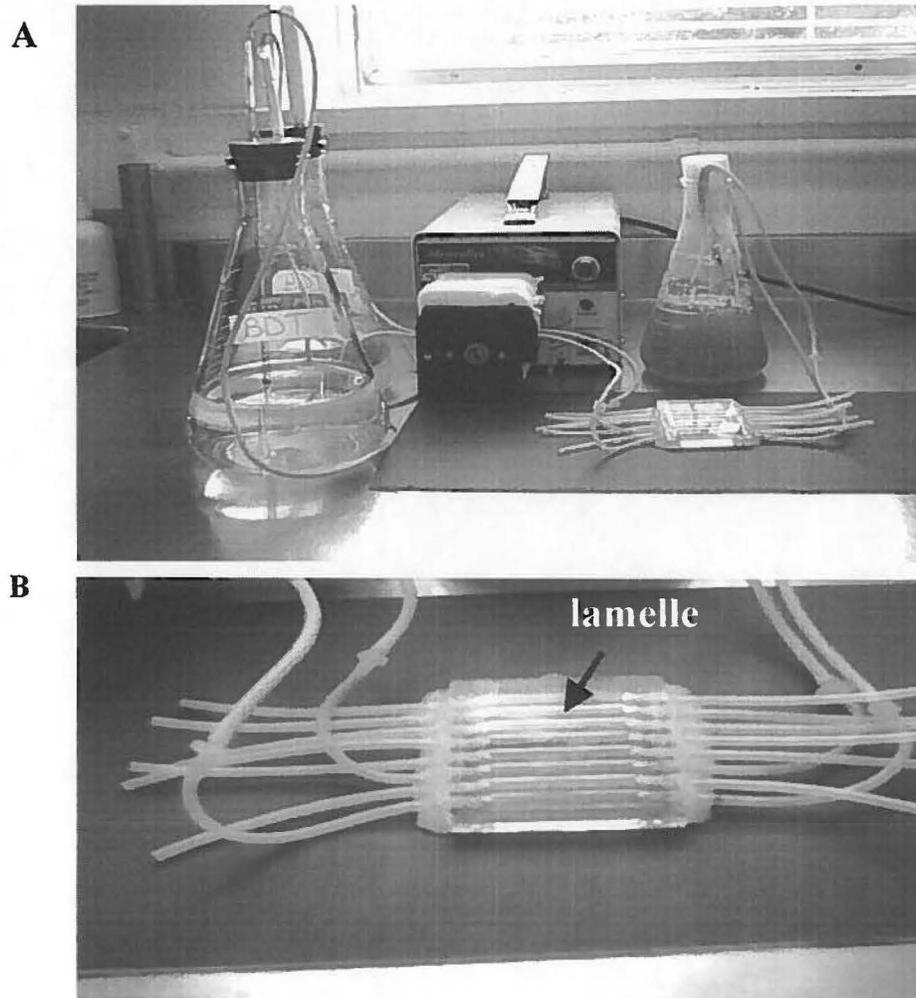


Figure 11 : Système à flux continu (A) et chambre à flux continu (B)

17.3 Hybridation *in situ* avec la sonde Cy3-Eub338

La méthode adoptée a été celle décrite par Christensen et *al.* (1999). Pour effectuer l'hybridation *in situ*, le biofilm a été noyé dans une solution de polyacrylamide 20 % afin de conserver sa structure tridimensionnelle et faciliter sa manipulation. Ensuite, le biofilm a été retiré de la chambre à flux continu en détachant la lamelle (Figure 11). Un bloc d'environ 5 mm² a été coupé d'une région représentative du biofilm. Le bloc a été déposé sur une lame possédant un puits de 1,5 mm. Le côté qui faisait face au substratum, c'est-à-dire la lamelle, a été placé vers le bas de façon à ce qu'il soit au fond de la lame. Précédant l'hybridation avec la sonde Cy3-Eub338, une solution de pré-hybridation (50 µl) a été ajoutée dans le puits jusqu'à recouvrir le bloc. Le tout a été incubé à 37° C pendant 30 minutes. Ensuite, la solution d'hybridation (50 µl) contenant la sonde Cy3-Eub338 (2,7 µg/ml final) a été ajoutée au bloc. Celui-ci a été placé dans une boîte hermétique, puis la boîte a été recouverte d'un papier d'aluminium. Le tout a été incubé à 37° C pendant 3 heures. Deux lavages ont été effectués pour se débarrasser de la sonde qui n'a pas hybridée. Le premier lavage a été effectué avec la solution de pré-hybridation (50 µl) pendant 30 minutes à 37° C. Le deuxième lavage a été effectué avec la solution de lavage (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, NaCl (Fisher Scientific 0,9 M) (50 µl) pendant 30 minutes à 37° C. Finalement, pour éviter la précipitation de sel, le bloc a été rincé deux fois avec 50 µl d'eau déminéralisée à la température de la pièce. À cette étape, les biofilms étaient prêts pour être visualisés au microscope confocal ou à épifluorescence. Afin de s'assurer de la spécificité de la sonde Eub338, la sonde Non (5' CGA CGG AGG GCA TCC TCA 3'), une sonde non spécifique à aucune séquence 16S ribosomal a été utilisée en parallèle comme témoin négatif.

18. Microscope confocal à balayage au laser

Le bloc de gel dans lequel le biofilm baignait a été placé sur une lame possédant un puits de 1,5 mm de profondeur, puis recouvert d'une lamelle dont les contours ont été scellés avec un ruban adhésif afin de s'assurer que la lamelle avait bien adhéré au bloc. Les biofilms ont été visualisés au microscope (Likon eclips E-800) confocal à balayage au laser (BioRad Radiance 2000) avec les objectifs 20×, 40× et 60× à immersion à l'huile. Les biofilms ont été balayés dans les axes XYZ où XY représente le plan focal tandis que XZ la profondeur. Plus précisément, le laser effectuait des balayages successives du plan XY en se dirigeant vers l'axe Z (Figure 12). Les différents plans focaux (ou images) accumulés ont été digitalisés et enregistrés dans l'ordinateur accompagnant le microscope confocal (BioRad, Californie) sous format spécifique à la compagnie BioRad. La visualisation des images a été faite avec le logiciel Laser Sharp (BioRad). Ce logiciel a permis l'exportation des images sous les formats suivants : TIF, PIB, JIF, JPEG, BITMAP et PCX. Pour l'analyse des images, celles-ci ont été exportées sous format JPEG ou BITMAP dans le logiciel Photo Paint (Corel Draw) version 8,0.

L'épaisseur de chaque biofilm a été calculé en multipliant le nombre de sections balayées par l'épaisseur des sections. À titre d'exemple, l'objectif 60× balaye l'échantillon à tous les 0,5 μm . Si le balayage du biofilm depuis la surface jusqu'au substratum donne 30 sections, l'épaisseur du biofilm sera de 15 μm . Pour chaque échantillon, deux à trois lectures ont été effectués. L'épaisseur de chaque biofilm a été déterminé à partir de la moyenne de ces lectures.

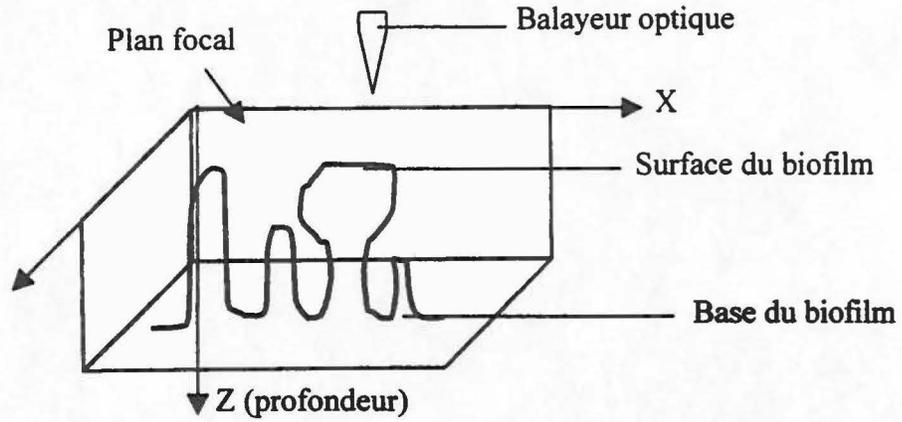


Figure 12 : Schéma illustrant le balayage optique d'un biofilm. Le balayage se fait dans les axes XYZ. Donc, le biofilm est balayé depuis la surface jusqu'à la base ou vice versa. Ce type de balayage permet de connaître la topographie du biofilm et son épaisseur.

Résultats

1. Introduction du gène codant pour la protéine fluorescente verte dans la souche *P. aeruginosa* 57RP

Éric Déziel (1996a), étudiant au doctorat dans le laboratoire de Richard Villemur, a étudié deux souches de *P. aeruginosa*. Ces deux souches étaient la souche 57RP et la souche 57RP-98. La souche 57RP a été isolée à partir d'un sol contaminé pour sa capacité à produire des biosurfactants de type rhamnolipides lorsque cultivée sur des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) de deux à trois cycles aromatiques. La souche 57RP-98 origine de la souche 57RP dans laquelle le gène *rhlA* a été inactivé par mutagenèse insertionnelle (Travaux de R. Villemur et É. Déziel), empêchant ainsi l'expression des gènes *rhlAB* responsables de la synthèse des rhamnolipides (Ochsner et al., 1995c). Le gène *rhlA* code pour la rhamnosyltransférase 1 (Travaux de R. Villemur et É. Déziel). Comme sa souche mère, la souche mutante dégrade les HAP de faible poids moléculaire et forme un biofilm. Ces deux souches ont servi de modèles d'étude pour comprendre le rôle physiologique des rhamnolipides qui est encore mal connu. L'une des hypothèses émises est que la souche 57RP produit des rhamnolipides pour favoriser son détachement et sa dispersion lorsqu'elle est dans un biofilm. Ainsi, ces deux souches ont été utilisées dans cette étude pour vérifier l'effet des rhamnolipides sur la dispersion des cellules dans un biofilm. Pour ce faire, le gène codant pour la GFP a été introduit dans le chromosome de la souche 57RP. La GFP a été choisie parce qu'elle a permis de suivre les cellules individuellement et en temps réel à l'intérieur d'un biofilm. De plus, le signal de la GFP a pu être détectée à l'aide d'instruments tel le microscope à épifluorescence ou confocal.

Dans notre laboratoire, nous disposions du gène *gfpmut3* codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur pLac. Celui-ci provient du laboratoire du Dr. S. Molin (Université Technique du Danemark) (Figure 13). Ce gène a été cloné dans le vecteur pUT-mini-Tn5. Le vecteur pUT-mini-Tn5 possède une origine de répllication dépendante de la protéine π et se maintient donc seulement lorsque cette protéine est présente. Il possède

également l'origine de transfert *oriT*, le gène *tnp* qui code pour la transposase et le gène de résistance à l'ampicilline. L'*oriT* permet le transfert du plasmide par conjugaison de *E. coli* vers *P. aeruginosa*. Le gène *tnp* code pour la transposase, une enzyme responsable de la transposition des séquences bordées des sites I et O (Figure 14).

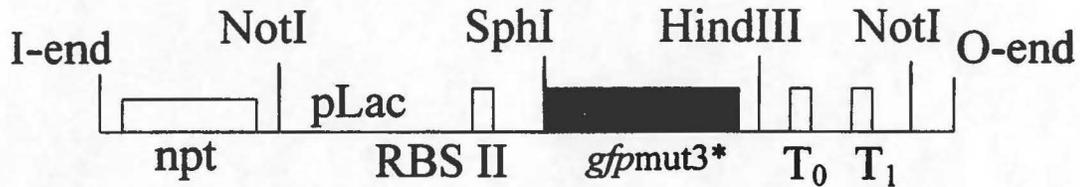


Figure 13 : Cassette de GFP constituée des éléments du transposon mini-Tn5, le promoteur pLac et le gène codant pour la GFP stable. La cassette GFP renferme un gène de résistance à la kanamycine (*npt*) permettant la sélection des transconjugants. La cassette possède aussi de multiples sites de restrictions, un site de liaison au ribosome (RBS II) et les limites du transposon T₀ et T₁.

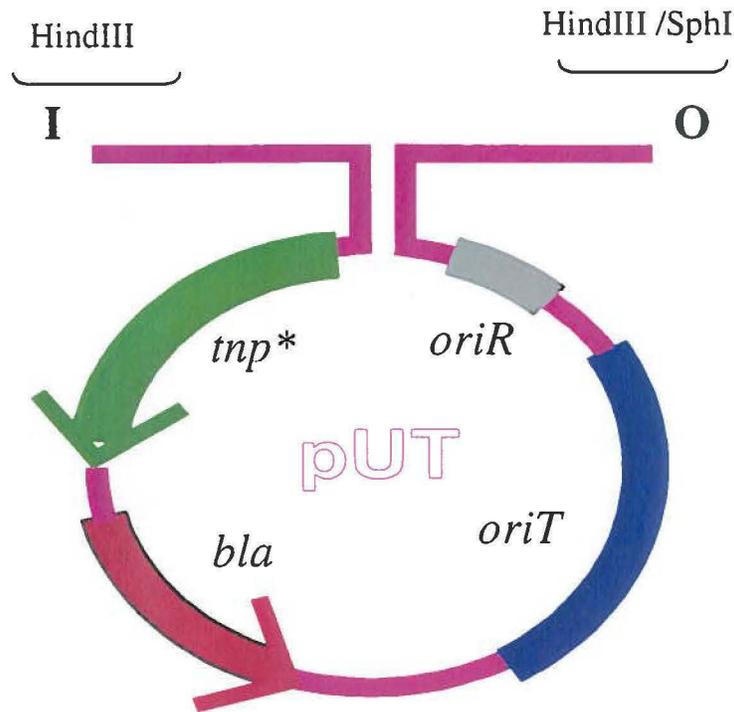


Figure 14 : Vecteur pUT mini-Tn5. Le vecteur contient l'origine de réplication (*oriR*), l'origine de transfert (*oriT*), le gène de résistance à l'ampicilline (*bla*) et le gène *tnp* codant pour la transposase. Le vecteur pUT-mini-Tn5 est appelé vecteur suicide, parce qu'il est incapable de se répliquer à l'intérieur de *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* ne code pas pour la protéine π .

Pour introduire le gène *gfp* dans *P. aeruginosa* 57RP, nous avons procédé par différentes étapes. La première a été la transformation du plasmide dans la souche *E. coli* S17-1 λ pir. Cette souche a été utilisée parce qu'elle possédait le phage λ pir qui code pour la protéine π ainsi que les éléments nécessaires pour le transfert du plasmide dans *P. aeruginosa*. Les transformants, ayant acquis le plasmide, ont été sélectionnés sur un milieu riche contenant de l'ampicilline et de la kanamycine. Les transformants qui ont exprimé la GFP lorsque examinés au microscope à épifluorescence ont été retenus. L'étape suivante a consisté de conjuguer *E. coli* et *P. aeruginosa* 57RP. Le protocole de

conjugaison adopté a impliqué la croissance de la souche 57RP à 43° C au lieu de 37° C afin d'affaiblir son système de restriction et la rendre plus apte à accepter de l'ADN étranger (Holloway, 1998). Les transconjugants obtenus ont été sélectionnés sur un milieu favorisant la croissance de *P. aeruginosa*. Ce milieu contenait de la kanamycine et du cétrimide (CTAB). Le CTAB a permis de contre sélectionner *E. coli*. Seuls les transconjugants qui exprimaient la GFP ont été retenus (Figure 15).

2. Vérification de la production de biosurfactants et de la dégradation de substrats hydrophobes par les transconjugants ayant acquis le gène *gfp*

Afin de vérifier que le gène *gfp* ne s'était pas inséré dans l'un des gènes essentiels chez *P. aeruginosa*, des tests portant sur la courbe de croissance, la production de biosurfactants et la dégradation de substrats hydrophobes ont été effectués. Dans le test de dégradation, les transconjugants ont étéensemencés sur des géloses contenant du milieu minimum enrichie avec 0,05% d'extrait de levure (milieu BH-Y). L'ensemencement a été effectué en duplicata pour chaque clone. Une série de géloses a été vaporisée avec du phénanthrène tandis que l'autre série avec du naphthalène. Après 24 heures d'incubation à 26° C, les bactéries dégradant le phénanthrène et le naphthalène ont formé des auréoles claires autour des colonies. La formation d'auréoles claires a indiquée la présence d'une activité de dégradation. Tous les transconjugants testés ont dégradé le phénanthrène et le naphthalène (Tableau 3).

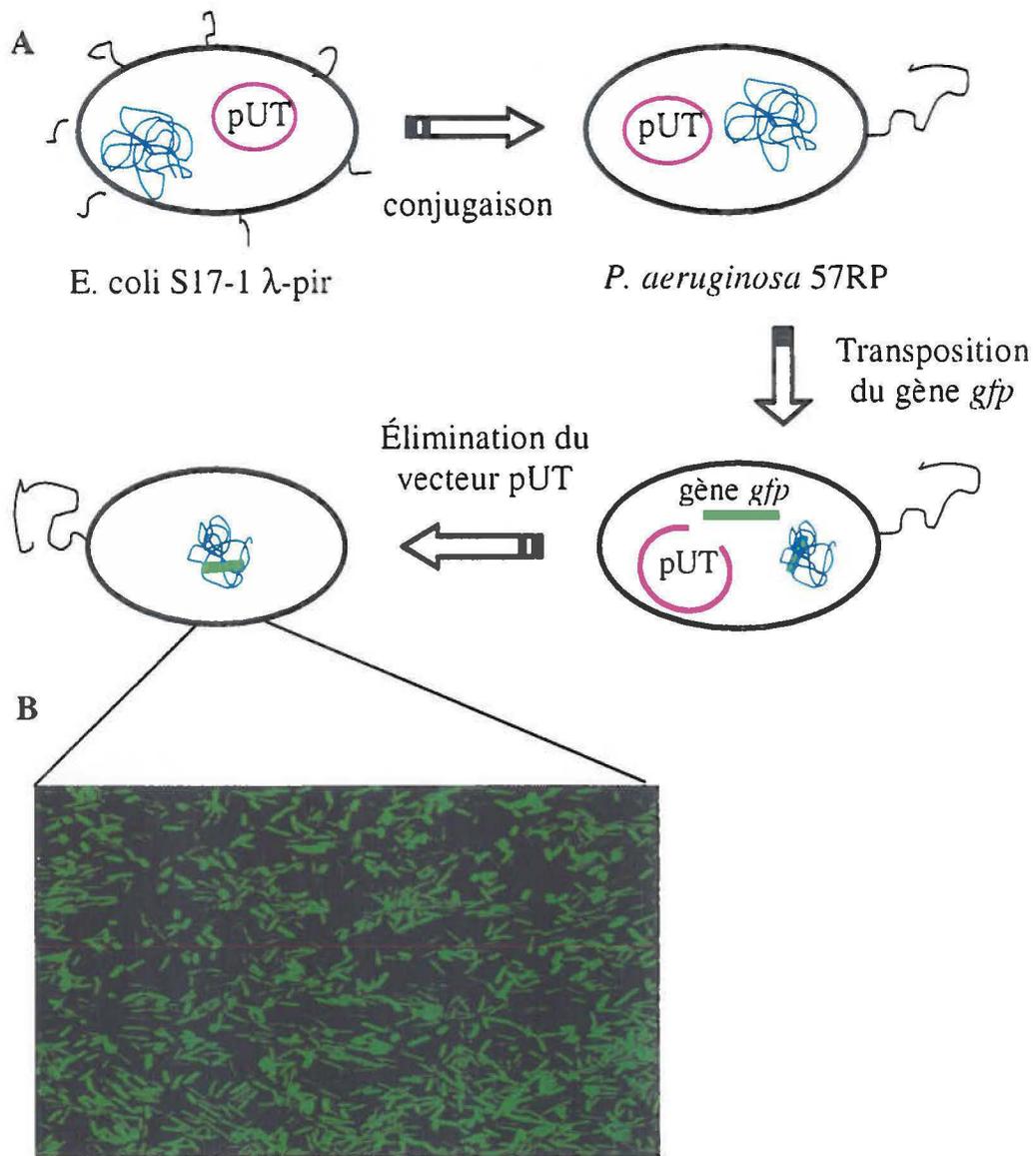


Figure 15 : A) Conjugaison du vecteur pUT-mini Tn5/GFP de la souche *E. coli* S17-1 λ-pir à *P. aeruginosa* 57RP et B) Expression de la GFP chez les transconjugants de *P. aeruginosa*. Le gène *gfp* s'était transposée au hasard dans le chromosome de la souche 57RP grâce à la transposase. L'image (B) montre des cellules de la souche 57RP exprimant la GFP. Les cellules ont été visualisées au microscope à épifluorescence à un grossissement de 600x.

Dans le test de production de biosurfactants, les transconjugants ont été inoculés dans un milieu minimum liquide enrichie de 0,01 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (milieu SW_f). Ce milieu a stimulé la production de biosurfactants. La production de biosurfactants a été déterminée par la formation d'une mousse abondante. Sur les neuf transconjugants testés, seulement PM8 et PM17 ne produisaient pas de biosurfactants. Pour valider la présence de biosurfactants, les transconjugants ont été réensemencés sur des géloses Siegmund-Wagner (SW). Ce test est plus sensible et semi-quantitatif. La détection de la production de biosurfactants a été faite par l'observation d'une auréole bleu foncé autour des colonies productrices. Le résultat a confirmé la production de biosurfactants pour les souches PM1, PM2, PM10, PM12, PM15, PM18 et PM19. De plus, le test a révélé que les souches PM8 et PM17 ont produit aussi du biosurfactants mais en faible quantité (Tableau 3).

Finalement, la croissance des transconjugants a été comparée avec la souche originale. La courbe de croissance a été tracée en mesurant la D.O._{600 nm} des cultures de cellules à toutes les deux heures. Les résultats ont montré que les souches PM1, PM10, PM18 et PM19 avaient une meilleure croissance que la souche 57RP, la souche PM15 une croissance similaire à 57RP tandis que les clones PM2, PM8, PM12 et PM 17 avaient une croissance plus lente (Figure 16). Nous avons choisi la souche PM18 pour les expériences subséquentes.

Tableau 3 : Caractérisation des transconjugants ayant acquis le gène *gfp*

Tests	Transconjugants marqués avec <i>gfp</i>									
	57RP	PM1	PM2	PM8	PM10	PM12	PM15	PM17	PM18	PM19
Dégradation du :										
Naphtalène	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phénanthrène	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de biosurfactants en milieu SW _f	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Production de biosurfactants sur géloses bleues SW	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+
Taux de croissance comparé à la souche 57RP en milieu LB	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+
Fluorescence ($\lambda = 488 \text{ nm}$)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

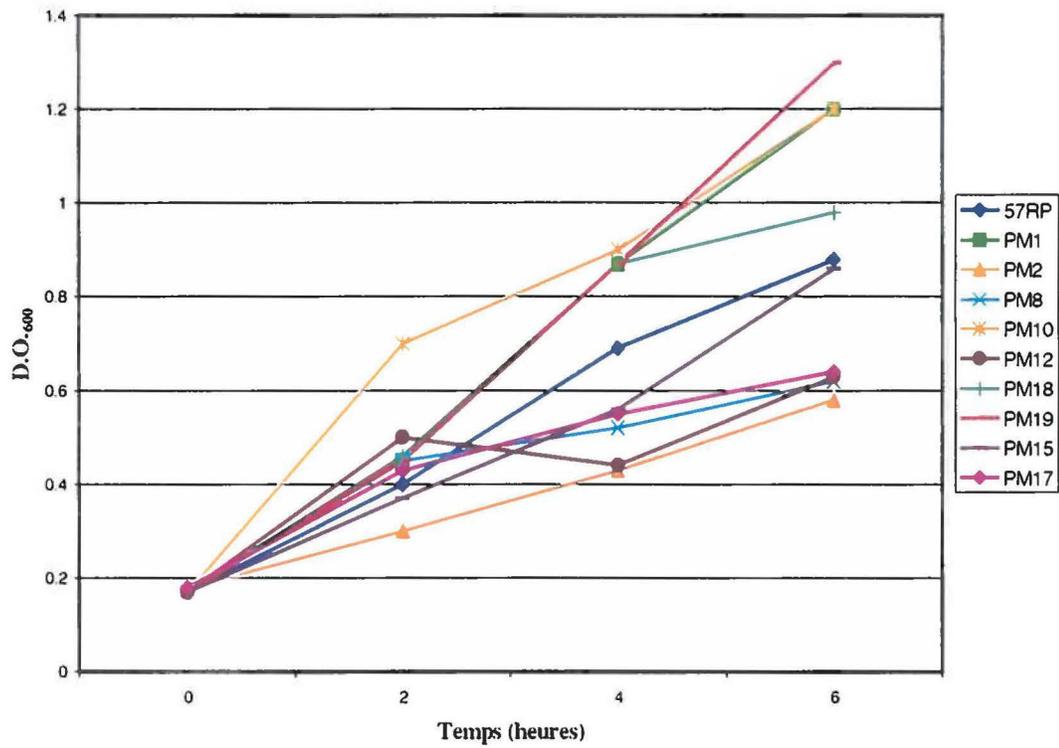


Figure 16 : Courbe de croissance des neuf transconjugants ayant acquis le gène *gfp* et de la souche 57RP. Seuls les clones PM1, PM10, PM15, PM18 et PM19 avaient une croissance similaire ou supérieure à la souche 57RP.

3. Comparaison de la densité cellulaire entre la souche PM18 et la souche 57RP-98 dans les milieux BDT et Swarm

Les souches *P. aeruginosa* PM18 (57RP + GFP) et 57RP-98 (mutante *rhlA*⁻) forment toutes les deux un biofilm sur du polystyrène. Afin de vérifier si les rhamnolipides ont un effet sur le dispersément du biofilm, la biomasse formée par chacune des souches a été quantifiée en colorant les cellules avec du cristal violet. Comme le cristal violet colore seulement les cellules, la mesure de la densité optique du colorant représentait une façon indirecte de quantifier la biomasse adhérente au tube de polystyrène. Les deux souches ont été cultivées en présence du milieu BDT (0,2% glucose, 0,5% triptone) et du milieu Swarm (0,5% glucose, 0,5% peptone) qui favorise la sécrétion des rhamnolipides dans le milieu.

À la figure 17, la quantification des cellules attachées sur les parois des tubes en polystyrènes cultivées en milieu BDT a montré la formation d'un biofilm avec une plus faible biomasse pour la souche PM18 comparativement à la souche 57RP-98. Jusqu'au temps 240 h, la biomasse formée par 57RP-98 était supérieure à celle de PM18. Cependant, d'après l'écart type, la différence dans la quantité de biomasse était non significative. Toutefois, à partir du temps 264 h, la différence dans la quantité de biomasse formée par les souches PM18 et 57RP-98 semblait plus significative. Avec le milieu Swarm, la biomasse formée par la souche 57RP-98 était elle aussi supérieure à celle formée par la souche PM18, mais à partir du temps 144 h (Figure 18).

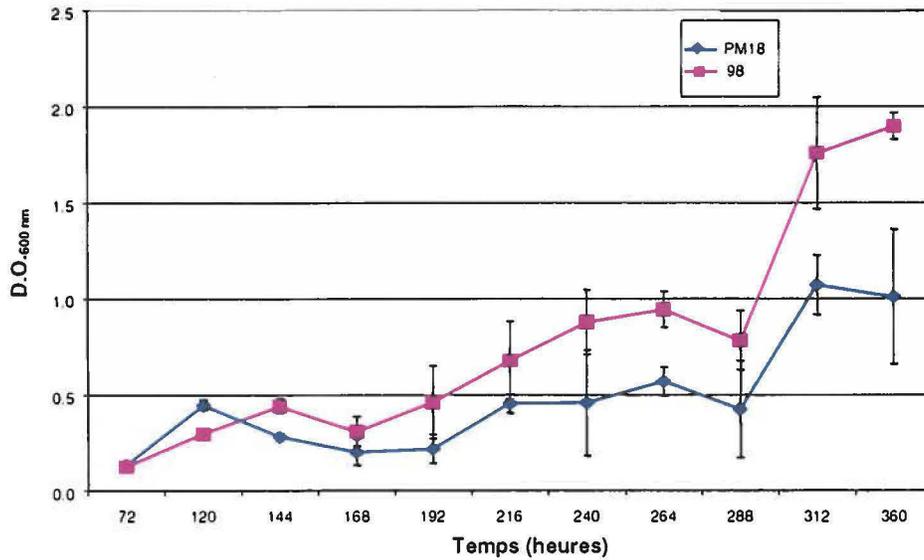


Figure 17 : Quantification de la biomasse formée par les souches PM18 et 57RP-98 en fonction du temps. Les deux souches ont été cultivées dans des tubes en polystyrènes avec du milieu BDT. Première lecture au temps 72 h.

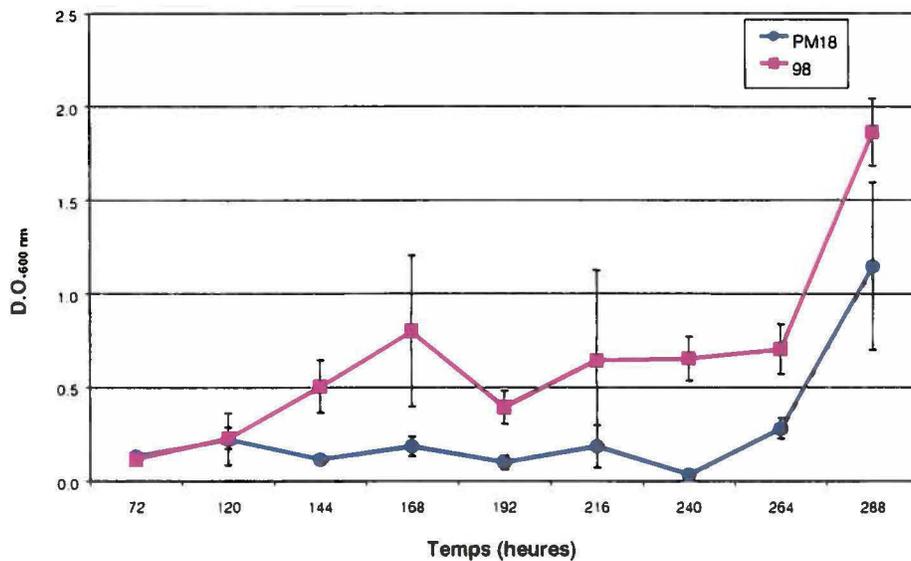


Figure 18 : Quantification de la biomasse formée par les souches PM18 et 57RP-98 en fonction du temps. Les deux souches ont été cultivées dans des tubes en polystyrènes avec du milieu Swarm. Première lecture au temps 72 h.

4. Effet de l'ajout de rhamnolipides sur le dispersement de la biomasse formée par la souche PM18 et celle formée par la souche 57RP-98

Les souches PM18 et 57RP-98 ont été cultivées indépendamment dans du milieu BDT pendant 192 h à 30° C, afin de permettre aux cellules de former une biomasse sur la paroi du tube en polystyrène. Après la formation d'une biomasse, une solution de rhamnolipides de 0,1% (v/v) a été ajoutée aux cellules adhérentes. Les cellules ont été ensuite incubées à 4° C pendant 4 h sous agitation afin que la solution de rhamnolipides agissent sur eux. L'expérience a été effectuée en quadruplicata. Pour chaque souche, quatre tubes ont été réservés comme tubes contrôles où ils n'ont pas subi de traitement avec la solution de rhamnolipides. Les quatre autres tubes ont été, eux, traités avec la solution de rhamnolipides. Après la durée du traitement, les tubes ont été rincés à l'eau et la D.O._{600 nm} a été mesurée après coloration des cellules avec le cristal violet. Une moyenne des lectures de la densité optique a été effectuée pour chaque lot.

Le graphique 19 montre que la solution de rhamnolipides n'a eu aucun effet sur la biomasse du biofilm formé par la souche PM18. Par contre, l'ajout de rhamnolipides a eu un effet sur la biomasse du biofilm formé par la souche 57RP-98. En effet, une diminution significative de 25 % a été observée avec le biofilm traité avec la solution de rhamnolipides.

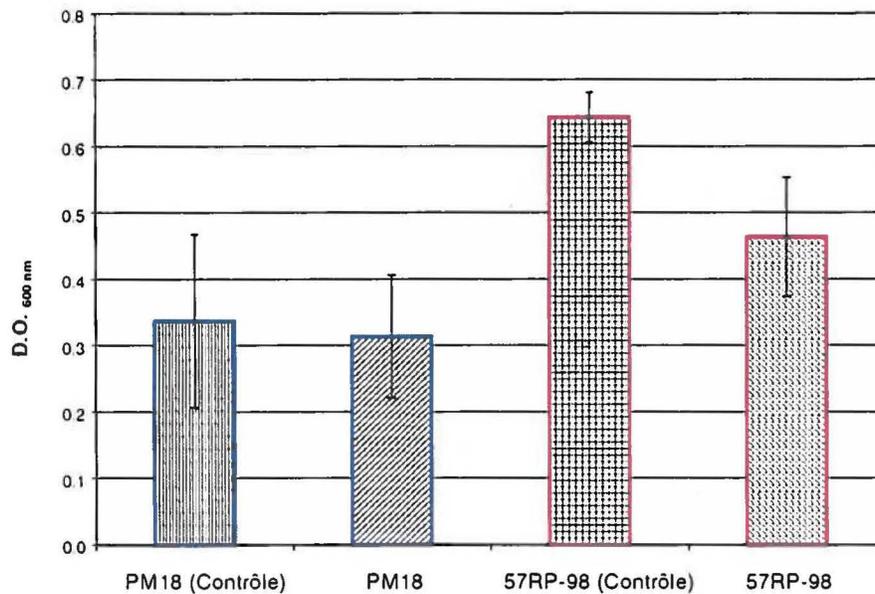


Figure 19 : Effet de l'ajout d'une solution de rhamnolipides de 0,1% sur la biomasse formée par les souches *P. aeruginosa* PM18 et 57RP-98 en milieu BDT.

5. Culture en cuvée de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98 en milieu BDT et Swarm pendant 288 heures

Nous avons observé que les rhamnolipides avaient un effet sur la quantité de biomasse du biofilm formé par *P. aeruginosa* 57RP. Le but des expériences subséquentes a été d'observer l'architecture des biofilms formés par PM18 et 57RP-98 en culture en cuvée et voir l'effet des rhamnolipides sur le dispersément des cellules. La culture en cuvée a consisté à cultiver les souches dans des tubes coniques de 50 ml auxquels une lame en polystyrène servant de substratum a été insérée. Les deux souches ont été cultivées séparément et ensemble pendant 12 jours à 30° C. Les milieux BDT et Swarm ont été utilisés.

Les biofilms ont été examinés au microscope confocal à un grossissement de 400x. Ceux-ci ont été balayés successivement dans le plan XY en se dirigeant à tous les 1 μm vers l'axe Z. Le biofilm a été balayé depuis la surface jusqu'au substratum (Figure 20). Pour fin de représentation, seulement quelques coupes représentatif du biofilm ont été illustrées (base, milieu et surface du biofilm). L'examen des biofilms de PM18 fut rendu possible grâce à la GFP. Cependant, l'introduction du gène *gfp* dans la souche 57RP-98 s'est avérée infructueuse. Pour pallier à cette problématique, la souche 57RP-98 a été révélée grâce à l'hybridation *in situ* du biofilm avec une sonde universelle hybridant aux ARN 16S ribosomiaux (Eub338) et marquée avec le fluorochrome Cy3. Le fluorochrome Cy3 absorbe à 550 nm et émet à 565 nm. La GFP, quant à elle, absorbe à 480 nm et émet à 515 nm. Le microscope confocal a balayé les biofilms dans le rouge ($\lambda_{\text{excitation}} = 514 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 550 \text{ nm}$) puis dans le vert ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 515 \text{ nm}$). Ainsi, les cellules de PM18 sont apparues dans la fenêtre où le biofilm a été balayé dans le vert alors que celles de 57RP-98 sont apparues dans la fenêtre où le biofilm a été balayé dans le rouge. Cependant, la sonde Cy3-Eub338 a aussi pénétré dans la souche PM18. Pour distinguer les cellules de PM18 des cellules de 57RP-98 à l'intérieur d'un biofilm où les deux étaient présentes, l'image du biofilm balayé dans le vert a été superposée avec celle du biofilm balayé dans le rouge. Dans l'image résultante, les cellules de 57RP-98 ont été colorées rouges alors que celles de PM18 ont été colorées jaunes (Figure 21). Dans certains cas, les images ont été transformées en gris à l'aide du logiciel de la compagnie BioRad; c'est-à-dire que la couleur originelle (rouge ou verte) des cellules a été remplacée par une autre artificielle (gris).

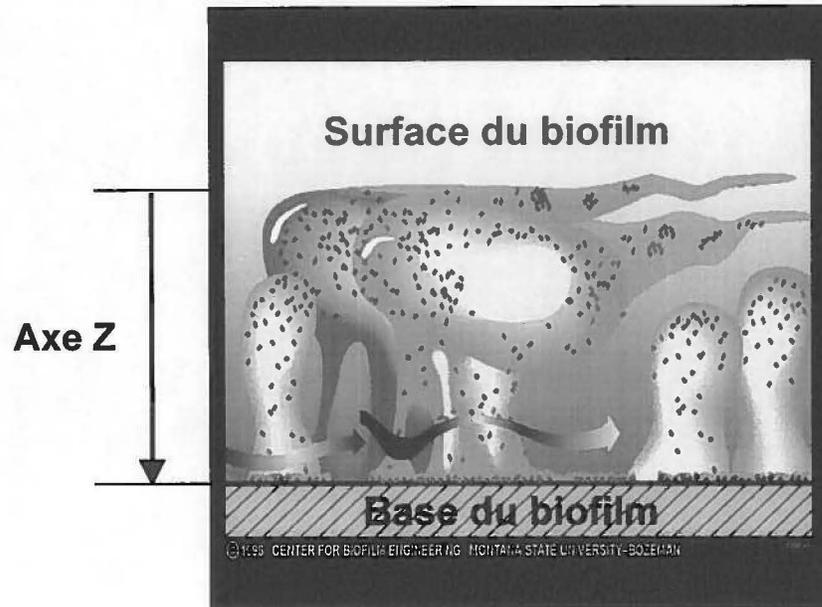
L'épaisseur du biofilm formé par PM18 en milieu Swarm était de $16,5 \pm 13,5 \mu\text{m}$. La distribution des cellules, à l'intérieur du biofilm, a semblé hétérogène et la zone de la plus haute densité cellulaire était localisée près de la base (Figure 22). Sur le plan XZ (Figure 23A), nous avons observé des macro-colonies localisées à différents endroits. Lorsque la souche PM18 a été cultivée en milieu BDT, l'épaisseur du biofilm était de $82 \pm 34 \mu\text{m}$ selon les régions (Figure 22). Le biofilm avait une structure hétérogène et nous avons pu observer la présence de canaux (Figures 23B). La zone de la plus haute densité

cellulaire a été trouvée près du substratum. Le biofilm était plus compact à la base et devenait plus diffus près de la surface.

La figure 24 illustre quelques coupes représentatives du biofilm formé par la souche 57RP-98 en milieu Swarm et BDT. En milieu Swarm, les coupes ont été prises à 4, 7, 9 et 11 μm respectivement de la surface du biofilm. L'épaisseur du biofilm était de $13 \pm 9,6 \mu\text{m}$. L'épaisseur du biofilm de 57RP-98 était égal à celui de PM18 en milieu Swarm. Le sectionnement horizontal (XY) a montré que la zone de la plus haute densité cellulaire se trouvait près du substratum. Dans la coupe sagittale (XZ), la distribution des cellules était hétérogène à l'intérieur du biofilm (Figure 25A). Dans le cas où la souche 57RP-98 a été cultivée en milieu BDT, l'épaisseur du biofilm était de $10 \pm 8,6 \mu\text{m}$. Les images AII, BII, CII et DII (Figure 24) ont été prises à 1, 3, 5 et 7 μm respectivement de la surface du biofilm. Le sectionnement horizontal (XY) a montré que les cellules étaient plus denses près de la surface d'attachement (substratum). De plus, le biofilm était plus compact à la base et devenait plus diffus près de la surface. Sur le plan XZ, nous avons observé des amas de cellules distribués de façon uniforme à la surface (Figure 25B).

Nous avons cultivé les souches PM18 et 57RP-98 ensemble dans le milieu Swarm et BDT. Dans le cas du milieu Swarm, l'épaisseur du biofilm variait de 7 à 24 μm selon les régions. Les coupes horizontales balayées dans le plan focal XY, c'est-à-dire les images AI, BI, CI et DI ont été prises respectivement à 4, 10, 13 et 16 μm de la surface du biofilm (Figure 26). La zone de la plus haute densité cellulaire se situait près de la base. Les cellules des deux souches étaient distribuées de façon égale dans le biofilm. La coupe sagittale (XZ) (Figure 27A) a montré que les cellules ont formé des macro-colonies à différents endroits. De plus, la coupe sagittale a montré la présence de plusieurs canaux et des espaces vides dans le biofilm. Lorsque cultivées en milieu BDT, l'épaisseur du biofilm a varié de 10 à 24 μm . Les coupes horizontales AII, BII, CII et DII ont été prises respectivement à 1, 3, 6 et 8 μm de la surface du biofilm (Figure 26). La densité de cellules a semblé égale pour les deux souches. La plus grande densité

cellulaire a été localisée proche du substratum. La coupe sagittale a montré une distribution d'amas de cellules à différents endroits (Figure 27B).



Adaptée du CBE (Center for biofilm engineering, Montana, É.U.)

Figure 20 : Schéma d'un biofilm. Les biofilms sont hétérogènes. La croissance des cellules se fait sur le plan horizontal et vertical. La base du biofilm réfère à la surface d'attachement du biofilm, c'est-à-dire le substratum sur lequel le biofilm s'est développé. Le balayage du biofilm a été effectué dans les axes XYZ. Dans le sens axial (Z), le balayage a été effectué à tous les 0,5 - 2 μm . Les cellules ont été visualisées avec un grossissement allant de 200x à 600x. Le champ observé était de dimension de 198 x 198 μm .

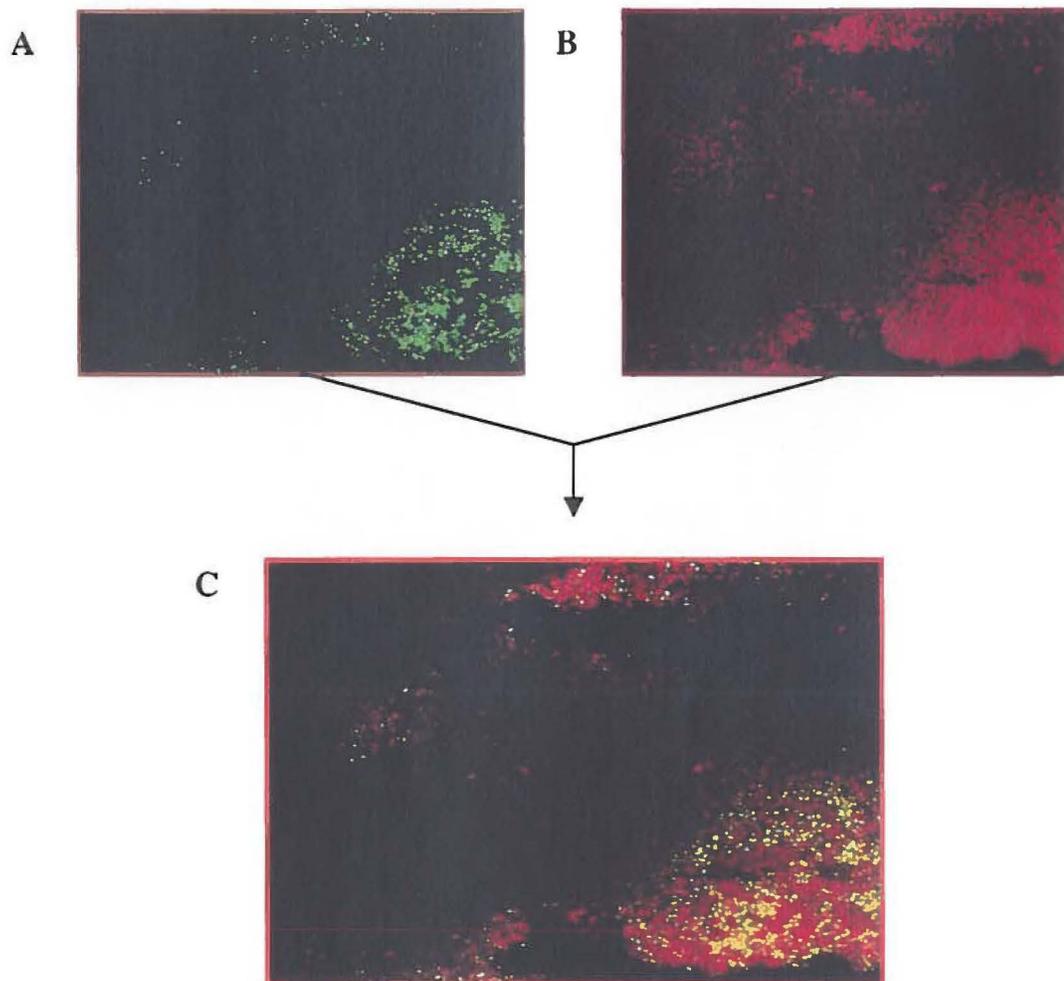
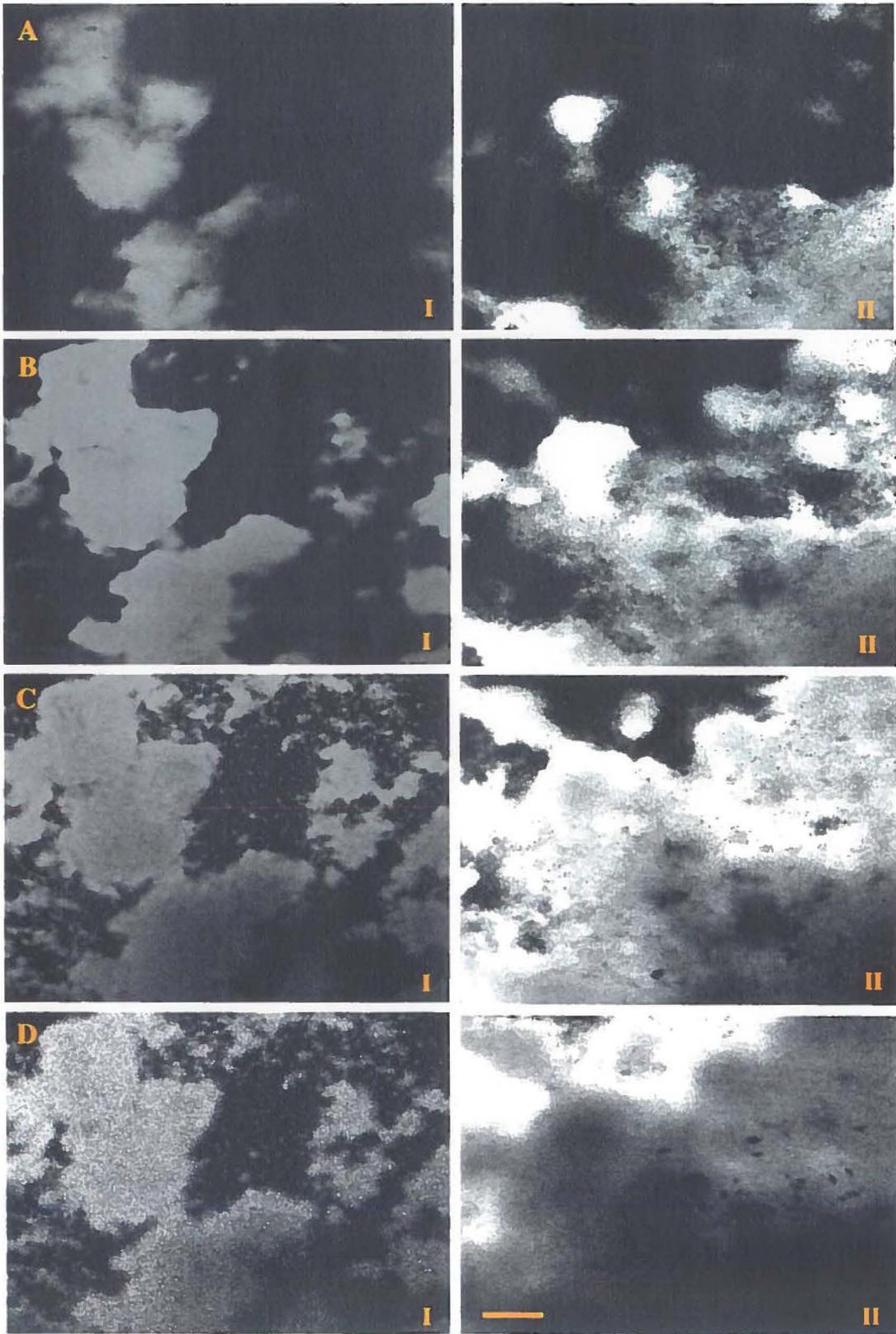


Figure 21 : Superposition des images du biofilm balayé dans le vert et dans le rouge. L'image (A) dont les cellules ont été balayées en vert (PM18) a été superposée sur l'image (B) où les cellules ont été balayées en rouge (57RP-98). L'image résultante (C) a permis de distinguer la souche PM18 colorée en jaune de la souche 57RP-98 colorée en rouge. À quelques reprises, les cellules de PM18 ont été colorées en jaunes tandis que les cellules de 57RP-98 ont été colorées en bleues. La superposition des images a fait paraître les cellules de PM18 de couleur violet pâle.

Figure 22 : Coupes horizontales (XY) des biofilms de la souche PM18 en milieu Swarm (I) et en milieu BDT (II)

Le biofilm cultivé en milieu Swarm avait une épaisseur moyenne de $16 \pm 13,5 \mu\text{m}$ et donc, plusieurs coupes ont été obtenues. Pour fin de représentation, seulement quelques coupes représentatives du biofilm sont illustrées. Ces coupes sont AI, BI, CI et DI et elles ont été prises à 1, 4, 9 et 15 μm respectivement de la surface du biofilm. Ces coupes représentent des plans focaux (XY) à différentes profondeurs (XZ) du biofilm. Le biofilm cultivé en milieu BDT avait une épaisseur moyenne de $82 \pm 34 \mu\text{m}$. Les coupes horizontales (XY) AII, BII, CII et DII ont été prises respectivement à 20, 32, 46 et 70 μm de la surface du biofilm. Les cellules ont été transformées en gris. Grossissement égale à 400x. Bar = 5 μm .



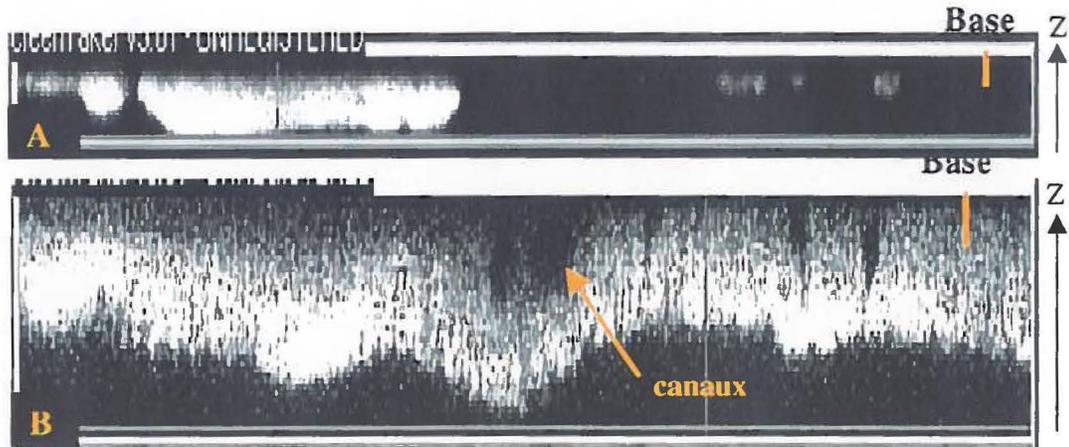
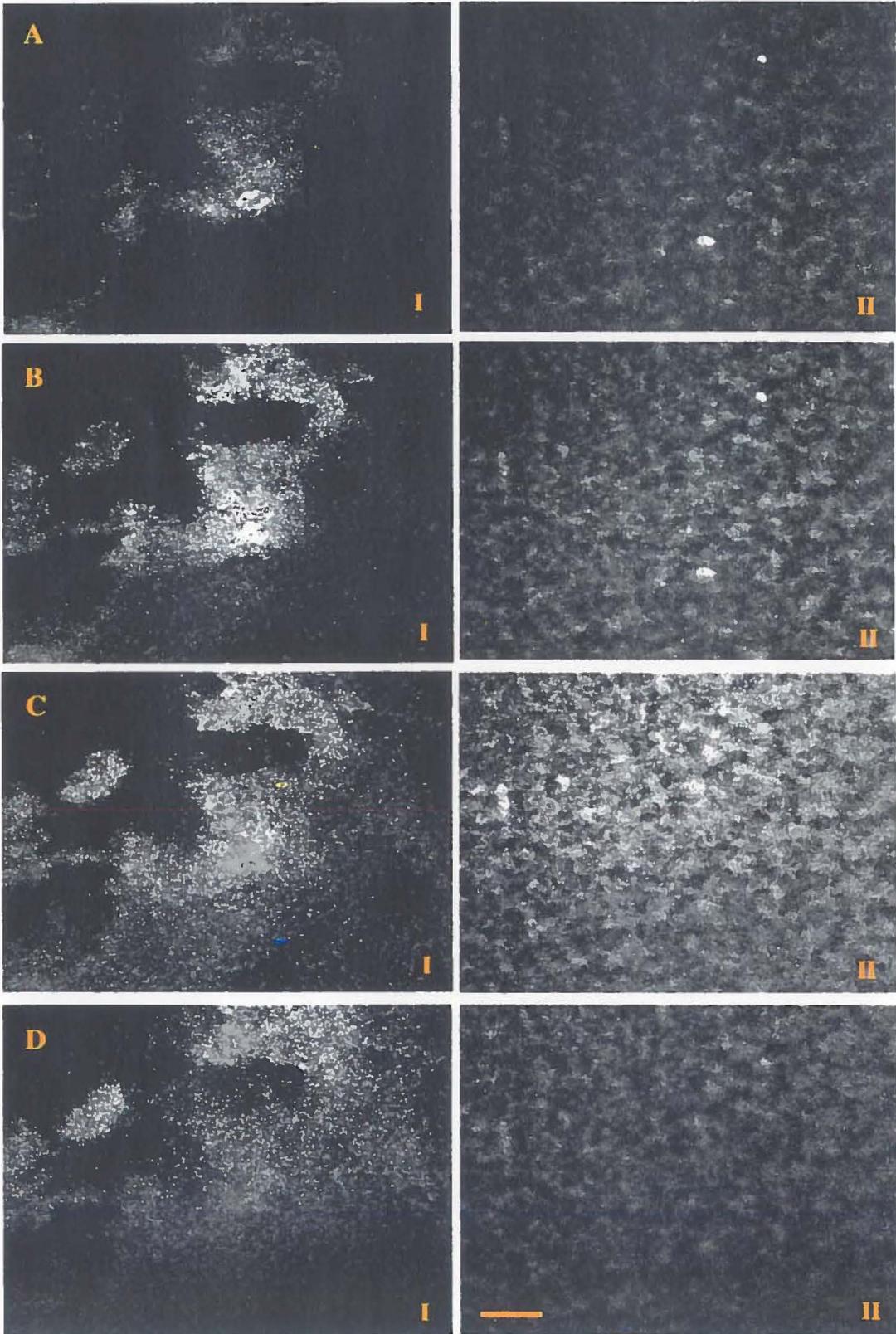


Figure 23 : Coupe sagittal (XZ) du biofilm de PM18 en A) milieu Swarm et B) en milieu BDT. Les images A et B regroupe chacune toutes les coupes successives du biofilm balayé dans l'axe XZ. Ainsi, leurs hauteurs est proportionnelle à l'épaisseur du biofilm. Les cellules ont été transformées en gris à l'aide du logiciel de BioRad. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 15 μm .

Figure 24 : Coupes horizontales (XY) des biofilms de 57RP-98 en milieu Swarm (I) et en milieu BDT (II)

Le biofilm cultivé en milieu Swarm avait une épaisseur moyenne de $13 \pm 9,6 \mu\text{m}$ alors que celui en milieu BDT avait une épaisseur moyenne de $10 \pm 8,6 \mu\text{m}$. Plusieurs coupes ont été obtenues puisque le biofilm a été balayé en entier. Seulement quelques coupes représentatives du biofilm sont illustrées. Les coupes AI, BI, CI et DI représentent des plans focaux (XY) à différentes profondeurs (XZ) du biofilm. Elles ont été prises respectivement à 4, 7, 9 et 11 μm de la surface du biofilm. Les coupes AII, BII, CII et DII représentent aussi des plans focaux (XY) prises à différentes profondeurs (XZ) du biofilm, c'est-à-dire à 1, 3, 5 et 7 μm respectivement de la surface du biofilm. Les cellules ont été transformées en gris à l'aide du logiciel de BioRad. Grossissement égale à 400x. Bar = 5 μm .



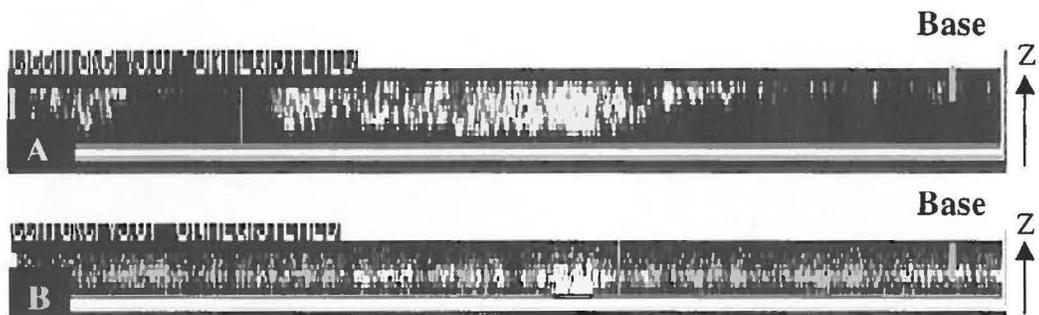
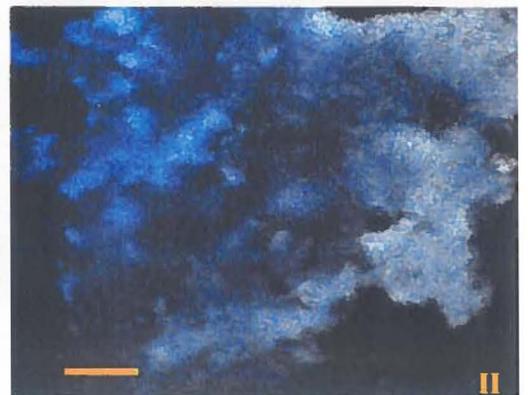
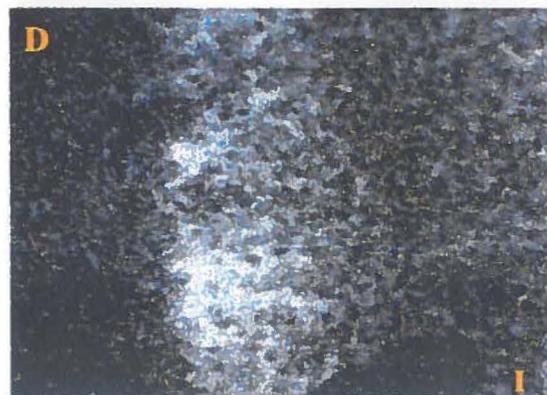
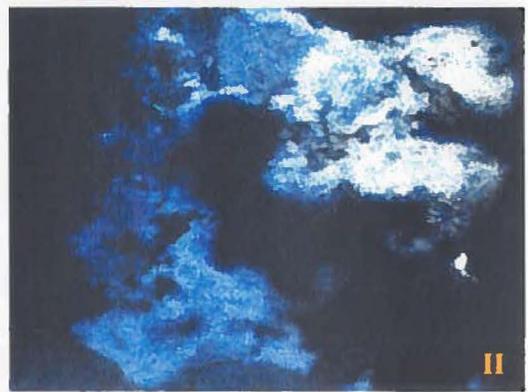
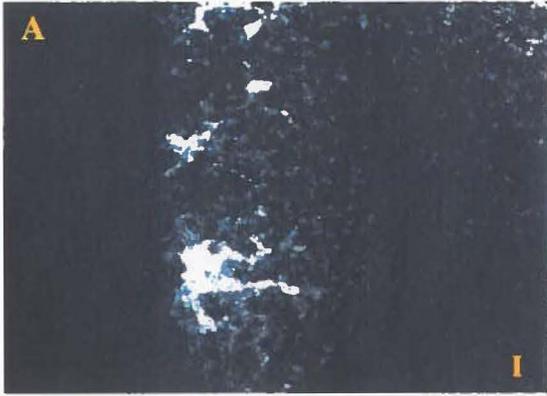


Figure 25 : Sectionnement sagittal (XZ) du biofilm de 57RP-98 en A) milieu Swarm et B) en milieu BDT. Les images A et B regroupe chacune toutes les coupes successives du biofilm balayé dans l'axe XZ. Ainsi, leurs hauteurs est proportionnelle à l'épaisseur du biofilm. Les cellules ont été transformées en gris à l'aide du logiciel de BioRad. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 15 μ m.

Figure 26 : Coupes horizontales (XY) des biofilms composés des souches PM18 et 57RP-98 en milieu Swarm (I) et en milieu BDT (II).

Le biofilm cultivé en milieu Swarm avait une épaisseur moyenne de $18 \pm 9,5 \mu\text{m}$. Celui cultivé en milieu BDT avait une épaisseur moyenne de $10 \pm 8 \mu\text{m}$. Plusieurs coupes ont été obtenues puisque le biofilm a été balayé en entier. Seulement quelques coupes représentatives du biofilm sont illustrées. Les coupes AI, BI, CI et DI représentent des plans focaux (XY) prises à différentes profondeurs (XZ) du biofilm. Elles ont été prises respectivement à 4, 10, 13 et 16 μm de la surface du biofilm.. Les coupes AII, BII, CII et DII ont été prises à 1, 3, 6 et 8 μm respectivement de la surface du biofilm. Pour fin de présentation, les cellules de PM18 ont été transformées en jaunes à l'aide du logiciel de BioRad. Celles de 57RP-98 en bleues. La superposition des deux images a fait paraître les cellules de PM18 violet pâle, quelques fois blanches. Cet artefact a été causé par le logiciel de BioRad. Grossissement égale à 400x. Bar = 5 μm .



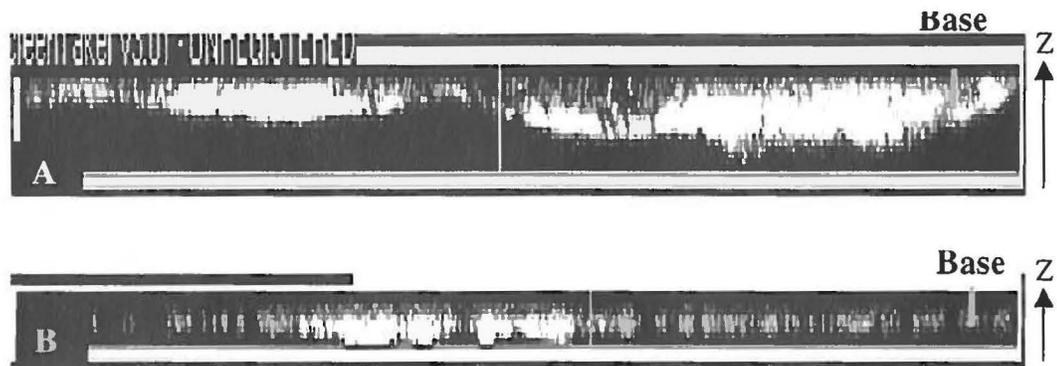


Figure 27 : Sectionnement sagittal (XZ) du biofilm de 57RP-98 et de PM18 ensemble en A) milieu Swarm et B) en milieu BDT. Les images A et B regroupe chacune toutes les coupes successives du biofilm balayé dans l'axe XZ. Ainsi, leurs hauteurs est proportionnelle à l'épaisseur du biofilm. Les cellules ont été transformées en gris à l'aide du logiciel de BioRad. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 15 μ m.

6. Développement de biofilms avec les souches *P. aeruginosa* PM18 et 57RP-98 dans un système à flux continu

Les souches PM18 et 57RP-98 ont été cultivées indépendamment et ensemble dans des chambres à flux continu. L'utilisation des chambres à flux continu a permis d'obtenir un environnement stable et défini en contrôlant les paramètres suivants : le débit, la température et la source de carbone. Les cellules ont été cultivées en milieu BDT ou Swarm à 26° C pendant plusieurs jours. Nous avons utilisé le microscope confocal pour examiner les biofilms dans les trois dimensions (XYZ). Le balayeur optique du microscope confocal a balayé le biofilm de la surface jusqu'à la base ou vice versa dans les axes XYZ. Plus précisément, le balayeur optique a effectué des balayages successives dans le plan focal (XY) en se dirigeant vers l'axe Z qui représente la profondeur. Le balayage dans l'axe XZ a été effectué à tout les 0,5 ou 2 μm . Le nombre de coupes obtenues multiplié par l'épaisseur des coupes a permis de connaître l'épaisseur du biofilm (Figure 12).

6.1 Développement de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98 dans des chambres à flux continu pendant 96 heures en milieu BDT

Les souches PM18 et 57RP-98 ont été cultivées ensembles dans une chambre à flux continu pendant 96 heures en présence du milieu BDT. L'examen de l'arrangement des cellules à l'intérieur du biofilm a été effectué à un grossissement de 200x. Le biofilm formé par 57RP-98 et PM18 avait une épaisseur de 53 μm . Les plans focaux (XY) A, B, C et D ont été prises à 13, 28, 43 et 53 μm respectivement du substratum (Figure 28). La distribution des cellules pour chacune des souches était hétérogène et la densité cellulaire était supérieure à la base. Près du substratum, la proportion de cellules de PM18 et de 57RP-98 était égale. Cependant, vers la surface du biofilm, la quantité de cellules de PM18 par rapport à 57RP-98 a semblé faible. La coupe sagittal a montré une distribution

uniforme des cellules sur toute la surface et la présence de canaux et des espaces vides à l'intérieur du biofilm (Figure 28E).

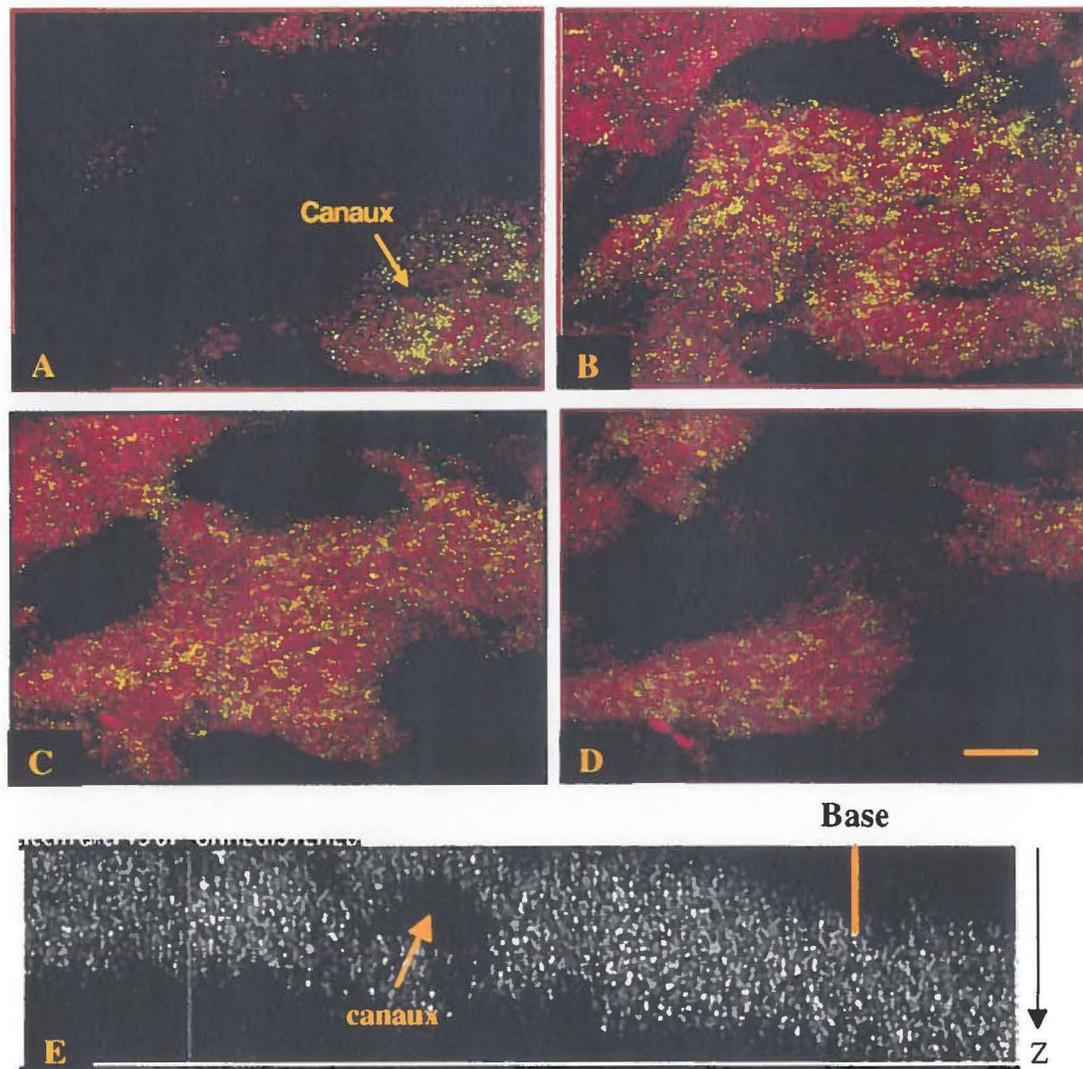


Figure 28 : Biofilm formé par les souches PM18 et 57RP-98 en milieu BDT. Les images A, B, C et D représentent des coupes du biofilm à différente profondeur balayées dans le plan XY. Bar = 10 μm . Grossissement = 200x. Les cellules de 57RP-98 ont été colorées en rouge tandis que les cellules de PM18 l'ont été en jaunes. L'image E illustre le biofilm dans le plan XZ. Les cellules ont été colorées en gris. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 30 μm .

6.2 Développement de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98 dans des chambres à flux continu pendant 192 heures en milieu BDT

Une autre expérience a été faite avec les souches PM18 et 57RP-98 dans des chambres à flux continu. Celles-ci ont été cultivées indépendamment, puis ensemble dans des chambres à flux continu en milieu BDT pendant 192 heures. Les biofilms ont été examinés au microscope confocal à un grossissement de 600x. L'intérêt de cet expérience a été d'étudier l'architecture des biofilms formés par les souches PM18 et 57RP-98 à l'aide d'un objectif qui a permis d'obtenir une meilleure résolution et de distinguer les bactéries individuellement.

Le biofilm formé par la souche 57RP-98 avait une épaisseur de $20 \pm 3,5 \mu\text{m}$ (Figure 29). Les plans focaux A et B sont représentatif du biofilm et elles ont été prises à 1 et 20 μm respectivement du substratum. Le biofilm était plus dense près de la base et plus compacte. Le coupe sagittale a montré une hétérogénéité dans la distribution des cellules et la présence de canaux et d'espaces vides (Figure 29C).

Le biofilm formé par la souche PM18 avait une épaisseur de $13,5 \pm 2 \mu\text{m}$ (Figure 30). Pour éviter la surcharge des images, seulement quelques coupes représentatives du biofilm sont illustrées. Les coupes horizontales A et B ont été prises respectivement à 5,5 et 13,5 μm du substratum. Semblable au biofilm de 57RP-98, la zone de la plus haute densité cellulaire se trouvait près du substratum. Le biofilm était plus compacte à la base et devenait plus diffus à la surface. Le coupe sagittale a montré la présence d'amas de cellules sur le plan vertical et horizontal du biofilm ainsi que la présence de canaux et des espaces vides (Figure 30C).

À la figure 31, le biofilm formé par les souches PM18 et 57RP-98 avait une épaisseur de $25,5 \pm 4,5 \mu\text{m}$. Quelques plans focaux (XY) représentatives du biofilm qui sont A, B, C et D ont été prises respectivement à 2, 8,5, 16,5 et 21,5 μm du substratum. Les deux souches étaient distribuées de façon inégale à travers le biofilm. La souche PM18 était dominante à la surface alors que la souche 57RP-98 l'était près de la base. La zone de la plus haute densité cellulaire était localisée au niveau du substratum. Le biofilm était compacte à la base et est devenu plus diffus en s'approchant de la surface. La souche 57RP-98 était plus dominante près de la base, alors que la souche PM18 l'était près de la surface. La figure 31E (XZ) montre que le biofilm était distribué de façon uniforme en hauteur et en largeur sur toute la surface.

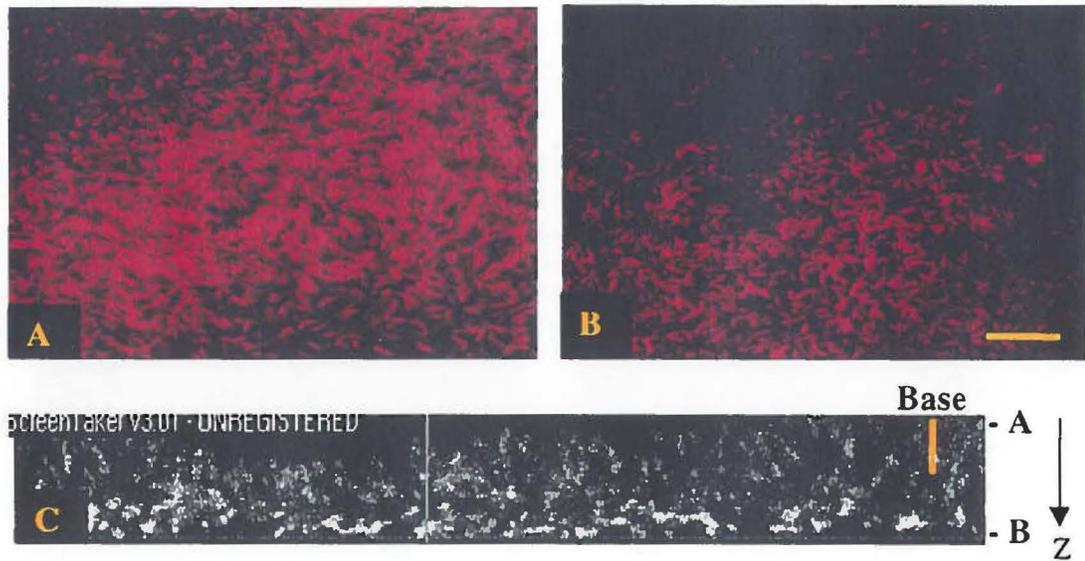


Figure 29 : Biofilm formé par de la souche 57RP-98 en milieu BDT. Le plan focal A représente la base du biofilm tandis que B la surface du biofilm. Grossissement = 600x. Bar = 2 μm . C) représente le biofilm dans le plan XZ. Les cellules ont été colorées en gris. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 6 μm .

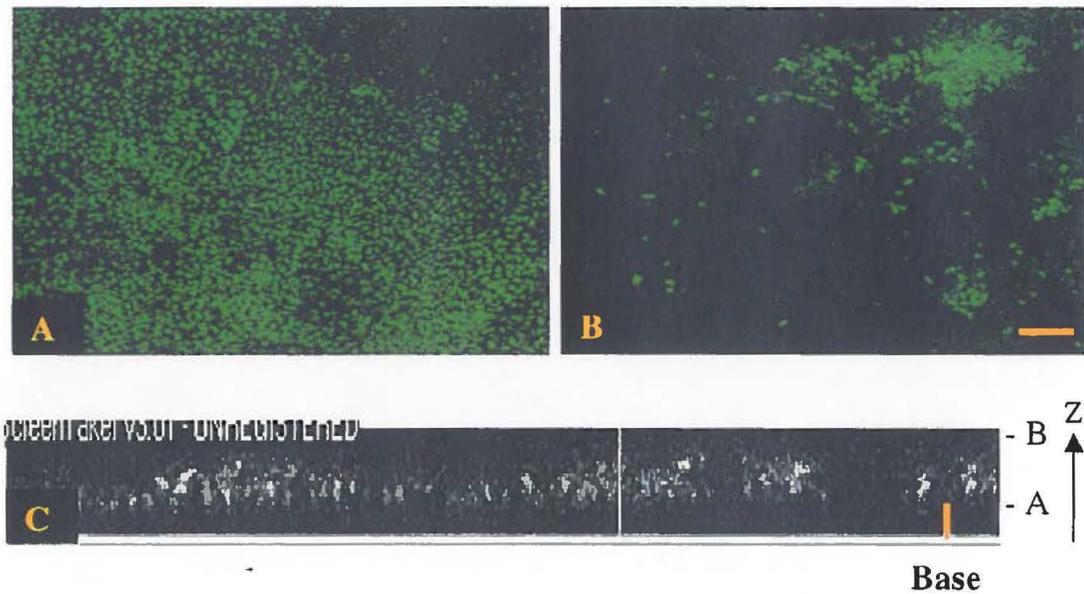


Figure 30 : Biofilm formé par la souche PM18 en milieu BDT. L'image A représente la base du biofilm tandis que l'image B représente la surface du biofilm. Les deux images sont des plans focaux (XY) prises à différentes profondeurs dans l'axe Z. Bar = 2 μm . Grossissement = 600x. L'image C illustre le biofilm dans le plan XZ. Les cellules ont été colorées en gris. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 6 μm .

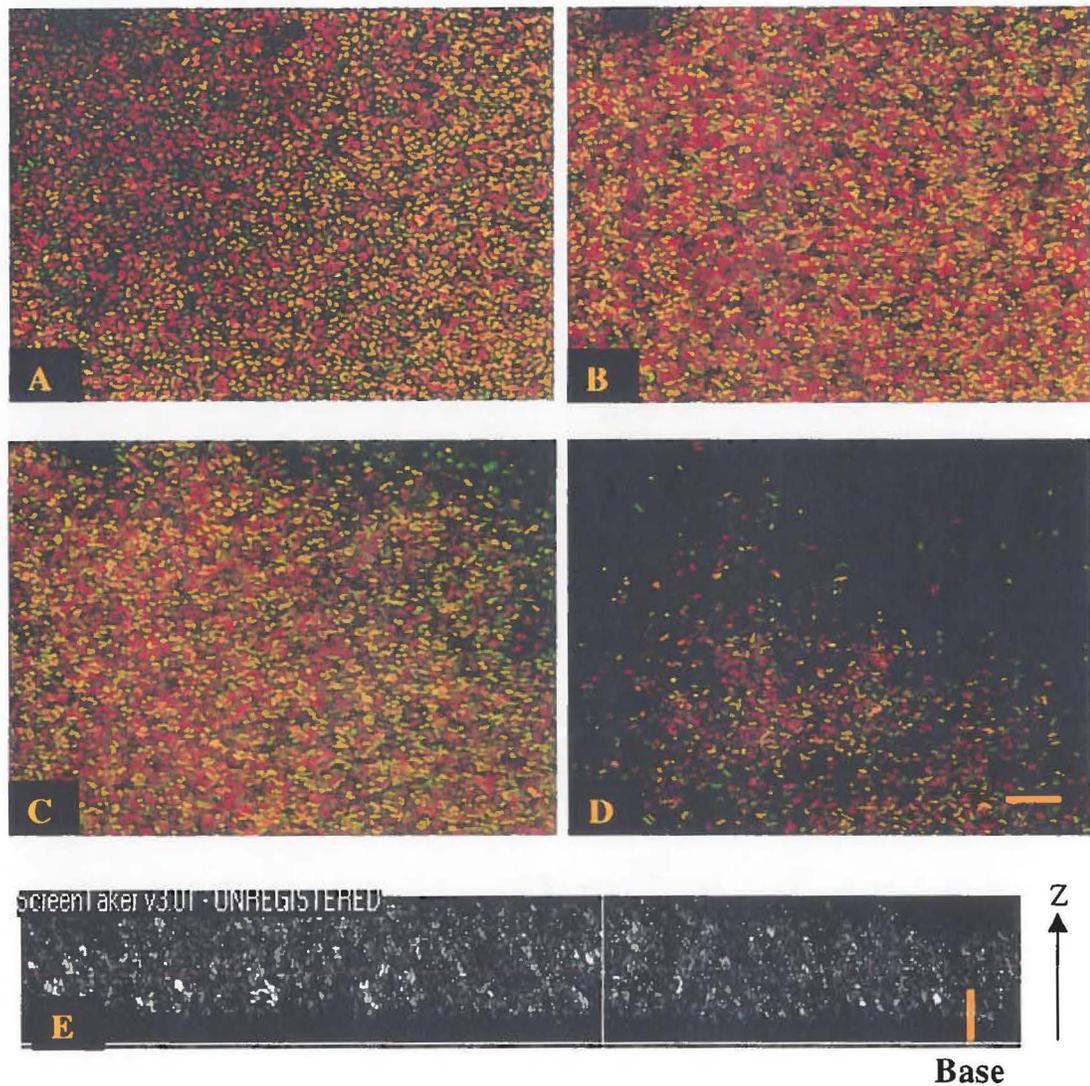


Figure 31 : Biofilm formé par les souches PM18 et 57RP-98 en milieu BDT. Les images A, B, C et D représentent des plans focaux (XY) prises dans le biofilm à différentes profondeurs (XZ), allant de la base (A) jusqu'à la surface (D). Bar = 2 μm . Grossissement = 600x. Les cellules colorées vert et orange correspondent à la souche PM18. Quelques fois les cellules colorées oranges apparaissaient jaunes. Cet artefact a été causé par le logiciel de BioRad. Les cellules colorées en rouge correspondent à la souche 57RP-98. L'image E représente une coupe sagittale du biofilm. Les cellules ont été transformées en gris à l'aide du logiciel de BioRad. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 6 μm .

6.3 Développement de biofilms avec les souches PM18 et 57RP-98 pendant 192 h en milieu Swarm

Les souches PM18 et 57RP-98 ont été cultivées indépendamment et ensemble dans des chambres à flux continu pendant 192 heures. Les bactéries ont été alimentées avec le milieu Swarm. Les biofilms ont été examinés au microscope confocal à un grossissement de 600x. Tout le biofilm a été balayé et donc, plusieurs coupes ont été obtenues. Pour fin de présentation, seulement quelques coupes représentatives du biofilm ont été illustrées.

Le biofilm de 57RP-98 cultivé en milieu Swarm avait une épaisseur de $28 \pm 5,3 \mu\text{m}$ (Figure 32). Les plans focaux A et B ont été prises à 1 et $28 \mu\text{m}$ respectivement du substratum (XZ). Le biofilm était plus dense près de la base et plus compacte. Le sectionnement sagittal (XZ) a montré une hétérogénéité dans la distribution des cellules et la présence de canaux et d'espaces vides (Figure 32C).

Le biofilm formé par PM18 en milieu Swarm avait une épaisseur de $16 \pm 2,5 \mu\text{m}$ (Figure 33). Les plans focaux A et B ont été prises à 5 et $14 \mu\text{m}$ respectivement du substratum. Le biofilm était plus compacte et plus dense près du substratum. Sur le plan XZ, la distribution des cellules semblait hétérogène (Figure 33C).

Le biofilm formé par les souches PM18 et 57RP-98 ensemble avait une épaisseur de $27 \pm 6,3 \mu\text{m}$. Les plans focaux A, B, C et D ont été prises à 9, 18, 23 et $27 \mu\text{m}$ respectivement du substratum (Figure 34). La souche 57RP-98 était dominante proche de la surface d'attachement du biofilm, alors que la souche PM18 l'était proche de la surface. Le coupe sagittale (XZ) a montré une hétérogénéité dans la distribution des cellules et la présence de canaux et d'espaces vides (Figure 34E).

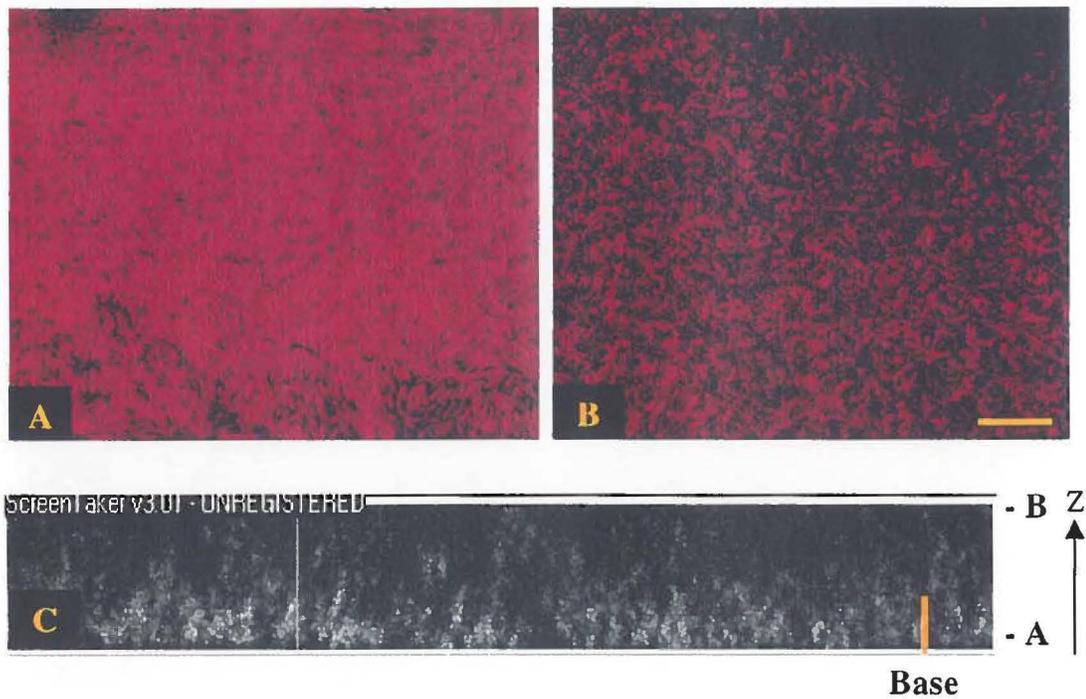


Figure 32 : Biofilm formé par la souche 57RP-98 en milieu Swarm. Les images A et B représentent des plans focaux (XY) prises à différentes profondeurs du biofilm. Ces images ont été choisies parce qu'elles sont représentatives du biofilm. L'image A correspond à la base du biofilm tandis que l'image B à la surface du biofilm. Bar = 2 μm . Grossissement = 600x. L'image C représente le biofilm dans le plan XZ. Les cellules ont été transformées en gris à l'aide du logiciel de BioRad. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 6 μm .

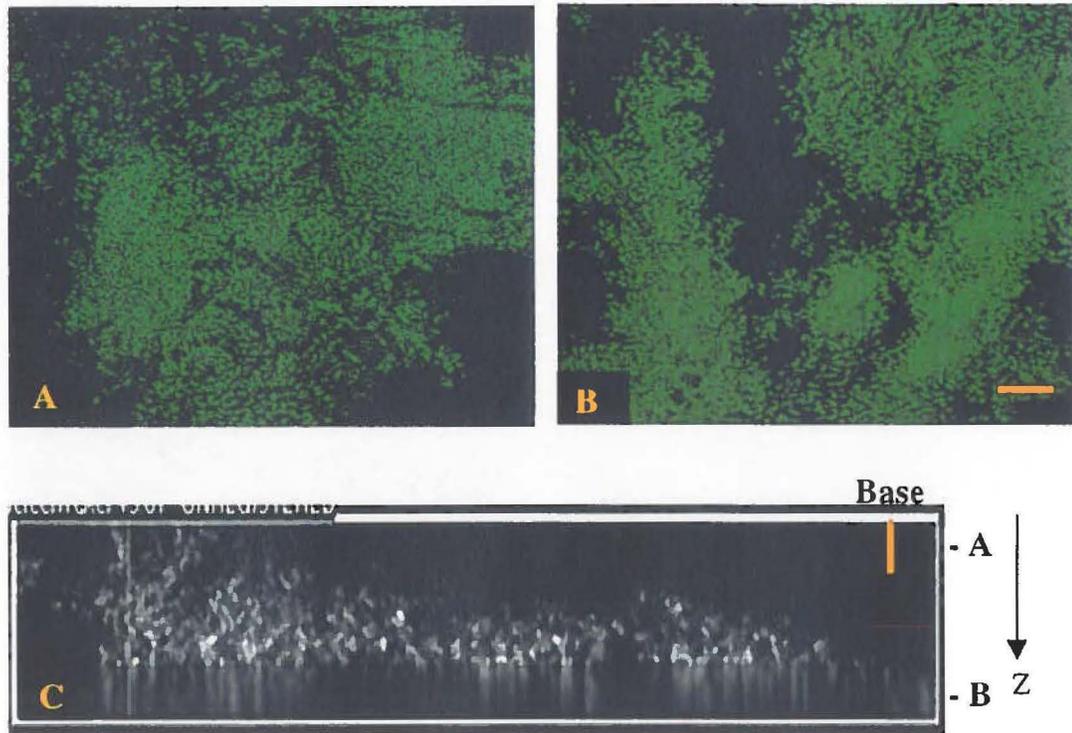


Figure 33 : Biofilm formé par la souche PM18 en milieu Swarm. Les images A et B représentent des plans focaux (XY) prises à différentes profondeurs du biofilm. Ces images ont été choisies parce qu'elles sont représentatives du biofilm. L'image A correspond à la base du biofilm tandis que l'image B à la surface du biofilm. Bar = 2 μm . Grossissement = 600x. L'image C représente une coupe sagittale (XZ) du biofilm. Les cellules ont été transformées en gris à l'aide du logiciel de BioRad. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 6 μm .

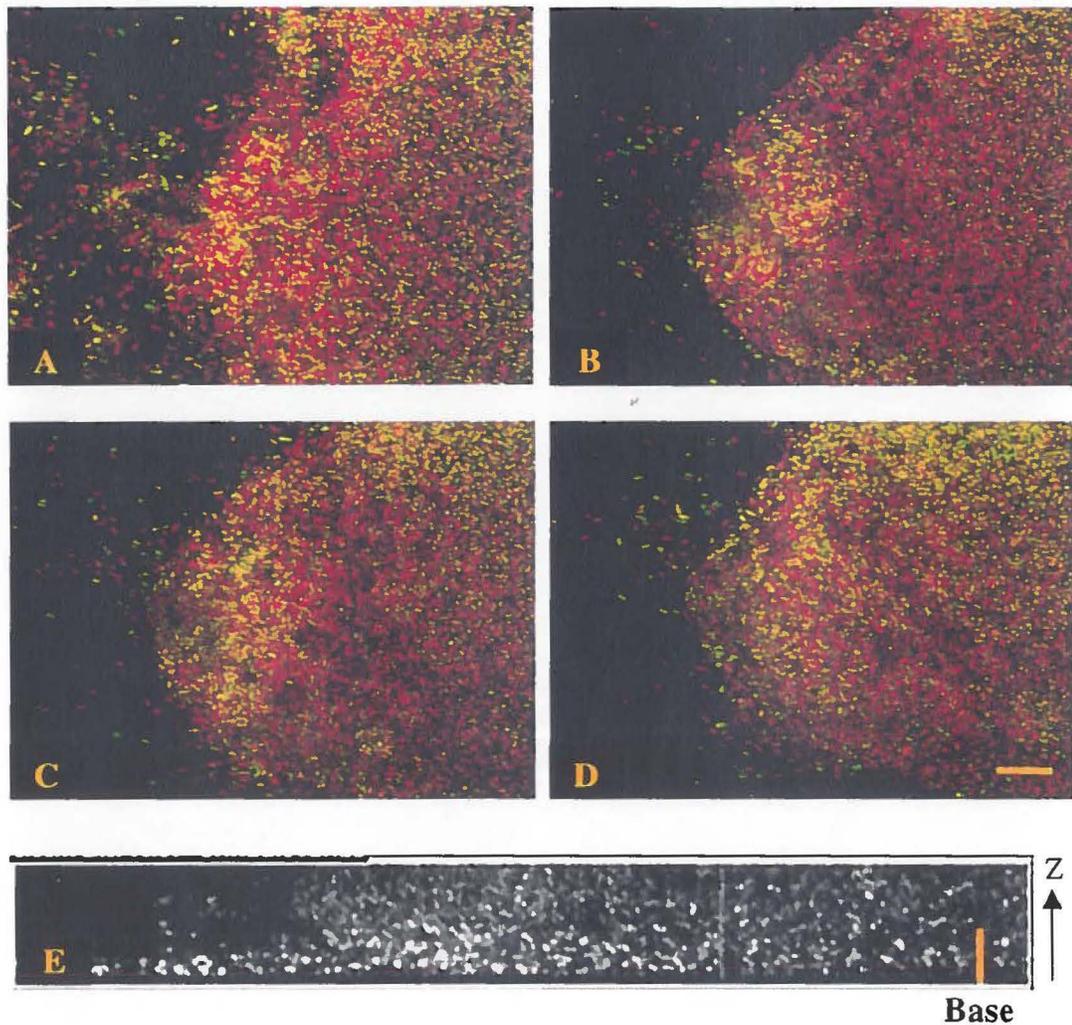


Figure 34 : Biofilm formé par les souches PM18 et 57RP-98 en milieu Swarm. Les images A, B, C et D représentent des coupes horizontales (XY) du biofilm allant de la base (A) jusqu'à la surface (D) et elles sont représentatives du biofilm. Bar = 2 μm . Grossissement = 600x. Les cellules colorées vertes et oranges correspondent à la souche PM18. Les cellules colorées rouge correspondent à la souche 57RP-98. L'image E représente une coupe sagittale (XZ) du biofilm. Les cellules ont été transformées en gris à l'aide du logiciel de BioRad. La base correspond à la surface d'attachement du biofilm. Bar = 6 μm .

6.4 Comparaison de la densité cellulaire entre PM18 et 57RP-98 à l'intérieur du biofilm cultivé en milieu BDT ou Swarm

La densité cellulaire a été quantifiée dans les biofilms composés des souches PM18 et 57RP-98. Les biofilms ont été cultivés en milieu BDT et Swarm dans un système à flux continu. Le dénombrement a été effectué dans quatre champs différents et dans trois profondeurs différentes, c'est-à-dire à la surface, au milieu et au niveau du substratum du biofilm. Le nombre de cellules de PM18 et de 57RP-98 a été compté dans chaque champ et la moyenne des valeurs obtenus pour chaque souche a été calculée. Les résultats ont montré que les cellules de PM18, en milieu BDT, étaient plus dominante à la surface, alors que les cellules de 57RP-98 l'étaient proche du substratum du biofilm. En milieu Swarm, les cellules de 57RP-98 étaient plus dominantes que les cellules de PM18 et ce, à travers tout le biofilm (Tableau 4).

6.5 Test d'étalement d'une goutte

Un autre test effectué visait à déterminer lequel des deux milieux utilisés (BDT et Swarm) a favorisé le relâchement des rhamnolipides dans le milieu. Les milieux provenaient des effluents des chambres à flux continu. Le test consistait à déposer 150 μ l de surnageant de culture sur une surface couverte d'une fine couche d'hexadécane. Le milieu qui contenait des rhamnolipides diminuait la tension superficielle du milieu. Les résultats ont montré que c'était le milieu Swarm qui favorisait le relâchement des rhamnolipides dans le milieu (Tableau 5).

Tableau 4 : Dénombrement des cellules de PM18 et de 57RP-98 dans des biofilms cultivés en milieu BDT ou Swarm

	PM18					57RP-98					Ratio
	champs 1	champs 2	champs 3	Moyenne	Ecart type	champs 1	champs 2	champs 3	Moyenne	Ecart type	PM18 : 57RP-98
Milieu BDT											
Surface du biofilm	112	146	217	158,3	53,6	44	126	30	66,7	64,7	2,4 : 1,0
Milieu du biofilm	360	132	225	239	114,6	388	505	455	449,3	146	1,0 : 1,9
Base du biofilm	38	11	51	33,3	20,4	117	128	155	133,3	55,4	1,0 : 4,0
Milieu Swarm											
Surface du biofilm	35	40	76	50,3	22,4	141	172	104	139	54,3	1,0 : 2,8
Milieu du biofilm	46	117	113	92	39,9	127	174	151	150,7	46,9	1,0 : 1,6
Base du biofilm	116	110	166	130,7	30,7	160	195	210	188,3	56,7	1,0 : 1,4

Tableau 5 : Détection de la présence des rhamnolipides dans le surnageant de cultures via le test d'étalement d'une goutte

	PM18	57RP-98
Milieu Swarm	Élevé	Négatif
Milieu BDT	Faible	Négatif

Discussion

1. Introduction du gène codant pour la protéine fluorescente verte, la GFP, dans le chromosome de *P. aeruginosa* et sélection des transconjugants

Le transposon contenant le gène codant pour la GFP a été inséré dans le chromosome de *P. aeruginosa* en suivant les protocoles standard en biologie moléculaire. Toutefois, pour permettre à la souche *P. aeruginosa* 57RP de devenir plus réceptive au transfert d'ADN hétérologue durant la conjugaison, celle-ci a été cultivée à 43° C (Rolfé et Holloway, 1966). À cette température, le système de restriction de *P. aeruginosa* s'affaiblit et même se perd (Holloway, 1998). Les transconjugants ont été sélectionnés grâce à la kanamycine et au CTAB. Le CTAB a favorisé la croissance de *P. aeruginosa*, mais a inhibé celle de *E. coli*. Les transconjugants qui avaient une fluorescence verte (PM1, PM2, PM8, PM10, PM12, PM15, PM17, PM18 et PM19) lorsqu'excités à une longueur d'onde de 488 nm ont été retenus (Tableau 3).

Les transconjugants sélectionnés ont subi des tests pour vérifier leur capacité à produire des biosurfactants et à dégrader des substrats hydrophobes. Nous voulions vérifier si les gènes responsables de la production de biosurfactants et de la dégradation de substrats hydrophobes n'avaient pas été altérés. Le test de dégradation de substrats hydrophobes n'avait pas d'intérêt pour nos expériences. Cependant, nous avons voulu le faire puisque notre souche a été isolée à l'origine d'un sol fortement contaminé avec des hydrocarbures pétroliers (Déziel, 1996a). Sur les neuf clones testés, tous ont produit du biosurfactants en forte quantité en milieu SW_f et sur les géloses bleues SW, excepté les clones PM8 et PM17. Ces clones ont produit du biosurfactants en faible quantité (Tableau 3). Dans le test de dégradation du naphthalène et du phénanthrène, le test a été positif pour tous les clones.

Finalement, la courbe de croissance a été tracée pour les neuf clones et a été comparée à celle de la souche originale, la 57RP. Les clones PM1, PM10, PM15, PM18

et PM19 avaient une croissance similaire à la souche 57RP (Figure 16). Les clones PM2, PM8, PM12 et PM17 avaient, par contre, une croissance plus lente que la souche 57RP. Ce ralentissement de la croissance pourrait être la conséquence de l'insertion du gène *gfp* dans un des gènes responsable de la croissance de la souche 57RP.

2. Suivi de la formation et de la dispersion des biomasses des souches PM18 et 57RP-98 en milieu BDT et Swarm

L'expérience avait pour but de vérifier si la production des rhamnolipides favorisait la dispersion des cellules de PM18 par rapport à 57RP-98. Selon Ochsner et *al.* (1995c) et Guerra-Santos et *al.* (1986), la nature de la source de carbone influence la production des rhamnolipides et détermine s'ils sont excrétés ou associés à la membrane. Deux milieux ont été choisis pour la culture des biofilms, le milieu BDT (0,2% glucose) et le milieu Swarm (0,5% glucose). Ces deux milieux sont une source de carbone riche. Cependant, dans le test d'étalement d'une goutte, il a été démontré que le milieu Swarm favorisait le relâchement des rhamnolipides dans le milieu tandis que le milieu BDT le favorisait très peu ou presque pas (Tableau 5). L'absence de sécrétion des rhamnolipides dans le milieu BDT est due à l'excès de la quantité de fer dans le milieu et de la présence d'azote sous forme d'ammonium (O'Toole et *al.*, 1999). Nous avons pu vérifier si un des milieux favoriserait une meilleure dispersion des cellules de PM18. Nous avons aussi voulu vérifier si le relâchement des rhamnolipides par la souche PM18 dans le milieu favoriserait la dispersion des cellules de 57RP-98 lorsqu'elles sont cultivées ensemble.

La biomasse formée par la souche 57RP-98 en milieu BDT et en milieu Swarm était plus abondante que celle formée par la souche PM18 (Figures 17 et 18). En milieu BDT et Swarm, la différence dans la quantité de biomasse formée par PM18 et 57RP-98 a commencé à être significative au temps 144 h. L'abondance de la biomasse de PM18 était inférieure en milieu Swarm par rapport au milieu BDT. Le fait que la biomasse de

PM18 a été plus faible que celle de 57RP-98 pourrait être le résultat de la production de rhamnolipides chez la souche PM18. La capacité à synthétiser des rhamnolipides est la seule différence entre ces deux souches. Cette production de rhamnolipides aurait diminué la tension superficielle, favorisant ainsi une meilleure dispersion des bactéries.

En milieu BDT, il a été difficile de conclure si la différence dans la quantité de biomasse formée par PM18 et 57RP-98 était significative entre 168 h et 240 h (Figure 17). Les grandes valeurs des écarts types ont été causées par l'agrégation des cellules de PM18 et de 57RP-98. Plus il y avait une biomasse abondante, plus le phénomène d'agrégation était présent induisant une variation dans la lecture de la D.O._{600 nm}. En conséquence, plus la lecture de la D.O._{600 nm} a été grande, plus l'écart type l'a été aussi. Toutefois, après 240 h la différence dans la quantité de biomasse formée par PM18 et 57RP-98 était significative puisque les valeurs des écarts types étaient faibles.

3. Effet des rhamnolipides sur la dispersion des cellules

Pour vérifier si les rhamnolipides extracellulaires favorisaient une meilleure dispersion des cellules, une solution pure de rhamnolipides de 0,1% a été ajoutée à l'un des biofilms formés par PM18 et à l'un de ceux formés par 57RP-98. Les biofilms ont été cultivés pendant 192 h en milieu BDT. La figure 19 montre que la biomasse de 57RP-98 était encore supérieure à la biomasse de PM18. L'ajout de rhamnolipides n'a eu aucun effet sur la biomasse de PM18. Leur présence n'a pas favorisé davantage la dispersion des cellules de PM18. Par contre, l'ajout de rhamnolipides a eu un effet significatif sur la dispersion des cellules de 57RP-98. Il est possible que si la concentration de rhamnolipides avait été plus élevée, nous aurions pu observer une plus grande dispersion des cellules de 57RP-98.

4. Comparaison des biofilms formés par la souche PM18 à ceux formés par la souche 57RP-98 en milieu BDT et Swarm

L'architecture d'un biofilm réfère à l'arrangement spatial des cellules, à l'espace occupé par les exopolysaccharides extracellulaires (EPS) et les aires ouvertes dans un biofilm (Lawrence et *al.*, 1991; Caldwell et *al.*, 1992). Lorsqu'on examine l'architecture d'un biofilm, il faut tenir compte de plusieurs facteurs pouvant l'influencer. Ces facteurs sont la température, le débit, la nature du substrat, les conditions de fixation-perméabilisation et d'hybridation du biofilm, et finalement, sa préparation pour observation au microscope confocal (Palmer et White, 1997).

Dans la culture en cuvée, le biofilm formé par PM18 ($82 \pm 34 \mu\text{m}$) en milieu BDT avait une épaisseur supérieure à celui de 57RP-98 ($10 \pm 8,6 \mu\text{m}$). À l'inverse, dans le système à flux continu, le biofilm formé par la souche PM18 ($13,5 \pm 2 \mu\text{m}$) était plus mince que celui formé par la souche 57RP-98 ($20 \pm 3,5 \mu\text{m}$) en milieu BDT.

En milieu Swarm, le biofilm formé par la souche PM18 ($16 \pm 13,5 \mu\text{m}$) avait une épaisseur égale à celui formé par la souche 57RP-98 ($13 \pm 9,6 \mu\text{m}$) dans la culture en cuvée. À l'intérieur du système en continu, le biofilm de PM18 ($16 \pm 2,5 \mu\text{m}$) avait cependant une épaisseur inférieure à celui formé par 57RP-98 ($28 \pm 5,3 \mu\text{m}$).

Les épaisseurs des biofilms ont été calculées en multipliant le nombre de sections balayées depuis la surface jusqu'au substratum du biofilm multiplié par l'épaisseur des sections. Chaque biofilm a été balayé dans trois champs différents. La moyenne de ces différentes lectures a permis d'avoir une idée représentative de l'épaisseur de chaque biofilm. Donc, selon les données obtenues, les résultats portent à croire que le biofilm formé par la souche PM18 en système en continu était plus mince que celui formé par la

souche 57RP-98 et ce, en milieu BDT et Swarm. À l'inverse, le biofilm formé par PM18 en culture en cuvée était supérieur à celui formé par 57RP-98 en milieu BDT mais, d'épaisseur égale à celui de 57RP-98 en milieu Swarm. Toutefois, un plus grand nombre de lectures aurait été souhaitable pour préciser les écarts d'épaisseurs obtenus. Des contraintes tel la disponibilité de l'équipement, la quantité mémoire nécessaire à l'enregistrement des lectures, la technique d'hybridation *in situ* des biofilms ont fait en sorte qu'il n'a pas été possible d'effectuer une grande quantité de mesures.

Les données sur l'épaisseur moyenne des biofilms formés par la souche PM18 ou 57RP-98 dans les cultures en cuvée contredisent celles obtenues en système en continu. Dans les cultures en cuvée, il a été toutefois difficile de tirer une conclusion sur le fait que la différence dans les épaisseurs des biofilms était significative, car l'épaisseur des biofilms démontrait de grande variation. Il est connu que les biofilms sont hétérogènes. Stewart et *al.* (1993) rapportent que la profondeur moyenne du biofilm formé par *P. aeruginosa* était de 33 μm avec un écart de 13,3 à 60 μm . Korber et *al.* (1994) ont noté que la profondeur du biofilm de *P. fluorescens*, cultivé pendant 72 h, pouvait varier entre 0 et 90 μm . Cependant, dans une culture en cuvée, il semble que les biofilms sont encore plus hétérogènes. Cette grande hétérogénéité résulte du fait que l'oxygène n'est pas également distribué sur toute la surface du biofilm. La portion du biofilm qui était située près de l'interface air/liquide aurait pu mieux se développer que la portion du biofilm qui était située en profondeur. Donc, dépendamment de la portion du biofilm qui a été examiné, l'épaisseur pouvait varier de façon considérable. Dans les travaux de Xu et *al.* (1998), ils ont observé que l'oxygène avait un effet sur l'hétérogénéité spatiale dans le biofilm de *P. aeruginosa*. Ainsi, l'utilisation de la culture en cuvée pour comparer des biofilms entre eux s'était révélé désavantageuse parce que les conditions expérimentales ne sont pas constantes. Danese et *al.* (2000) ont observé que les biofilms formés par une souche de *E. coli* en milieu LB étaient distribués à l'interface air/liquide, suggérant l'implication des molécules d'oxygène dans la formation du biofilm sous ces conditions.

À l'inverse, dans le système en continu, la variation dans l'épaisseur des biofilms entre PM18 et 57RP-98 peuvent être considérés plus significatives parce que les conditions expérimentales étaient constantes à l'intérieur des chambres à flux continu. De plus, ces observations concordent avec celle observée à la section 2 de Résultats, c'est-à-dire que le biofilm de 57RP-98 avait une épaisseur supérieure à celui de PM18. Ainsi, il est possible que la faible biomasse de PM18 soit la conséquence de la dispersion des cellules du biofilm grâce à la synthèse de rhamnolipides. La chambre à flux continu a été largement utilisée dans l'étude des biofilms parce que, contrairement à la culture en cuvette, elle assure un environnement stable et défini pour la croissance des biofilms. Les biofilms ont donc pu être comparés entre eux puisqu'ils ont été cultivés dans des conditions similaires (Wolfaardt et *al.*, 1994; Christensen et *al.*, 1999).

Pour ce qui est de l'architecture des biofilms formés par PM18 et 57RP-98 en milieu BDT ou Swarm, nous avons observé que les biofilms étaient confluent. Le sectionnement horizontal (XY) a montré des aires ouvertes à différentes profondeurs des biofilms. De plus, la zone de la plus haute densité cellulaire a été trouvée près de la surface d'attachement (substratum). Cette observation a déjà été notée par plusieurs auteurs (Costerton et *al.*, 1995 ; Lawrence et *al.*, 1991). Les biofilms de PM18 et de 57RP-98 étaient plus compacts près de leur surface d'attachement et devenaient de plus en plus diffus en s'éloignant de la surface (Lawrence et *al.* 1991). De plus, les biofilms de PM18 et de 57RP-98 étaient constitués de micro-colonies denses et pouvaient atteindre plusieurs micromètres d'épaisseurs. Parsek et Greenberg (2000) ont confirmé la même observation lors d'une étude où ils ont comparé le biofilm d'une souche de *P. aeruginosa* à celui d'une *P. aeruginosa* mutante (*LasR*⁻, *rhlR*⁻) incapable d'entreprendre le processus de maturation de biofilm. Le biofilm de la souche sauvage était plus dense et mieux développé que celui de la souche mutante.

Le sectionnement sagittal (XZ) du biofilm de PM18 et de celui de 57RP-98 a montré peu de différence dans la structure dans le plan XY et XZ pour les deux souches. Les

macro-colonies étaient distribuées de façon égale en hauteur (XZ). Cette uniformité était probablement due à la nature du substrat utilisé. Wolfaardt et al. (1994) ont noté que la structure du biofilm formé par un consortium microbien en milieu TSB (tryptic soy broth) ne montrait aucune différenciation verticale. Le biofilm formé était mince et montrait peu de variation dans l'épaisseur et l'agrégation des cellules. Le milieu TSB (glucose 0,25%) est considéré un milieu riche comme le BDT et le Swarm, ce qui peut expliquer l'uniformité de la distribution des cellules en hauteur. Le même consortium, lorsque cultivé avec du diclofop (herbicide), a montré une différenciation verticale du biofilm. Des macro-colonies de plusieurs micromètres de hauteur ont été observées à travers les autres colonies. En outre, des espaces vides et des canaux ont été observés à l'intérieur du biofilm de PM18 et de celui de 57RP-98. Ces canaux servent habituellement à acheminer la nourriture et l'oxygène aux cellules. Finalement, les sections sagittales ont montré que les cellules des biofilms de PM18 et de 57RP-98 migraient légèrement de la surface d'attachement (espaces vides observés entre le substratum et les colonies marquées avec Cy3-Eub338). D'après Stickler (1999), ceci se révèle après production de polysaccharides extracellulaires. Donc, c'est un comportement normal chez *P. aeruginosa*. En général, nous avons pu déduire que l'architecture des biofilms de PM18 et de 57RP-98 était semblable à celle observée chez d'autres souches de *P. aeruginosa*.

En conséquence, l'architecture des biofilms de PM18 et de 57RP-98 cultivés en milieu Swarm ou en milieu BDT était semblable. Ainsi, on retrouve les mêmes caractéristiques dans les biofilms de PM18 et de 57RP-98 alimentés avec le milieu Swarm que ceux alimentés avec le milieu BDT. L'utilisation du milieu BDT ou Swarm comme substrat ne semble pas avoir eu un effet significatif sur la structure des biofilms de PM18 ou de 57RP-98. Pour observer une différence dans la structure, il serait intéressant d'utiliser une source de carbone moins riche comme le milieu minimal et/ou une source de carbone récalcitrante en parallèle avec un milieu riche.

5. Comparaison des biofilms formés par les souches PM18 et 57RP-98 ensemble en milieu BDT et Swarm

En milieu BDT, l'examen du biofilm composé de PM18 et de 57RP-98 ensemble, obtenu en culture en cuvette, a révélé que celui-ci était d'épaisseur inférieure ($10 \pm 8 \mu\text{m}$) à celui obtenu en système en continu ($25,5 \pm 4,5 \mu\text{m}$). Quant aux biofilms cultivés en milieu Swarm, le biofilm obtenu avec la culture en cuvette ($18 \pm 9,5 \mu\text{m}$) était d'épaisseur égale à celui obtenu en système en continu ($27 \pm 6,3 \mu\text{m}$). Comme déjà mentionné, il est difficile de comparer les biofilms cultivés en cuvette avec ceux cultivés en système en continu car les conditions expérimentales en culture en cuvette ne sont pas constantes.

En milieu BDT, lorsque les deux souches étaient présentes dans le même biofilm, les cellules étaient distribuées de façon inégale. Les cellules de la souche PM18 étaient dominantes à la surface alors que celles de 57RP-98 se retrouvaient plus près de la base (Tableau 4). Pour vérifier si cette distribution des cellules était le résultat de l'action des rhamnolipides, nous avons effectué un test d'étalement d'une goutte pour détecter leur présence dans le milieu BDT (Tableau 5). Le résultat a indiqué une très faible présence de rhamnolipides dans la vidange du milieu de culture. Cette présence faible des rhamnolipides dans le milieu BDT n'est pas cependant synonyme de faible production. Il est possible que les rhamnolipides synthétisés par les bactéries soient demeurés associés à leur membrane sans être relâchés dans le milieu (Hommel, 1990). Lorsque les rhamnolipides restent attachés à la paroi cellulaire, ils la rendent hydrophobe. Le fait que la paroi cellulaire devienne hydrophobe pourrait favoriser le fourmillement («swarming») des bactéries dans le biofilm pour qu'elles puissent monter en surface et se disperser (Communiqué, congrès biofilm 2000, Montana, É.U.).

En parallèle, lorsque les deux souches étaient cultivées en milieu Swarm, nous avons noté que les cellules de la souche 57RP-98 étaient plus abondantes que celles de la

souche PM18 et ce, à travers tout le biofilm. La faible abondance des cellules de PM18 pourrait être la conséquence de la synthèse des rhamnolipides; les rhamnolipides auraient favorisé la dispersion des cellules de PM18 du biofilm. Pour la souche 57RP-98, lorsque le nombre de cellules en milieu Swarm a été comparé avec le nombre de cellules en milieu BDT, la différence était peu significative (Tableau 4). Le test d'étalement d'une goutte pour détecter la présence des rhamnolipides dans le milieu Swarm a indiqué une forte présence de ces derniers dans la vidange du milieu de culture (Tableau 5). Ceci suggérerait que le milieu Swarm avait favorisé le relâchement des rhamnolipides dans le milieu. Le relâchement des rhamnolipides dans le milieu aurait favorisé une certaine dispersion des cellules de 57RP-98. Cependant, l'absence du fourmillement chez la souche l'aurait empêchée de monter en surface pour se disperser. Finalement, il semble que les deux états de rhamnolipides (excrétés ou associées à la membrane) pourraient favoriser le fourmillement et/ou la dispersion des cellules du biofilm.

Des travaux récents effectués par Köhler et *al.* (2000) ont montré qu'il existait une corrélation entre la production de rhamnolipides et le phénomène de fourmillement. Chez une souche de *P. aeruginosa* où le gène *rhlA* a été interrompu, la bactérie était incapable de faire du fourmillement et de synthétiser des rhamnolipides. Les gènes *rhlA* et *rhlB* codent pour la rhamnosyltransférase, une enzyme responsable de la synthèse des rhamnolipides (Ochsner et *al.*, 1994a). En interrompant le gène *rhlA* ou *rhlB*, il y a cessation de production de rhamnolipides. D'autres travaux effectués par É. Déziel (travaux non publiés) ont montré que c'était le gène *rhlA* spécifiquement et non le gène *rhlB* qui est essentiel au fourmillement. Comme la souche 57RP-98 a été mutée au niveau du gène *rhlA*, cela expliquerait bien son incapacité à faire du fourmillement.

Le biofilm formé par les souches PM18 et 57RP-98 en milieu BDT avait une épaisseur égale à $25,5 \pm 4,5$ μm . Celui formé par PM18 et 57RP-98 en milieu Swarm avait une épaisseur de $27 \pm 6,3$ μm . Pour comparer le nombre de cellules de PM18 à celui des cellules de 57RP-98 en milieu BDT et en milieu Swarm, celles-ci ont été

dénombrées dans trois zones différentes. Ces zones étaient : la surface, le milieu et la base (substratum) du biofilm (Tableau 4). Les résultats ont indiqué que le nombre moyen de cellules de 57RP-98 présentes au milieu et à la base du biofilm était supérieur à celui de PM18 en milieu BDT. À l'inverse, le nombre moyen de cellules de PM18 présentes à la surface du biofilm était supérieur à celui de 57RP-98. L'abondance des cellules de PM18 à la surface du biofilm pourrait être due au fourmillement des cellules vers la surface pour se disperser. Ajoutons aussi que le nombre moyen des cellules de PM18 était inférieur à celui des cellules de 57RP-98 dans l'ensemble du biofilm, suggérant possiblement l'implication des rhamnolipides dans la dispersion des cellules de PM18. En milieu Swarm, le nombre moyen des cellules de PM18 était aussi inférieur à celui des cellules de 57RP-98 dans toutes les zones du biofilm. Cette faible abondance des cellules de PM18 par rapport à 57RP-98 pourrait encore suggérer l'implication des rhamnolipides dans la dispersion des cellules de PM18. Malgré le relâchement des rhamnolipides dans le milieu Swarm, le rapport entre le nombre de cellules de PM18 à celui de 57RP-98 n'était pas égal à cause de l'incapacité de cette dernière à faire du fourmillement. L'absence de fourmillement chez la souche 57RP-98 (*rhlA*⁻) aurait entravé la montée des cellules en surface pour se disperser.

6. Effet des conditions d'hybridation et de préparation des biofilms sur la détection de la fluorescence et la résolution des images

Pour obtenir plus d'informations sur l'architecture d'un biofilm, il faut considérer les conditions d'hybridations et les conditions de préparation du biofilm. Il a été possible de combiner la méthode d'hybridation *in situ* et le suivi du signal de la GFP pour distinguer les deux souches l'une de l'autre (Christensen et *al.*, 1999). La fixation des cellules avec de la para-formaldéhyde a peu d'effet sur la fluorescence de la GFP. Par contre, les solutions utilisées lors de l'hybridation ont un effet sur la stabilité de la protéine (Christensen et *al.*, 1999). Plus particulièrement, c'est la présence de SDS dans les solutions utilisés lors de l'hybridation qui affecte la fluorescence de la GFP. Donc, il faut

minimiser le contact entre la GFP et les solutions d'hybridations. De plus, l'épaisseur d'un biofilm varie. Lorsque celle-ci était élevée, il fallait modifier les conditions d'hybridation pour que la sonde pénètre en profondeur. Par conséquent, la détection du signal de la GFP devenait difficile. Pour pallier à cette problématique, il a fallu modifier le gain et l'intensité du faisceau laser. L'augmentation du gain a amplifié le signal dans le photomultiplicateur générant ainsi, du bruit électronique. Ceci a eu pour conséquence d'empêcher la discrimination des cellules fluorescentes du fond noir, ainsi que la discrimination de deux cellules d'intensité différentes.

Ajoutons aussi que la cellule marquée avec la GFP l'a été aussi avec la sonde marquée au Cy3. Dans le cas où la fluorescence de la GFP a été faible, ceci a causé une mauvaise perception de l'identité de la souche. Cependant, ce problème a été partiellement corrigé en égalisant l'intensité des deux fluorochromes avec le logiciel de traitement d'image (Photo Paint). Un autre problème engendré par l'augmentation de gain et de l'intensité de laser a été le « photobleaching » du fluorochrome. Pour contourner ce problème, il a fallu minimiser le temps d'exposition du spécimen (Lawrence et *al.*, 1997).

Un autre élément à considérer lors de l'examen des biofilms est la préparation et la manipulation des biofilms. Pour conserver la structure tridimensionnelle et l'hydratation du biofilm, ce dernier a été enrobé dans une solution de polyacrylamide 20 %. Une mauvaise manipulation du biofilm produit l'affaissement de celui-ci.

Il faut aussi tenir compte des indices de réfraction. Le chemin optique a une influence sur la mesure relative des bactéries. En d'autres mots, la dimension mesurée est proportionnelle à l'inverse du carré de la distance, celle-ci correspondant au chemin optique. Comme nous travaillons avec des distances très petites de l'ordre du micromètre, ce phénomène peut induire des erreurs de mesure importantes. Une bactérie

située à quelques micromètres d'une autre bactérie peut paraître beaucoup plus petite qu'elle ne l'est en réalité. Il peut donc y avoir perte d'information.

Finalement, il faut considérer que le point focal est fonction de la longueur d'onde. Ceci a posé un problème lors de la superposition des images où les bactéries ont été balayées avec les différentes longueurs d'ondes. En effet, la même bactérie balayée dans le rouge et dans le vert était distorsionnée. Lorsque balayée dans le vert, la bactérie apparaissait petite tandis que balayée dans le rouge, elle apparaissait plus grosse. Donc, durant les expériences de co-localisation, ce paramètre a affecté notre perception. Tous les facteurs mentionnés ci-haut peuvent amener une perte d'information et une mauvaise interprétation des résultats s'ils ne sont pas considérés (Lawrence et *al.* 1997; Douglas et *al.*, 1992).

Conclusion

L'utilisation de la GFP comme marqueur moléculaire est avantageux car cette protéine ne requiert aucun substrat pour s'exprimer. De plus, elle permet de suivre les cellules individuellement et en temps réel. La GFP peut être aussi détectée à l'aide d'instruments tel que le microscope confocal et le microscope à épifluorescence. L'insertion du gène *gfp* dans le chromosome de *P. aeruginosa* a empêché le transfert de celui-ci à d'autres bactéries. Pour augmenter le taux de transfert d'ADN hétérologue dans la souche *P. aeruginosa*, celle-ci a été cultivée à 43° C afin d'affaiblir son système de restriction.

La quantification de la biomasse de la souche PM18 et celle de la souche 57RP-98 en milieu BDT et en milieu Swarm a montré que la biomasse de 57RP-98 était supérieure à celle de PM18 et ce, dans les deux milieux. La seule différence entre ces deux souches était la production des rhamnolipides. Par conséquent, il est permis de croire que les rhamnolipides favorisent la dispersion des cellules. De plus, le test d'étalement d'une goutte a montré que le milieu Swarm favorisait le relâchement des rhamnolipides dans le milieu tandis que le milieu BDT le favorisait peu ou de façon imperceptible. Dans les deux milieux, la biomasse de PM18 était mince par rapport à 57RP-98. Ceci nous fait présumer que les deux états de rhamnolipides (excrétés ou associés à la membrane) favorisent la dispersion des cellules.

L'ajout d'une solution de rhamnolipides de 0,1% a causé une dispersion partielle des cellules de 57RP-98. À l'inverse, l'ajout de rhamnolipides n'a pas eu un effet significatif sur la dispersion des cellules de PM18. Il est probable que la concentration de la solution de rhamnolipides n'a pas été assez élevée pour affecter considérablement la dispersion des cellules. D'un autre côté, le biofilm de 57RP-98 avait une épaisseur plus grande que celle de PM18 soulignant encore une fois que les rhamnolipides favorisent la dispersion des cellules.

Dans l'expérience de culture en cuvée, les résultats ont montré que les conditions expérimentales ne sont pas égales dans toutes les cuvées. Cette variation a empêché de comparer les biofilms entre eux. Par conséquent, il était difficile de considérer les résultats comme significatifs ou non parce que la production des rhamnolipides n'était pas le seul paramètre à considérer.

L'utilisation du système à flux continu constitue une méthode plus fiable pour cultiver des biofilms. Ce système assure un environnement stable et défini pour la croissance des biofilms puisque ces derniers ont été cultivés dans des chambres en parallèles. Ceux-ci, ils ont été alimentés avec le même milieu de culture, au même débit et ont été incubés à la même température. Les coupes horizontales et sagittales ont montré que la production de rhamnolipides n'affecte pas l'architecture des biofilms. En effet, l'architecture du biofilm de PM18 était semblable à celle de 57RP-98. De plus, l'architecture des biofilms cultivés en milieu BDT était semblable à celle des biofilms cultivés en milieu Swarm.

Il a été démontré que l'inactivation du gène *rhlA*⁻ empêchait le fourmillement chez *P. aeruginosa*. Nous avons observé dans le milieu BDT que les cellules de 57RP-98 (mutées au niveau du gène *rhlA*⁻) sont restées proches du substratum tandis que les cellules de PM18 se sont retrouvées plus proches de la surface. Dans le milieu Swarm, les cellules de 57RP-98 sont aussi restées proches du substratum. Cependant, le relâchement des rhamnolipides dans le milieu Swarm aurait favorisé une certaine dispersion des cellules de 57RP-98. Comme ces dernières étaient mutées au niveau du gène *rhlA*⁻, elles étaient incapables de faire du fourmillement pour pouvoir se disperser du biofilm. Le dénombrement de cellules pour la souche PM18 a montré une plus faible biomasse de celles-ci dans l'ensemble du biofilm par rapport à la souche 57RP-98 en milieu Swarm. La dispersion des cellules de PM18 pourrait être la cause de cette faible abondance. En conclusion, les rhamnolipides pourraient jouer un rôle dans la dispersion

des cellules du biofilm et le gène *rhlA*, plus particulièrement dans le phénomène du fourmillement.

Bibliographie

Akkermans, A. D. L., M. S. Mirza, H. J. M. Harsmen, H. J. Blok, P. R. Herron, A. Sessitsch et W. A. Akkermans (1994). "Molecular ecology of microbes: A review of promises, pitfalls and true progress." FEMS Microbiology Review **15**: 185-194.

Albus, A. M., E. C. Pesci, L. J. Runyen-Janecky, S. E. West et B. H. Iglewski (1997). "Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of Bacteriology **179**: 3928-3935.

Allison, D. G., B. Ruiz, C. SanJose, A. Jaspe et P. Gilbert (1998). "Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms." FEMS Microbiology Letters **167**: 179-184.

Amann, R. I., B. J. Binder, R. J. Olson, S. W. Chisholm, R. Devereux et D. A. Stahl (1990). "Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysis of mixed microbial population." Applied and Environmental Microbiology **56** : 1919-1925

Andersen, J. B., C. Sternberg, L. K. Poulsen, S. P. Bjfrn, M. Givskov et S. Molin (1998). "New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria." Applied and Environmental Microbiology **64**: 2240-2246.

Applegate, D. H. et J. D. Bryers (1991). "Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes." Biotechnology Bioengineering **37**: 17-25.

Atlas, R. M., G. Sayler, R. S. Burlage et A. K. Bej (1992). "Molecular approaches for environmental monitoring of microorganisms." Biotechniques **12**: 706-716.

Behal, V. (1986). "Enzymes of secondary metabolism in micro-organisms." Trends in Biological Sciences **11**: 88-91.

Ben-Ari, E. (1999). "Not just slime." Bioscience **49**: 689-695.

Bloemberg, G. V., G. A. O'toole, B. J. J. Lugtenberg et R. Kolter (1997). "Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp." Applied and Environmental Microbiology **63**: 4543-4551.

Boyd, A. et A. M. Chakrabarty (1994). "Role of alginate lyase in cell detachment of

Pseudomonas aeruginosa." Applied and Environmental Microbiology **60**: 2355-2359.

Bryers, J. D. (1988). Modeling biofilm accumulation. Physiological models in microbiology. M. J. Bazin and J. I. e. Prosser. Boca Raton, FL, CRC. **2**: 109-144.

Burlage, R. S. et C. T. Kuo (1994). "Living biosensors for the management and manipulation of microbial consortia." Annual Review of Microbiology **48**: 291-309.

Burlage, R. S., Z. K. Yang et T. Mehlhorn (1996). "A transposon for green fluorescent protein transcriptional fusions: Application for bacterial transport experiments." Gene **173**: 53-58.

Caldwell, D. E., D. R. Korber et J. R. Lawrence (1992). "Confocal laser microscopy and digital image analysis in microbial ecology." Advances in Microbial Ecology **12**: 1-67.

"Center for Biofilm Engineering. Images library ". <http://www.erc.montana.edu>

Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward et D. C. Prasher (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**: 802-805.

Christensen, B. B., C. Steinberg et S. Molin (1996). "Bacterial plasmid conjugation on semi-solid surfaces monitored with the green fluorescent protein (GFP) from *Aequorea victoria* as a marker." Gene **173**: 59-65.

Christensen, B. B., C. Sternberg, J. B. Andersen, R. J. Palmer, J. Nielsen, A.T., M. Givskov et S. Molin (1999). "Molecular tools for study of biofilm physiology." Methods in enzymology **310**: 20-42.

Cody, C. W., D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast et W. W. Ward (1993). "Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green fluorescent protein." Biochemistry **32**: 1212-1218.

Cormack, B. P., R. H. Valdivia et S. Falkow (1996). "FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)." Gene **173**: 33-38.

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. DeBeer, D. Caldwell, D. Korber et G. James (1994). "Biofilms, the Customized Microniche." Journal of Bacteriology **176**: 2137-2142.

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell et D. R. Korber (1995). "Microbial Biofilms." Annual Review of Microbiology **49**: 711-745.

Costerton, J. W., P. S. Stewart et E. P. Greenberg (1999). "Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections." Science **284**: 1318-1322.

Danese, P. N., L. A. Pratt, S. L. Dove et R. Kolter (2000). "The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms." Molecular Microbiology **37**: 424-432.

Davies, D. G., A. M. Chakrabarty et G. G. Geesey (1993). "Exopolysaccharide production in biofilms : Substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*." Applied and Environmental Microbiology **59**: 1181-1186.

Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton et E. P. Greenberg (1998). "The Involvement of Cell-to-Cell Signals in the Development of a Bacterial Biofilm." Science **280**: 295-298.

De Kievit, T. R. et B. H. Iglewski (1999). "Quorum sensing, gene expression, and *Pseudomonas* biofilms." Methods in Enzymology **310**: 117-128.

De Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik et K. N. Timmis (1990). "Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria." Journal of Bacteriology **172**: 6568-6572.

De Lorenzo, V. et K. N. Timmis (1994). "Analysis and construction of stable phenotypes in Gram-Negative bacteria with Tn5 and Tn10-derived minitransposons." Methods in Enzymology **235**: 386-405.

Deretic, V., J. R. W. Govan, W. M. Konyecsni et D. W. Martin (1990). "Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: mutations in the muc loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli." Molecular Microbiology **4**: 189-196.

Deretic, V., M. J. Schurr, J. C. Boucher et D. W. Martin (1994). "Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors." Journal of Bacteriology **176** : 2773-2780.

Desai, J. D. et I. M. Banat (1997). "Microbial production of surfactants and their commercial potential." Microbiology and Molecular Biology Reviews **61**: 47-64.

Déziel, E. (1996 a). Étude de la production de biosurfactants par des souches bactériennes métabolisant les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Mémoire de Maîtrise. Laval, Institut Armand Frappier. pp. 247.

Déziel, E., G. Paquette, R. Villemur, F. Lépine et J.-G. Bisailon (1996 b). "Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons." Applied and environmental microbiology **62**: 1908-1912.

Déziel, E. (1998). Impact des micro-organismes sur la biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Laval, Montréal. Institut Armand Frappier - École polytechnique.

Déziel, E., Y. Comeau et R. Villemur (1999). "Growth of a *Pseudomonas aeruginosa* strain and its biosurfactant non-producing mutant on hexadecane is promoted by the emergence of hydrophobic rough mutants. " Congrès American Society for Microbiologists.

Eberl, L., R. Schulze, A. Ammendola, O. Geisenberger, R. Earhart, C. Steinberg, S. Molin et R. Amann (1997). "Use of green fluorescent protein as a marker for ecological studies of activated sludge communities." FEMS Microbiology Letters **149**: 77-83.

Errampalli, D., H. Okamura, H. Lee, J. T. Trevors et J. D. van Elsas (1998). "Green fluorescent protein as a marker to monitor survival of phenanthrene-mineralizing *Pseudomonas* sp. UG14Gr in creosote-contaminated soil." FEMS Microbiology Ecology **26**: 181-191.

Errampalli, D., K. Leung, M. B. Cassidy, M. Kostrzynska, M. Blears, H. Lee et J. T. Trevors (1999). "Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms." Journal of Microbiological Methods **35**: 187-199.

Fuqua, C., S. C. Winans et E. P. Greenberg (1996). "Census and consensus in bacterial ecosystems : the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators." Annual Review of Microbiology **50**: 591-624.

Gage, D. J., T. Bobo et S. R. Long (1996). "Use of green fluorescent protein to visualize early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago*

sativa).” Journal of Bacteriology **178**: 7159-7166.

Georgiou, G., S. Lin et M. M. Sharma (1992). “Surface-active compounds from microorganisms.” Bio/Technology **10**: 60-65.

Giovannoni, S. J., E. F. DeLong, G. J. Olsen et N. R. Pace (1988). “Phylogenetic group-specific probes for identification of single microbial cells.” Journal of Bacteriology **170**: 720-726.

Gray, K. M. (1997). “Intercellular communication and group behaviour in bacteria.” Trends Microbiology **5**: 184-188.

Grotenhuis, J. T., M. Smit, C. M. Plugge, Y. S. Xu, A. A. Van Lammeren, A. J. Stams et A. J. Zehnder (1991). “Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates.” Applied and Environmental Microbiology **57**: 1942-1949.

Guerra-Santos, L. H., O. Käppeli et A. Fiechter (1986). “Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors.” Applied Microbiology Biotechnology **24**: 443-448.

Hassett, D. J., J.-F. Ma, J. G. Elkins, T. R. McDermott, U. A. Ochsner, S. E. H. West, C.-T. Huang, J. Fredericks, S. Burnett, P. S. Stewart, G. McFeters, L. Passador et B. H. Iglewski (1999). “Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide.” Molecular Microbiology **34**: 1082-1093.

Heim, R., D. C. Prasher et R. Y. Tsien (1994). “Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.” Proceeding National Academic of Science USA **91**: 12501-12504.

Hisatsuka, K.-I., T. Nakahara, N. Sano et K. Yamada (1971). “Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation.” Agriculture Biol. Chem. **35**: 686-692.

Holloway, B. W. (1998). “The less travelled road in microbial genetics.” Microbiology **144**: 3243-3248.

Hommel, R. K. (1990). "Formation and physiological role of biosurfactant produced by hydrocarbon-utilizing micro-organisms." Biodegradation **1**: 107-119.

Hoyle, B. D., L. J. Williams et J. W. Costerton (1993). "Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Infections Immunology **61**: 777-780.

Inouye, S. et F. I. Tsuji (1994). "Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein." FEBS Letters **341**: 277-280.

Itoh, S., H. Honda, F. Tomita et T. Suzuki (1971). "Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C₁₂, C₁₃ and C₁₄ fractions)." Journal of Antibiotic **24**: 855-859.

Johnson, L. D. (1996). "Introduction to fluorescence techniques." In : Handbook of fluorescent probes and research chemicals. Spence, M. T. Z., Ed. Molecular Probes, Leiden. pp. 1-6

King, E. O., M. K. Ward et D. E. Raney (1954). "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein." Journal of Laboratory Clinical Medicine **44**: 301-307.

Kluepfel, D. A. (1993). "The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere." Annual Review of Phytopathology. **31** : 441-472

Korber, D. R., G. M. Wolfaardt, V. Brözel, R. MacDonalad et T. Niepel (1999). "Reporter systems for microscopic analysis of microbial biofilms." Methods in Enzymology **310**: 3-20.

Köhler, T., L. K. Curty, F. Barja, C. Van Delden et J.-C. Pechère (2000). "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili." Journal of Bacteriology **182**: 5990-5996.

Lawrence, J. R., D. R. Korber, B. D. Hoyle, J. W. Costerton et D. E. Caldwell (1991). "Optical sectioning of microbial biofilms." Journal of Bacteriology **173**: 6558-6567.

Lawrence, J. R. et D. R. Korber (1994). Aspects of microbial surface colonization behavior. Barcelona, Span. Soc. Microbial.

Lawrence, J. R., D. R. Korber, G. M. Wolfaardt et D. E. Caldwell, Eds. (1997). Analytical imaging and microscopy techniques. Manual of environmental microbiology.

Lawrence, J. R. et T. R. Neu (1999). "Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms." Methods in Enzymology **310** : 131-144

Lindow, S. E. (1995). "The use of reporter genes in the study of microbial ecology." Molecular ecology **4**: 555-566.

Martin, D. W., M. J. Schur, H. Yu et V. Deretic (1994). "Analysis of promoters controlled by the putative sigma factor algU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to sigmaE and stress response." Journal of Bacteriology **176**: 6688-6696.

McKnight, S. L., B. H. Iglewski et E. C. Pesci (2000). "The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of Bacteriology **182**: 2702-2708.

Møller, S., D. R. Korber, G. M. Wolfaardt, S. Molin et D. E. Caldwell (1997). "Impact of nutrients composition on a degradative biofilm community." Applied and Environmental Microbiology **63**: 2432-2438.

Morgenroth, E. et P. A. Wilderer (2000). "Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms." Water Resources **34**: 417-426.

Morin, J. G. et J. W. Hastings (1971). "Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates." Journal of Cell Physiology **77**: 303-312.

Mulligan, C. N. et B. F. Gibbs (1989). "Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*." Applied Environmental Microbiology **55**: 3016-3019.

Møller, S., C. Steinberg, J. B. Andersen, B. B. Christensen, J. L. Ramos, M. Givskov et S. Molin (1998). "In situ gene expression in mixed-culture biofilms evidence of metabolic interaction between community members." Applied Environmental

Microbiology **64**: 721-732.

Nielsen, A. T., T. Tolker-Nielsen, K. B. Barken et S. Molin (2000). "Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium." Environmental Microbiology **2**: 59-68.

O'Toole, G. A. et R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." Molecular Microbiology **30**: 295-304.

O'Toole, G. A., L. A. Pratt, P. I. Watnick, D. K. Newman, V. B. Weaver et R. Kolter (1999). "Genetic approaches to study of biofilms." Methods in Enzymology **310**: 91-109.

Oberbremer, A. et R. Müller-Hurtig (1989). "Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor." Applied Microbiology Biotechnology **31**: 582-586.

Ochsner, U. A., A. K. Koch, A. Fiechter et J. Reiser (1994 a). "Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." Journal of Bacteriology **176**: 2044-2054.

Ochsner, U. A., A. Fiechter et J. Reiser (1994 b). "Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis." Journal of Biological Chemistry **269**: 19787-19795.

Ochsner, U. A. et J. Reiser (1995 a). "Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*." Proceeding of the National Academy of Sciences **92**: 6424-6428.

Ochsner, U. A., J. Reiser, A. Fiechter et B. Witholt (1995 b). "Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts." Applied Environmental Microbiology **61**: 3503-3506.

Ochsner, U. A., T. Hembach et A. Fiechter (1995 c). "Production of rhamnolipid biosurfactants." Advances in Biochemical Engineering **53**: 89-118.

Ormö, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien et S. J. Remington

(1996). "Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein." Science **273**: 1392-1395.

Paddock, S. W. (1999). "Confocal laser scanning microscopy." BioTechniques **27**: 992-1004.

Palmer, R. J. J. et D. C. White (1997). "Developmental biology of biofilms : implications for treatment and control." Trends in Microbiology **5**: 435-440.

Palmer, R. J., Jr (1999). "Microscopy flowcells : perfusion chambers for real-time study of biofilms." Methods in Enzymology **310**: 160-166.

Palmer Jr, R. J. et C. Sternberg (1999). "Modern microscopy in biofilm research : confocal microscopy and other approaches." Current Opinion in Biotechnology **10**: 263-268.

Parsek, M. R. et E. P. Greenberg (1999). "Quorum sensing signals in development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Methods in Enzymology **310**: 43-55.

Parsek, M. R. et P. Greenberg (2000). "Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria : A signaling mechanism involved in associations with higher organisms." Proceeding of the National Academy of Sciences **97**: 8789-8793.

Passador, L., J. M. Cook, M. J. Grambello, L. Rust et B. H. Iglewski (1993). "Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication." Science **260**: 1127-1130.

Pearson, J. P., E. C. Pesci et B. H. Iglewski (1997). "Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes." Journal of Bacteriology **179**: 5756-5767.

Picioreanu, C., M. C. M. Van Loosdrecht et J. J. Heijnen (1998). "Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach." Biotechnology Bioengineering **58**: 101-116.

Potera, C. (1996). "Biofilms invade microbiology." Science **273**: 1795-1797.