

THÈSE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

École doctorale de chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

Présentée par

**Denis COTTINET**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Sujet de thèse :

**Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia coli*  
étudiées en millifluidique digitale**

Soutenue le 11 décembre 2013 devant le jury composé de :

Mme Nicole COTTE-PATTAT	Rapportrice
M. Erick DENAMUR	Rapporteur
M. Jean-François JOANNY	Président du jury
M. Paul RAINEY	Examineur
M. Arjan DE VISSER	Examineur
M. Matthieu JULES	Examineur
M. Jérôme BIBETTE	Directeur de thèse
M. Jean BAUDRY	Co-Directeur de thèse



# Remerciements

---

Cette thèse est terminée je suis ravi du chemin parcouru. Ce bonheur tiens nécessairement à un peu d'autosatisfaction, avouons le, mais surtout à tout ce que j'ai reçu des personnes qui m'ont entourées et que j'ai rencontrées pendant ces trois ans. Alors je voudrais essayer de toutes les nommer et remercier.

En premier lieu, je remercie Jérôme Bibette pour m'avoir accueilli au LCMD en stage de master dès février 2010 puis pour les trois ans de doctorats. En tant que directeur de thèse ces conseils et sa vision du sujet ont évidemment été très importants. Mais la confiance et l'autonomie qu'il accorde volontiers m'ont fait progresser sur le plan personnel, et les succès obtenus ou observés au laboratoire m'ont rendu plus optimiste et plus ambitieux.

Autant que mon directeur de thèse, Jean Baudry a joué un rôle important dans ma formation durant les quatre années passées au laboratoire. Sa curiosité scientifique extrêmement vaste et sa passion pour les méthodes de mesures pertinentes et innovantes sont contagieuses et je lui suis reconnaissant de me les avoir transmis au moins en partie. Dans le cadre de ma mission doctorale d'enseignement, je le remercie de m'avoir fait confiance pour les TP de microscopie en Master 2 car c'est une expérience d'enseignement très enrichissante.

Je remercie Florence Condamine, technicienne au LCMD, pour son travail d'organisation et de maintenance au laboratoire qui nous permet de travailler dans des conditions exceptionnelles. Mais je remercie surtout Florence pour les expériences qu'elle a réalisées pour ma thèse et l'enthousiasme qu'elle a manifestée. Certaines discussions et certaines de ces exigences méthodologiques m'ont fait grandement progresser.

Je remercie également Nicolas Bremond qui a suivi mes travaux de loin mais qui à chaque fois que je l'ai sollicité sur des questions scientifiques ou professionnelles a toujours été disponible et a apporté un avis extérieur très précieux.

Mon jury de thèse a également contribué à ma thèse en portant un regard critique et constructif sur ce travail de physico-chimiste en microbiologie et je l'en remercie : Jean-François Joanny pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, Erick Denamur et Nicole Cotte-Pattat pour avoir accepté le

travail de rapporteur avec curiosité, Matthieu Jules pour sa disponibilité et son intérêt au moment de constituer ce jury, Arjan de Visser et Paul Rainey pour les raisons détaillées ci-après.

Tout d'abord, je remercie Arjan pour ses conseils et son soutien lorsque j'ai commencé sur ce sujet sans rien connaître en microbiologie. Il a joué un rôle de « phare », distant mais indispensable pour ce repéré et garder le cap. Il est pour moi un encadrant à part entière et sa présence le jour de ma soutenance m'a fait très plaisir. Je garde le souvenir d'une semaine formidable passée à Wageningen, qui sans pouvoir désigner précisément comment m'a véritablement permis de me saisir de mon sujet. Je remercie Merijn Salverda pour son accueil à cette occasion.

Je remercie également Paul Rainey pour l'honneur qu'il m'a fait en prenant part à mon jury et pour les discussions dans le dernier mois de ma thèse.

Au cours de ma thèse j'ai bénéficié des conseils avisés et de l'aide précieuse de nombreuses personnes pour apprendre la biologie et utiliser ses techniques. Je remercie Joelle Vinh, Yann Verdier et Iman Haddad du SMPB à l'ESPCI pour leur soutien et leur patience pour la caractérisation sur le gène *ag43* et le plaisir que j'ai eu à travailler avec eux. J'ai rencontré Christophe Beloin de l'Institut Pasteur par hasard, mais j'aurais pu et dû le solliciter plutôt au sujet du gène *ag43*. Son intérêt et ses conseils sur ce thème m'ont indéniablement permis de franchir un des caps qui font l'avancement d'une thèse. Clément Nizak, invité au laboratoire de Biochimie (LBC) de l'ESPCI, m'a lui fait profiter de son expérience et de sa connaissance de la communauté scientifique nationale et internationale au sein de laquelle ce travail de thèse s'inscrit. Je remercie Andrew Griffith pour le regard extérieur positif qu'il a porté régulièrement sur mon travail. Enfin je suis content de signaler le rôle particulier de Pierre Sivadon et Régis Grimaud de l'IPREM à Pau. Ils sont les premiers avoir suggéré l'implication de variations de phases comme celle d'*ag43* dans nos résultats sur la diversité phénotypique, je les remercie pour le temps qu'il nous ont fait gagner à ce moment là et pour le plaisir que j'ai eu à travailler en marge de ma thèse sur leur problématique.

Je remercie toutes les personnes qui ont fait de la millifluidique au laboratoire car nous avons partagé et partageons nos problématiques expérimentales ce qui est très agréable et fait souvent gagner un temps précieux. Fabien et Larysa ont été les pionniers de la millifluidique au LCMD. Wang et Laurent ont considérablement intégré le dispositif et le programme de pilotage. Je remercie Laurent également pour m'avoir accueilli en stage de master et m'avoir parfaitement préparé à ce moment là aux trois années de thèse qui ont suivi, mais aussi pour le meneur et animateur qu'il est au travail, auprès duquel on ne peut que cultiver l'optimisme et l'ambition. Shima, Jairo et Lianmei ont abordé des thèmes différents avec la technologie millifluidique et les échanges sur nos expériences respectives ont été source d'inspiration et de motivation dans une ambiance très agréables.

J'ai beaucoup apprécié de travailler avec les stagiaires qui sont passés pour quelques mois au laboratoire sur des sujets variés en marge de ma thèse car on ne peut pas faire tout le temps la même chose : Sarah Abidh, Ernest Mordret, Christoph Kleinschmidt, François Mazuel, Alexis Mazurier, Mélanie Jacquet et Joshua Ricouvier.

Les rôles de Lise, pour l'administratif et Jean-Yves pour la maintenance et l'entretien sont évidemment indispensables. Ils les remplissent d'une manière qui force l'admiration mais surtout je retiens qu'en plus ce sont des personnes agréables qui ont et vous donne chaque fois le sourire.

Au laboratoire, l'entraide et la convivialité sont des atouts précieux qui dépendent de toutes les personnes présentes, et pendant les quatre années passées au LCMD je n'ai eu que des bons moments.

Je pense en particulier à Damien et Donatien qui m'ont accepté dans leur bureau tout ce temps, ont élevé ma culture tennistique, ont répondu à mes questions bêtes avec leur bienveillance et à mes questions moins bêtes avec leur talent, et ils m'ont évité de sombrer totalement dans la biologie en me donnant à l'occasion quelques morceaux de physique et physico-chimie à mettre dans mon café. Je remercie toutes les autres personnes de notre bureau qui ont contribué à en faire un lieu de travail très agréable : Rory, Lianmei, Fanny et Christoph.

Je n'oublie pas les irréductibles du restaurant universitaire avec qui j'ai pris quasiment tous mes déjeuners : Leslie, Hugo, Perrine, puis Leopold et Guillaume. Certains de ces déjeuners sont mémorables et tous étaient une coupure agréable, merci pour votre patience quand on attendait plus que moi... Merci à Kevin pour sa présence occasionnelle et sympathique pour m'avoir permis, peut être malgré lui, de tenir mon objectif de soutenir ma thèse en 2013.

Enfin à tous ceux que j'ai côtoyés au laboratoire au fil de ces 4 années : Geneviève, Rachid, Julie G., Jean-Daniel, Meriem, Anette, Nicolas, Julie B., Kevin, Vlasis, Laurie, Céline, Gabrielle, Juliette, Edouard, Emmanuelle, Claire, Gwénaëlle, Audrey, et Florence A. : merci !

Je remercie tous mes amis de l'ESPCI, mes amis du lycée. Je remercie Jérémie Fredj et Thomas Leclercq. J'ai une pensée pour mes professeurs, en particulier M. Liot et Mme Travelet.

Je remercie mes parents et ma sœur pour leur soutien inconditionnel tout au long de mes études et surtout pour tout ce qu'ils m'ont donné depuis 28 ans.

Je remercie Sandra, pour m'avoir encouragé, pour avoir fait le choix difficile d'être celle qui s'éloigne pour le travail, pour avoir pris le train plus souvent qu'à son tour, et pour être à mes côtés au moment d'avancer vers de nouveaux projets.

À Clément Champlon



# Sommaire

---

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>11</b>
<b>CHAPITRE 1</b> .....	<b>13</b>
<b>1 ADAPTATION : L'ENJEU DE LA DIVERSITÉ</b> .....	<b>15</b>
1.1 THÉORIES DE L'ÉVOLUTION : DARWIN, LAMARCK ET LA NOTION D'ADAPTATION .....	15
1.1.1 <i>Lamarck</i> .....	16
1.1.2 <i>Darwin</i> .....	17
1.1.3 <i>Lamarckisme et Darwinisme</i> .....	17
1.1.4 <i>Le verdict du début du XX<sup>e</sup> siècle</i> .....	19
1.1.5 <i>Hérédité non-génétique : l'épigénétique</i> .....	20
1.2 LA BOÎTE À OUTILS DE L'ADAPTATION DE LA BACTÉRIE <i>E. COLI</i> .....	21
1.2.1 <i>Présentation de la bactérie E. coli</i> .....	21
1.2.1.1 Bactéries .....	21
1.2.1.2 Multiplication et expression des gènes .....	22
1.2.1.3 <i>Escherichia coli</i> .....	23
1.2.2 <i>Les ingrédients de l'adaptabilité</i> .....	24
1.2.2.1 Adaptation et adaptabilité .....	24
1.2.2.2 Mécanismes de diversification .....	25
1.2.2.3 La diversification non-génétique .....	26
1.2.2.4 La diversification génétique .....	29
1.3 APPROCHES EXPÉRIMENTALES DE L'ADAPTATION ET DE LA DIVERSITÉ .....	32
1.3.1 <i>L'apport d'outils expérimentaux quantitatifs</i> .....	32
1.3.2 <i>Évolution expérimentale sur les micro-organismes</i> .....	36
1.4 CONCLUSION .....	38
<b>CHAPITRE 2</b> .....	<b>41</b>
<b>2 OUTIL DE PHÉNOTYPAGE EN MILLIFLUIDIQUE DIGITALE</b> .....	<b>43</b>
2.1 VERS LA MILLIFLUIDIQUE DIGITALE .....	43
2.1.1 <i>Microfluidique</i> .....	43
2.1.2 <i>Microfluidique diphasique ou digitale</i> .....	44
2.1.3 <i>Millifluidique digitale</i> .....	44
2.2 LE DISPOSITIF MILLIFLUIDIQUE POUR LE PHÉNOTYPAGE .....	46

2.2.1	<i>Fabrication des micro-bioréacteurs</i> .....	48
2.2.1.1	Formation de gouttes .....	48
2.2.1.2	Physico-chimie et choix des matériaux.....	49
2.2.1.3	Gradients de composition .....	51
2.2.2	<i>Incubation et manipulation du train de gouttes</i> .....	53
2.2.3	<i>Tri et distribution des gouttes</i> .....	54
2.3	MESURE DANS LES BIORÉACTEURS.....	56
2.3.1	<i>La bactérie MC4100 YFP</i> .....	56
2.3.2	<i>Mesure de fluorescence</i> .....	57
2.3.3	<i>Acquisition du signal de fluorescence</i> .....	58
2.4	ANALYSE DES DONNÉES.....	59
2.4.1	<i>Conditions de culture, calibration et seuil de détection</i> .....	59
2.4.2	<i>Encapsulation et inoculum</i> .....	60
2.4.2.1	Encapsulation simple.....	60
2.4.2.2	Co-encapsulation.....	61
2.4.3	<i>Analyse des courbes de croissance</i> .....	64
2.5	CONCLUSION .....	70
<b>CHAPITRE 3 .....</b>		<b>73</b>
<b>3</b>	<b>DYNAMIQUE DE POPULATION DE LA VARIATION DE PHASE DU GÈNE AG43.....</b>	<b>75</b>
3.1	VARIATION DE PHASE DU GÈNE AG43 : ÉTAT DE L'ART .....	76
3.1.1	<i>Variation de phase</i> .....	76
3.1.2	<i>Le gène ag43</i> .....	77
3.1.3	<i>Identification et comptage des phénotypes</i> .....	79
3.1.4	<i>Fréquences de transition</i> .....	79
3.2	PHÉNOTYPAGE D'AG43 EN MILLIFLUIDIQUE .....	82
3.2.1	<i>Discriminer les états phénotypiques</i> .....	82
3.2.2	<i>Vérifier le rôle d'ag43</i> .....	84
3.2.2.1	Western Blot.....	84
3.2.2.2	Analyse protéomique LC-MS <sup>2</sup> .....	85
3.2.2.3	Immunofluorescence.....	85
3.3	DYNAMIQUE PHÉNOTYPIQUE D'UNE POPULATION CLONALE.....	86
3.3.1	<i>Contribution de la variation de phase</i> .....	86
3.3.1.1	Protocole .....	86
3.3.1.2	Détermination des fréquences de transition.....	86
3.3.1.3	Croissance en milieu homogène.....	87
3.3.1.4	Famine en milieu homogène .....	87
3.3.2	<i>Compétition intra-clonal</i> .....	89
3.3.2.1	Dynamique de population en milieu statique .....	89
3.3.2.2	Modèle incluant la compétition .....	90
3.3.2.3	Colonisation de niche et préservation de fonction.....	92
3.4	CONCLUSION .....	95
<b>CHAPITRE 4 .....</b>		<b>97</b>
<b>4</b>	<b>ADAPTATION À UNE FAIBLE CONCENTRATION D'AMPICILLINE .....</b>	<b>99</b>
4.1	INTRODUCTION .....	99
4.1.1	<i>Contexte</i> .....	99
4.1.2	<i>Objectifs</i> .....	100
4.1.3	<i>Méthode expérimentale</i> .....	102
4.2	ADAPTATION À UNE FAIBLE CONCENTRATION D'ANTIBIOTIQUE .....	102

4.2.1	<i>Ajuster le défi adaptatif</i> .....	102
4.2.2	<i>Résistance à l'antibiotique acquise par la population</i> .....	103
4.3	DYNAMIQUE PHÉNOTYPIQUE DE LA POPULATION.....	104
4.3.1	<i>La population initiale</i> .....	105
4.3.2	<i>Apparition de diversité</i> .....	106
4.3.3	<i>Relaxation en milieu permissif</i> .....	111
4.4	ANALYSE DES PHÉNOTYPES.....	115
4.4.1	<i>Analyse de la fluorescence du phénotype isolé</i> .....	115
4.4.2	<i>Résistance à l'ampicilline des classes phénotypiques</i> .....	117
4.5	CONCLUSION.....	120
<b>CHAPITRE 5</b> .....		<b>123</b>
<b>5</b>	<b>DYNAMIQUE DE POPULATION PENDANT LA PHASE STATIONNAIRE</b> .....	<b>125</b>
5.1	LA PHASE « STATIONNAIRE » .....	125
5.2	PRÉSENTATION DE L'EXPÉRIENCE.....	129
5.2.1	<i>Cultures en phase stationnaire</i> .....	129
5.2.2	<i>Dynamique globale de population</i> .....	131
5.2.3	<i>Modification de l'environnement</i> .....	132
5.2.4	<i>Croissance dans l'environnement modifié</i> .....	133
5.3	RÉSULTATS DE L'ANALYSE PHÉNOTYPIQUE.....	134
5.3.1	<i>Phénotype initial et identification de la diversité</i> .....	134
5.3.2	<i>Diversification dans l'environnement homogène</i> .....	135
5.3.3	<i>Diversification dans l'environnement hétérogène</i> .....	137
5.3.4	<i>Convergence vers un phénotype ?</i> .....	139
5.3.5	<i>Dynamiques variables et divergence</i> .....	144
5.3.6	<i>Relaxation en croissance exponentielle</i> .....	146
5.4	CONCLUSION.....	148
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....		<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>153</b>



# Introduction

---

Les bactéries sont partout. Leur capacité à s'adapter aux conditions les plus variées et les plus extrêmes en font une composante majeure de la biodiversité. Elles sont également incontournables dans les cycles biogéochimiques. Pour l'Homme, les bactéries sont évidemment responsables de nombreuses maladies, mais elles remplissent également une fonction nutritionnelle importante dans notre tube digestif. Elles sont enfin un véritable outil industriel, depuis longtemps pour les transformations agroalimentaires comme la fermentation du lait, et plus récemment pour la production d'enzymes ou de médicaments. L'omniprésence des bactéries tient beaucoup à leur remarquable capacité d'adaptation. Comprendre cette adaptabilité permettra de mieux prévenir et soigner les infections sur le long terme. À l'heure du développement durable, ces connaissances pourraient aussi ouvrir un grand potentiel d'applications industrielles et agricoles.

Cette thèse porte sur le développement et l'application d'un nouvel outil expérimental pour l'étude des dynamiques d'adaptation au sein d'une population de bactéries *Escherichia coli*.

En présentant le concept d'adaptation dans le contexte de la théorie de l'Évolution, nous mettrons en évidence le lien étroit entre l'étude du processus d'adaptation et l'analyse de la diversité au sein d'une population. Puis, nous définirons le cahier des charges de notre outil d'après les connaissances actuelles des mécanismes de diversification et les approches expérimentales récentes sur l'adaptation des bactéries : Comment réaliser efficacement une mesure quantitative pertinente, sur chaque bactérie d'un échantillon le plus large possible ?

La technologie mise en œuvre pour répondre à ce besoin est présentée dans le chapitre 2. Nous verrons les avantages du système millifluidique choisi, pour opérer un grand nombre de cultures en parallèle dans des conditions homogènes. Les courbes de croissances, enregistrées pour chaque population issue d'une bactérie unique, sont quantitatives et elles constituent notre lecture phénotypique. Nous décrirons la précision de cette mesure et la résolution phénotypique qui en résulte.

Ce nouveau dispositif de mesure sera ensuite appliqué à trois cas qui correspondent à des situations de laboratoire en apparence banales. Pour autant, ces résultats sont significatifs pour les dynamiques

d'adaptation d'*E. coli* dans ses habitats naturels. Nous avons d'abord mesuré la dynamique de la composition phénotypique associée à la variation de phase du gène *ag43*. Elle est bien connue pour être responsable de l'hétérogénéité de morphologie des colonies d'*E. coli* sur boîte de Petri. Puis, nous avons étudié l'effet, sur la population de bactéries, d'une concentration d'antibiotique sub-inhibitrice, couramment utilisée pour prévenir d'éventuelles contaminations. Il s'agit d'un modèle pour des situations de pollution de l'environnement par des traces d'antibiotiques qui sont soupçonnées de favoriser l'émergence de bactéries résistantes. Enfin, nous avons exploré la diversification et l'adaptation d'une population qui a épuisé son environnement. Ces conditions environnementales ont été moins étudiées que la croissance mais elles correspondent pourtant à des situations couramment rencontrées par les bactéries dans la nature.

Dans le troisième chapitre, nous appliquons notre méthode, pour mesurer, dans différents environnements, la dynamique des deux états d'expression du gène *ag43* dans une population. Pour la première fois, grâce à la simplicité et la fiabilité de notre mesure, nous pouvons suivre la dynamique de population sur des temps longs et sans le biais que pourrait introduire un système rapporteur.

Après ce premier cas simple, se concentrant sur deux états phénotypiques connus, nous nous intéressons à un système sans préjugé sur la diversité attendue. Nous étudions l'augmentation de la résistance à l'antibiotique d'une population exposée à une concentration inférieure à son seuil de sensibilité. Dans le quatrième chapitre, grâce à l'analyse de cellules uniques, nous étudions la diversité phénotypique qui sous-tend l'adaptation moyenne de la population.

Enfin, dans le dernier chapitre, une population de bactéries est maintenue pendant un mois dans un environnement dont elle a épuisé les ressources. La dynamique de la diversité phénotypique, que nous suivons au cours du temps, révèle de multiples chemins d'adaptation, mais semble comporter une part de déterminisme.

# Chapitre 1

---

## Adaptation : l'enjeu de la diversité

---



# 1 Adaptation : l'enjeu de la diversité

Dans ce chapitre, nous souhaitons présenter la base de connaissance<sup>1</sup> et les travaux récents en biologie qui nous ont guidés dans la conception de notre outil de phénotypage et des expériences qui font la présente thèse.

Dans une première partie, nous relaterons un bref historique des théories de l'Évolution. Il est en effet difficile d'appréhender la question de l'adaptation sans la perspective de l'Évolution. Nous aborderons ensuite le concept d'adaptabilité et le rôle de la diversité intra-population dont nous donnerons les principales sources génétiques et non-génétiques. Nous présenterons enfin les approches expérimentales de la variabilité phénotypique, de l'Évolution et de l'adaptation qui ont orienté ou éclairé nos travaux. Tout au long de cette partie, une attention particulière sera portée au rôle accordé ou non à l'environnement et ses propriétés, et à l'importance d'accumuler des données quantitatives sur la diversité intra-population.

## 1.1 Théories de l'Évolution : Darwin, Lamarck et la notion d'adaptation

Les questions sur l'origine de la vie ou le vivant en général exercent sur nous une fascination particulière car elles proposent des réponses sur ce que nous sommes. Elles sont également polémiques car elles sont de nature à déstabiliser les réponses personnelles à ce questionnement. Elles peuvent entrer en collision avec les croyances. Or, précisément, l'histoire des théories de l'évolution est marquée par cette interaction particulière avec la culture et la religion. Cette relation délicate entre la biologie et les croyances est renforcée par deux points faibles qui découlent de la complexité du vivant. D'abord la généralisation et la simplification sont très difficiles voire dangereuses. Ensuite, parce qu'il est délicat de connaître et maîtriser tous les paramètres, la preuve expérimentale laissera toujours une faille plus grande que dans d'autres domaines scientifiques. Faille que le sceptique pourra toujours exploiter. Pour finir sur ce lien entre croyance et théorie de l'évolution, les textes, y compris ceux d'Aristote, peuvent être réinterprétés à la lumière des connaissances actuelles. Traductions et véritables intentions de l'auteur peuvent être discutées exactement comme pour les textes religieux.

La pensée actuelle de l'évolution a germé au XVIII<sup>e</sup> siècle. Elle est née des observations des naturalistes et des géologues. D'une part on commence à classer les espèces selon des critères morphologiques. D'autre part la géologie et l'étude des fossiles révèlent que la terre et la vie à sa surface ont changé au cours du temps.

À l'époque, pour expliquer la disparition des espèces fossiles, et l'organisation du vivant, on imagine des événements violents de courte durée, qui modifient ponctuellement l'ordre établi. Cette théorie, appelée par la suite le catastrophisme, a le mérite de ne pas remettre en cause les textes de la Bible. Mais à la fin du XVIII<sup>e</sup> siècle et au début du XIX<sup>e</sup>, une autre explication apparaît. D'abord en

---

<sup>1</sup> Une grande partie de la synthèse qui est proposée au début de ce chapitre s'appuie sur des informations de l'encyclopédie libre Wikipedia (« Wikipédia:Accueil principal » 2013) ; sur quelques lectures : (Maynard Smith et Szathmáry 1997)(Dawkins 2003)(Smith 2001) ; enfin quelques extraits d'ouvrages de Pietro Corsi ([http://hsmt.history.ox.ac.uk//staff/corsi\\_pietro.htm](http://hsmt.history.ox.ac.uk//staff/corsi_pietro.htm))

géologie, avec l'uniformitarisme de James Hutton, qui énonce que les forces responsables des modifications passées de la terre, « ont agi en continu et agissent encore ». Cette idée de transformation continue interpelle quelques naturalistes, dont Jean Baptiste Lamarck qui formalise une théorie de la transformation continue des espèces.

### 1.1.1 Lamarck

Jean- Baptiste de Lamarck (1744-1829) observe que les changements que la terre a connus doivent avoir modifié les conditions de vie des espèces. Si l'environnement des êtres vivants a changé en permanence et que ceux-ci sont aujourd'hui aptes à vivre, c'est qu'ils se sont adaptés. L'adaptation, c'est la modification qui confère l'aptitude.

Lamarck postule que la diversité du vivant et l'adéquation à son environnement qui le caractérisent sont le produit de modifications continues qui fournissent une solution à des besoins. Il soutient un mode de pensée différent du catastrophisme qui domine à l'époque. La voie vers la théorie de l'Évolution s'ouvre progressivement. Il exprime son idée dans la mesure de la compréhension du vivant de l'époque. Il propose ainsi une source des variations qui est liée à sa représentation des organes et de leur développement. Le vivant est caractérisé par le mouvement et l'organisation des fluides. La modification et le fonctionnement des organes sont régis par l'usage et par l'intention de l'organisme vivant.

Ses idées sont synthétisées dans son exemple du cou de la girafe. Les générations successives de girafes se sont efforcées de manger les feuilles au sommet des arbres. Cet effort constant et l'utilisation de l'organe ont conduit à l'allongement graduel du cou. On y retrouve bien la théorie transformiste. Ce sont des modifications progressives en réponse aux exigences de l'environnement qui sont responsables de la complexité et de la diversité du vivant observées. Mais cette illustration choisie par Lamarck a souvent été reprise pour critiquer sa théorie, notamment car elle met en évidence les mécanismes imaginés par Lamarck pour expliquer le transformisme. L'action ou les exigences de l'environnement modifient directement l'organe et les changements acquis sont transmis à la génération suivante. Il s'appuie sur la loi d'« usage et de non-usage » selon laquelle un organe se développe à mesure qu'on l'utilise ou se réduit s'il ne sert pas. Il reprend également le principe d'hérédité des caractères acquis très largement admis à l'époque. Or ces deux mécanismes seront mis en cause par les progrès de la biologie.

Lamarck est très souvent associé au thème de la transmission des caractères acquis. Peut-être parce que son exemple de la girafe est très évocateur. Mais surtout les théories du Lamarckisme et le Néolamarckisme se sont attachées à développer et à démontrer ce concept d'hérédité des modifications induites par l'environnement. Cette partie des thèses de Lamarck a progressivement éclipsé la partie la plus novatrice et pertinente qui est l'idée du transformisme.

Lamarck joue un rôle important dans le changement de conception sur l'apparition et la modification des espèces. Mais les forces agissantes qu'il propose pour justifier d'une transformation progressive due à l'environnement ont été discréditées par les progrès de la biologie. Cinquante ans plus tard, Charles Darwin va proposer un mécanisme central et dominant pour justifier le transformisme.

### 1.1.2 Darwin

Charles Darwin (1809-1882) publie *De l'origine des espèces* en 1859. Il n'est pas l'auteur d'une théorie de l'évolution mais en donne un des ingrédients principaux : la sélection naturelle. Charles Darwin est convaincu que le transformisme explique la diversité d'espèces observée lors de son voyage autour du monde et dans les collections naturalistes. Il cherche un mécanisme qui dirige cette évolution graduelle vers une meilleure adaptation des espèces à leur environnement, une spécialisation responsable de la spéciation. Dans la quête de ce processus adaptatif il ne croit pas du tout à un rôle direct de l'intention et du besoin, promoteurs des modifications, comme l'imagine Lamarck. Le germe de sa théorie sur la sélection naturelle lui vient à la lecture en 1838 de la sixième édition de *l'Essai sur le Principe de Population* de Malthus. Selon ce dernier, la croissance des populations est exponentielle et elle conduit inévitablement à une crise des ressources dont la disponibilité est limitée ou ne peut augmenter au même rythme. Darwin transpose l'idée de l'économiste au monde vivant et imagine alors le « conflit entre les espèces ». La limitation des tailles de populations que l'environnement peut supporter est responsable d'une sélection pour les individus les plus performants. Darwin considère qu'il y a constamment dans la nature des variations sur les individus. Ces variations influencent le succès des individus qui les portent et, en conséquence, le succès de leur espèce. La sélection naturelle détermine les changements qui sont conservés et ceux qui disparaissent en fonction des performances des individus. Darwin ne fait aucune hypothèse sur l'origine des variations, il propose un mécanisme qui opère un choix parmi les variations qui ne manquent pas d'apparaître.

Le mécanisme de sélection naturelle justifie une évolution adaptative, ou neutre, qui dépend indirectement de l'environnement dans lequel se trouvent les espèces. Lamarck supposait une causalité directe entre l'environnement et les variations susceptibles d'apparaître. Darwin considère que les modifications apparaissent sans détermination mais que seuls les changements adaptatifs ou neutres sont conservés a posteriori. Le mécanisme de Darwin suppose ou accepte une source permanente de variation du vivant sans la justifier. Cette hypothèse n'a rien d'évident à l'époque et ne sera véritablement justifiée qu'avec le développement de la génétique au début du XX<sup>e</sup> siècle.

### 1.1.3 Lamarckisme et Darwinisme

Lamarckisme et Darwinisme sont deux théories de l'évolution qui vont au-delà de ce que proposent respectivement Lamarck et Darwin. Ce qui les oppose n'en découle pas moins d'un écart initial entre les idées des précurseurs dont les deux théories se réclament.

Les deux théories ont en commun qu'elles cherchent à rendre compte de l'existence des espèces comme on les observe dans la nature. Les espèces vivantes sont caractérisées par leur grande diversité, leur adaptation à leurs environnements respectifs, et leur capacité à se reproduire. Ces trois caractéristiques imposent trois grands principes : variation, adaptation et hérédité. Les deux théories appartiennent au transformisme : le monde vivant est le fruit de modifications successives qui ont conduit aux espèces observables de nos jours. Une source de changements graduels est donc nécessaire : la variation. Lamarckisme et Darwinisme partagent l'intuition que la diversité des habitats et l'adaptation à ces habitats sont responsables de la diversité des espèces. Ce point implique bien de justifier d'une tendance à l'adaptation. Enfin la reproduction et la conservation de certains caractères à travers les âges imposent le principe d'hérédité.

Lamarck suppose que les variations sont par nature adaptatives car elles découlent directement d'un besoin ou même d'une intention de l'organisme vivant. L'environnement est responsable de ce besoin ou de cette intention. Cette hypothèse explique l'adaptation à l'environnement qu'on observe dans la nature. Au passage, l'adaptation, la satisfaction des besoins, constitue la raison ou la source des modifications graduelles. Cette hypothèse découle de surcroît très naturellement de la conception du vivant de Lamarck comme nous l'avons évoqué. Selon le Lamarckisme, l'environnement modèle les espèces directement, car il est la cause de modifications adaptatives. La problématique centrale du Lamarckisme est de vérifier que le principe d'hérédité est valable pour les modifications adaptatives postulées. Les modifications sont supposées induites et adaptatives, mais sont-elles héréditaires ? Cette question deviendra la principale critique opposée au Lamarckisme.

Darwin peut économiser toute hypothèse sur le déterminisme des variations car son mécanisme de sélection naturelle est adaptatif. En revanche, il suppose une source de changements sans raison apparente et arbitraire. Parmi les changements qui relèvent d'une tendance intrinsèque au vivant, certains peuvent bien être héréditaires. Darwin n'exclut pas que l'environnement puisse être aussi le responsable immédiat des variations. Il est même convaincu de l'hérédité des caractères acquis. Mais ce n'est pas nécessaire pour sa théorie. Plus tard le Darwinisme, se débarrasse et critique la transmission des caractères acquis. D'autres variations qu'on suppose héréditaires peuvent rendre compte de l'adaptation et de la diversité par le processus de sélection naturelle. Le darwinisme va même jusqu'à considérer que l'apparition des variations est indépendante des conditions environnementales. Cette conviction n'est ni évidente ni nécessaire mais elle constitue une véritable rupture avec le Lamarckisme. L'environnement et l'organisme vivant ne sont plus ni responsables ni maîtres de la variation. Les théories du Lamarckisme ou Néolamarckisme sont en partie motivées par le refus d'une évolution assujettie au hasard, via des modifications totalement aléatoires. Les théories de l'évolution lamarckiennes défendent un rôle inducteur de l'environnement, voire de l'individu, dans l'apparition des variations. Le Darwinisme peut tout à fait intégrer une source lamarckienne de modifications : certains caractères héréditaires sont acquis sous l'effet de l'environnement, ils participent à la compétition darwinienne, et il s'en trouve même surement qui sont adaptatifs et sont sélectionnés. Exclure leur existence revient à amputer inutilement la théorie d'une source de variations. Or la contribution de cette source particulière d'innovation dans l'Évolution reste à évaluer. Les modifications qu'on qualifiera de Lamarckienne semblent plus rares mais elles pourraient avoir de plus grandes chances d'être utiles.

La part idéologique et la polémique dans l'opposition entre les deux théories ont abouti à une exclusion mutuelle, sans réelle justification, aux conséquences à long terme. Nous allons voir que le Darwinisme domine logiquement tout le XX<sup>e</sup> siècle car il n'a pas à justifier son principe d'hérédité et n'a aucun a priori sur l'origine des modifications progressives soumises à la sélection naturelle. Il est donc mieux préparé à intégrer les progrès rapides de la biologie. Mais le Darwinisme et le Lamarckisme se sont partagé durablement les sources de variations sans raison. La méfiance vis-à-vis de l'induction de variations par l'environnement ou l'existence de mécanismes d'hérédités variés est encore aujourd'hui la trace de l'affrontement de ces deux théories.

### 1.1.4 Le verdict du début du XX<sup>e</sup> siècle

En 1882 August Weismann (1834-1914) propose une théorie distinguant le « soma » du « germe ». Seul un certain « plasma germinatif » participe à l'hérédité. Les modifications du soma ne sont donc pas transmises à la génération suivante. August Weismann était convaincu de l'hérédité des caractères acquis comme Lamarck et Darwin jusqu'à l'élaboration de sa théorie. Cette séparation entre l'expérience du corps et l'information transmise à la descendance est décisive. Elle porte un coup terrible au Lamarckisme. Si l'hérédité des caractères acquis est exclue, les caractères adaptatifs induits par l'environnement ne participent plus à l'évolution.

Dans la première moitié du XX<sup>e</sup> siècle l'étude de la division cellulaire et la redécouverte des lois de Mendel sur l'hérédité font naître la génétique. La génétique explique l'hérédité des caractères grâce au concept du gène qui n'a d'abord aucune réalité moléculaire identifiée. En 1911, Thomas Morgan décrit une « mutation » génétique responsable de l'apparition d'un caractère nouveau. Il identifie ainsi un mécanisme source de variation, bien qu'il en ignore le détail moléculaire. La variation est effectivement intrinsèque au vivant sous la forme d'une hérédité imparfaite. Ces progrès expliquent et justifient de manière éclatante deux postulats du darwinisme : la variation et l'hérédité.

L'idée d'une variation aléatoire indépendante des conditions environnementales est également renforcée à cette époque, notamment par l'expérience de Luria et Delbrück (1943). Ils montrent que les mutations responsables d'un nouveau caractère apparaissent de façon aléatoire dans une population avant qu'elle soit exposée aux conditions sélectives pour ce caractère.

Pour cela, ils testent l'apparition de mutants résistant à un phage (virus des bactéries). Ils cultivent plusieurs populations de bactéries en parallèle dans un milieu liquide non sélectif c'est-à-dire sans phages. (arborescence Figure 1-1). Après la croissance, ils étalent un échantillon de chaque population sur une boîte de Petri qui contient des phages. C'est l'étape de sélection. Cette seconde culture est figurée par la barquette jaune sur le schéma. Le nombre de colonies formées correspond au nombre de bactéries résistantes. Ce sont les points rouges dans le milieu jaune sur la figure. Ils prédisent une fluctuation de ce nombre, d'une population à l'autre, plus faible dans le cas de l'induction (Figure 1-1 A) que dans le cas de mutations spontanées (Figure 1-1 B). En effet la probabilité  $p$  de succès de l'induction de la résistance est supposée la même pour tous les individus de toutes les populations. Si on expose un nombre  $N$  de bactérie au phage, la distribution du nombre de résistants observés suit une Loi de Poisson de paramètre  $Np$ . En revanche dans le cas de mutations spontanées le nombre de

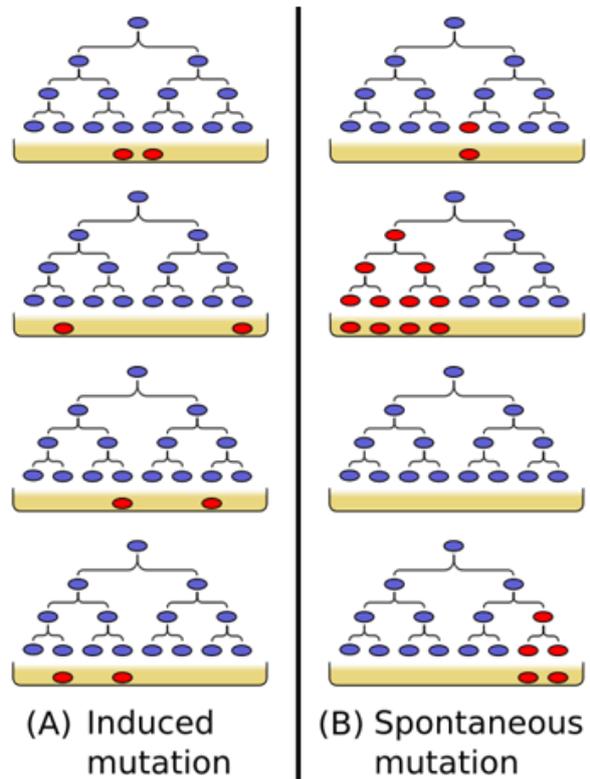


Figure 1-1

Représentation de l'expérience de Luria et Delbrück. Les conséquences de chaque hypothèse sur l'apparition et l'observation de résistants (rouges) sont schématisées. A : mutation induite ; B : mutation spontanée. Voir détail dans le texte.

Madeleine Price Ball (wikipedia)

résistants observés dépend du moment auquel intervient la première mutation (point rouge le plus haut dans l'arborescence). Si la mutation intervient dans les toutes premières générations de culture la fraction de résistant sera grande. Dans un cas extrême inverse, elle peut ne pas se produire. Des situations statistiques analogues sont détaillées dans le chapitre 2 et les chapitres 3. Les deux situations sont illustrées par la Figure 1-1. Luria et Delbrück constatent une forte fluctuation sur le nombre de résistants observés indiquant l'existence de mutations spontanées nécessaires à la résistance. Rigoureusement, ce résultat ne tranche pas de manière exclusive en faveur de l'un des deux mécanismes mais il montre que des mutations aléatoires favorisant la résistance surviennent effectivement avant le changement d'environnement qui les sélectionnera.

À la fin des années 40, la théorie synthétique de l'Évolution intègre la sélection darwinienne, la théorie de l'hérédité mendélienne et la génétique des populations. Elle devient le paradigme de la biologie de l'évolution pour tout le XX<sup>e</sup> siècle.

### 1.1.5 Hérité non-génétique : l'épigénétique

Il faudra attendre les années 2000 pour que l'effet de l'environnement sur l'émergence de variations phénotypiques héréditaires soit à nouveau sérieusement considéré. De nombreuses études montrent ou suggèrent l'existence de mécanismes d'hérédité qui ne font pas intervenir de variation de la séquence de l'ADN (Pembrey 2002). Cette hérédité non-génétique est dite épigénétique. Elle semble être plus sensible aux conditions environnementales et pourrait, à ce titre, jouer un rôle significatif dans l'adaptation des populations et l'évolution (Jablonka 2013). Le nom de Lamarck ne manque évidemment pas de resurgir à l'occasion. Les mécanismes moléculaires de l'hérédité épigénétique ne sont pas encore bien élucidés. Ils sont particulièrement complexes chez les organismes pluricellulaires sexués. La distinction, conceptualisée par Weismann en 1882, entre lignée somatique et lignée germinale constitue effectivement une sérieuse barrière.

Les microorganismes unicellulaires constituent un cas particulier qui est plus simple sur ce point. L'étude de l'adaptation et de l'évolution de ces organismes peut aider à cerner le rôle effectif de l'environnement dans le processus adaptatif. Les enjeux économiques et sanitaires immédiats de la compréhension de l'adaptabilité des microorganismes sont autant de raisons supplémentaires de s'y intéresser. L'adaptation d'une colonie de bactéries à une transition environnementale constitue une étape ou un pas élémentaire de la grande Évolution, on parle à ce titre de Microévolution. La source de variabilité était un des points cruciaux dans la construction de la théorie de l'Évolution. La diversification intra-population est également importante pour considérer l'adaptation à un unique changement d'environnement. Dans le paragraphe suivant nous allons présenter les sources de variations pour une bactérie comme *E. coli*. Comment la variabilité contribue-t-elle à l'adaptabilité des bactéries ?

## 1.2 La boîte à outils de l'adaptation de la bactérie *E. coli*.

Nous avons présenté dans le paragraphe précédent un aperçu de la progression des concepts de l'Évolution et de l'adaptation. Dans cette partie, nous commencerons par présenter les éléments de biologie et microbiologie dont nous avons eu besoin dans notre étude. Nous expliciterons ensuite le concept d'adaptabilité et comment les mécanismes de diversification génétiques et non-génétiques y contribuent.

### 1.2.1 Présentation de la bactérie *E. coli*

De manière succincte, nous présentons ici la bactérie *E. coli* et quelques éléments de biologie cellulaires (Prescott, Harley, et Klein 2003).

#### 1.2.1.1 Bactéries

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires. Elles sont capables de se reproduire de manière autonome à la différence des virus qui ont besoin de détourner la machinerie d'une cellule pour se reproduire. La taille des bactéries varie de 1 à 10  $\mu\text{m}$ , et elles pèsent de l'ordre de  $10^{-12}$  grammes. Elles sont présentes partout, on connaît quelques 8 000 espèces mais on estime qu'il en existerait 100 à 1000 fois plus.

Ce sont des petits sacs de molécules séparés de l'environnement extérieur. Cet ensemble a la capacité remarquable de se copier à l'identique en puisant énergie et réactifs primaires dans le monde extérieur.

En tant que procaryote, la structure de la cellule est simple. Le volume intérieur, appelé cytoplasme, est délimité par la membrane plasmique. La membrane contrôle les flux entrant et sortant de la bactérie et sert de support à certaines enzymes. Ce volume est continu et ne contient en général pas de structure secondaire complexe. Toutes les réactions chimiques sources d'énergie, ou permettant l'entretien et la multiplication de la bactérie, ont lieu dans le cytoplasme. Elles peuvent néanmoins être localisées, sur la membrane par exemple.

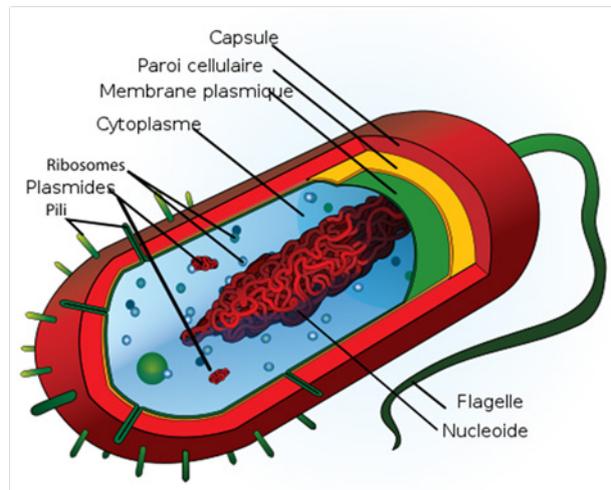


Figure 1-2 Schéma d'une bactérie. (Wikipedia)

Les bactéries n'ont pas de noyau délimité par une membrane pour isoler le matériel génétique. L'information génétique est supportée par l'acide désoxyribonucléique (ADN). Cet ADN est rassemblé sous la forme d'un ou plusieurs chromosomes. La structure de ces chromosomes est une double hélice d'ADN circulaire pelotonnée sous l'effet de surenroulements.

Au-delà de la membrane cytoplasmique, ou plasmique, les bactéries possèdent une paroi constituée de peptidoglycane. Elle assure la cohésion mécanique de la cellule. Certaines bactéries possèdent uniquement une paroi épaisse et complexe. Celle-ci reste perméable au colorant de Gram et les bactéries correspondantes sont dites Gram positives. Les autres bactéries possèdent une paroi de peptidoglycane plus simple et surtout une membrane externe. Cette dernière est imperméable au

colorant de Gram, les bactéries possédant cette structure sont Gram négatives. C'est le cas d'*E. coli*. On appelle périplasma le volume entre les deux membranes qui contient la paroi.

Les bactéries possèdent souvent des structures extracellulaires. Ces structures ne sont pas nécessaires et donc pas toujours présentes. Les cils et flagelles permettent le déplacement actif des bactéries. Les pili et fimbriae sont des filaments disposés à la surface des bactéries. Ils jouent un rôle prépondérant pour l'adhésion aussi bien à la surface d'autres organismes que sur des surfaces inertes. Un cas particulier est le pili sexuel. Il est responsable de l'appariement de bactéries, appelé conjugaison, qui leur permet de mélanger leur patrimoine génétique. L'expression du pili sexuel est due à un fragment d'ADN indépendant du chromosome appelé plasmide F ou facteur F. La synthèse de polymères excrétés à l'extérieur de la cellule peut constituer une capsule dont le rôle est de protéger les bactéries de diverses agressions.

Enfin les bactéries sont des organismes unicellulaires elles peuvent donc se développer totalement individualisées, de manière planctonique. Mais il est très fréquent de les voir croître sous forme de structures collectives comme les biofilms, les filaments ou les agrégats.

### 1.2.1.2 Multiplication et expression des gènes

Nous avons évoqué la propriété remarquable des bactéries à se reproduire à l'identique. Lors de la multiplication, deux cellules se forment à partir d'une cellule mère. Ce processus est le cycle cellulaire. Chez la bactérie il se décompose en trois étapes :

- l'initiation,
- la réplication de l'ADN chromosomique,
- la division cellulaire.

La période d'initiation, prépare la réplication du chromosome. À la fin de la réplication de l'ADN chromosomique, les deux copies du chromosome bactérien migrent chacune, selon un mécanisme actif, vers une des deux futures cellules filles.

Dans le même temps le volume de la cellule mère augmente jusqu'à une taille critique qui déclenche la division de la cellule en deux cellules filles.

Lors de ce processus, la synthèse de tous les constituants nécessaires pour permettre le renouvellement et l'accroissement implique un grand nombre de réactions chimiques couplées. Il s'agit du métabolisme. Une partie des réactions vise à stocker de l'énergie, elle constitue le catabolisme. L'autre partie est l'anabolisme : elle utilise l'énergie pour la synthèse des molécules et macromolécules utiles.

Cette chimie est régulée, organisée et accélérée par les protéines. Ce sont des polymères constitués d'acides aminés. Les protéines catalysent les réactions chimiques. Elles interviennent dans le transport des nutriments de l'environnement extérieur vers le cytoplasme et dans l'élimination des déchets. Elles peuvent également réguler l'activité et la production d'autres protéines.

L'ensemble des protéines présentes dans une bactérie sont synthétisées d'après l'information contenue dans l'ADN. En effet, la séquence des acides aminés d'une protéine est codée dans la succession de bases azotées, nucléotides, de l'ADN qui constitue un gène. L'ensemble des gènes constitue le génome.

La synthèse des protéines se déroule en deux étapes principales : la transcription et la traduction. Lors de la première étape, un acide ribonucléique messager (ARNm) porteur d'une séquence de bases azotées synonyme est synthétisé par l'ARN polymérase d'après l'ADN. Puis l'ARNm est traduit en protéine par le ribosome.

L'expression d'un gène correspond le plus souvent à la synthèse de la protéine dont il contient le code. Certains gènes codent pour des molécules d'ARN. L'expression du gène est concrétisée par la réalisation de sa fonction par la protéine. L'expression des gènes est régulée par de nombreux mécanismes lors des différentes étapes de la synthèse des protéines. Les interactions entre les protéines, l'ARN, et l'ADN, qui peuvent être modifiées par des molécules de l'environnement, induisent ou répriment l'expression des gènes. Ce réseau complexe d'interactions permet de répondre aux exigences de différents environnements et d'exprimer les fonctions lorsqu'elles sont nécessaires. La régulation de l'expression des gènes, ou régulation génétique, a été démontrée expérimentalement par Jacob et Monod (1961).

L'ensemble des propriétés observables d'une cellule dans un environnement donné, à un instant donné, constitue son phénotype. Un phénotype correspond à un état d'expression du génome.

### 1.2.1.3 *Escherichia coli*

*E. coli* est une bactérie du tube digestif de nombreux vertébrés dont l'Homme. Elle est aérobie facultative, c'est à dire qu'elle se développe en présence et en absence de dioxygène. Elle mesure entre 0,5 et 3 µm de long et pèse entre 0,5 et 5 picogrammes.

Il s'agit probablement du microorganisme le plus étudié et utilisé en recherche. Découverte par Escherich en 1885, cette bactérie est utilisée depuis très longtemps par les microbiologistes. Sa culture est facile et elle se développe très vite. Dans des conditions optimales, la population peut doubler toutes les 20 min. L'accumulation des connaissances et des techniques sur *E. coli* en a fait un organisme modèle et un outil de laboratoire.

Le chromosome d'*E. coli* est constitué de 4,6 millions de paires de bases. Il comporte 4 300 gènes codant pour des protéines (Blattner et al. 1997). À titre de comparaison, l'ADN d'un être humain est mille fois plus long, 3,2 milliards de paires de bases, mais ne comporte que 2 ou 3 fois plus de gènes (20 000 environ).

Les souches d'*E. coli*, pathogènes intrinsèques ou opportunistes, peuvent être responsables de gastro-entérites, d'infections urinaires, de méningites ou encore de sepsis.

Plus particulièrement, la souche de laboratoire que nous utilisons est issue de la souche MC4100 (CGSC#: 6152). Elle n'a pas de flagelle, elle n'est donc pas mobile. Elle n'exprime pas de fimbriae (Peters, Thate, et Craig 2003). La souche MC4100 est très utilisée dans les laboratoires, en conséquence, les particularités, de son génome ont été spécialement détaillées (T. Ferenci et al. 2009). Le gène de fluorescence a été ajouté à son chromosome avec un gène de résistance à l'ampicilline (Hegreness 2006). Elle n'a pas de plasmide, notamment pas de facteur F.

Comme nombre de bactéries, *E. coli* se distingue par une grande capacité d'adaptation. Elle survit et se développe dans des environnements très différents. Nous allons à présent discuter des atouts dont elle dispose pour s'accommoder à des changements de milieu ou profiter d'opportunités de colonisation.

## 1.2.2 Les ingrédients de l'adaptabilité.

### 1.2.2.1 Adaptation et adaptabilité

Le concept d'adaptation joue un rôle central en biologie et en biologie de l'évolution. Mais la notion est difficile à définir et apparaît dans des contextes différents (Mayr 1983).

L'adaptation est définie en langage courant comme l'ajustement d'une chose à une autre. En biologie, il s'agirait de l'ajustement fonctionnel d'un organisme ou d'une population à son environnement. Cela désigne à la fois le résultat et le processus qui mène au résultat. Ici, il n'y a pas nécessairement de notion de valeur, toute modification qui est effectivement due à l'environnement fait partie de l'adaptation.

En revanche, dans le contexte de la sélection naturelle, cet ajustement doit se traduire en termes de performance et de succès dans la compétition. On parle de valeur sélective, « fitness » en anglais. Il s'agit de la capacité à augmenter sa représentation au sein d'une population ou d'un écosystème. Dans le modèle évolutif  $r/K$  les deux paramètres synthétiques sont le taux de reproduction  $r$ , et le rendement maximum possible  $K$  (Boyce 1984). Le taux de reproduction  $r$  dépend du taux de « naissances » et du taux de mortalité.

$$\frac{dN}{dt} = r \cdot N \cdot \left(1 - \frac{N}{K}\right)$$

Un organisme est plus adapté s'il peut augmenter davantage en nombre. Pour cela, il peut se reproduire plus vite,  $r$  grand, ou consommer moins de ressources limitantes,  $K$  grand. De manière générale, on parle d'avantage sélectif,  $s$ , pour décrire de manière simple le rythme global auquel un organisme, ou un phénotype, disparaît ou envahit un environnement. Sa représentation relative dans l'environnement,  $x$ , varie suivant l'équation simplifiée :

$$\frac{dx}{dt} = s \cdot x$$

À l'échelle d'une population l'adaptation désigne aussi les changements de composition phénotypique en réponse aux conditions environnementales. Il peut y avoir une sélection au sein de la population sans que cela modifie la valeur sélective vis-à-vis des autres espèces éventuellement en compétition.

L'adaptabilité est la capacité à l'adaptation. Autrement dit, c'est l'aptitude à augmenter sa valeur sélective. L'adaptabilité est décisive pour coloniser un nouveau milieu ou pour faire face à un changement environnemental et éviter l'extinction.

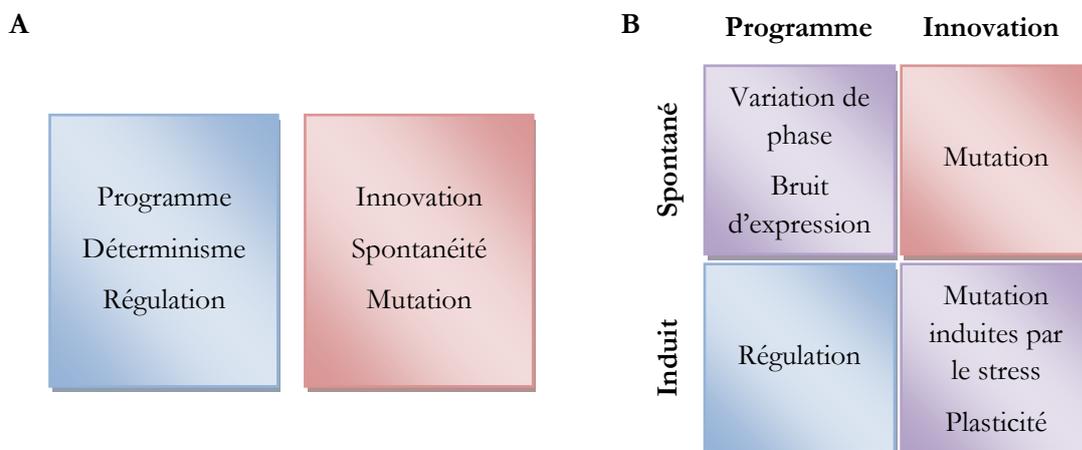
### 1.2.2.2 Mécanismes de diversification

L'adaptation passe par le changement. L'adaptabilité est donc liée à la capacité à créer de la diversité. Au sein de cette diversité accessible certains phénotypes seront plus adaptés. Les mécanismes de diversification fournissent un panel sur lequel s'applique la sélection naturelle. La création de diversité est le point de départ de l'adaptation qui fait ensuite intervenir la sélection.

Une part de la variation peut répondre à des signaux environnementaux, une autre partie est spontanée, c'est-à-dire aléatoire et indépendante des conditions. Une autre distinction porte sur une adaptation via des fonctions existantes, c'est-à-dire programmées dans le génome de la bactérie, et une adaptation nécessitant l'innovation, c'est-à-dire s'écartant du programme ou modifiant le programme.

Ces deux classifications sont longtemps apparues comme équivalentes. L'expression des gènes répond à l'environnement d'une manière totalement déterminée par le génome et son réseau de régulation. Tandis que l'innovation ne peut provenir que de la modification du génome, et celle-ci est strictement aléatoire et indépendante de l'environnement (Figure 1-3 A). Il s'agit pour la première partie d'une généralisation excessive des mécanismes de régulations génétiques mis en évidence par Jacob et Monod. Tandis que dans la seconde on voit la trace de l'affrontement entre Lamarckisme et Darwinisme qui exclut toute modulation des mutations en fonction de l'environnement.

Dans les paragraphes qui suivent nous allons présenter quelques mécanismes de diversifications : non-génétiques d'abord puis génétiques. Nous soulignerons à quel point les contributions et les sensibilités environnementales des différents mécanismes participant à l'adaptabilité sont de plus en plus nuancés jusqu'à produire un continuum d'atout (Figure 1-3 B).



**Figure 1-3**

Représentations des propriétés des mécanismes de l'adaptabilité. Suivant une classification binaire excessive, tableau A, et en introduisant les nuances mises en évidence depuis les années 90.

### 1.2.2.3 La diversification non-génétique

#### Régulation

Le premier élément de l'adaptation est, bien évidemment, la réponse du réseau de régulation de l'expression des gènes au nouvel environnement. Les signaux du milieu extérieur changent, ce qui se traduit par un ajustement de la synthèse ou de l'activité de certaines protéines grâce aux systèmes régulateurs. L'exemple historique de ce mode d'adaptation est la réponse de l'opéron lactose. Lorsqu'il n'y a pas de lactose une protéine, le répresseur, empêche l'expression des gènes qui permettent le transport et l'utilisation du lactose. Mais, en présence de lactose le répresseur est désactivé, et le lactose peut être internalisé et utilisé comme source d'énergie. Nous n'entrerons pas dans le détail des systèmes de régulation. Mais le potentiel adaptatif qu'il représente, chez *E. coli*, ne doit pas être négligé pour autant. Le génome comporte 4 500 gènes dont le réseau

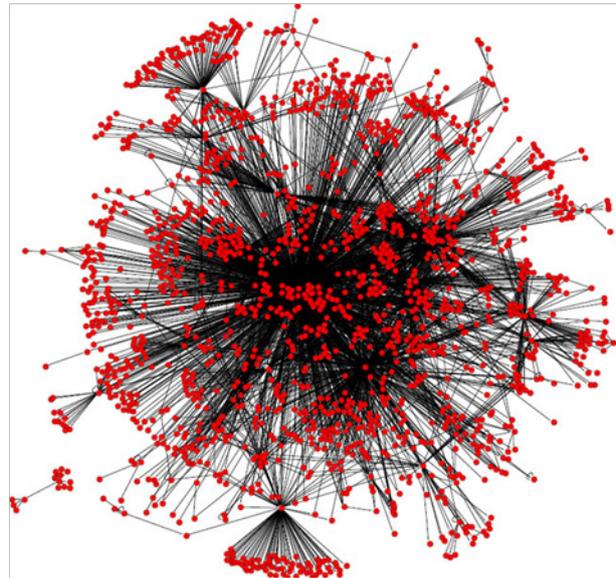


Figure 1-4  
Représentation graphique des interactions (traits noirs) entre les gènes (ronds rouges) d'*E. Coli*.  
Nature education, (Salgado, 2006)

d'interactions est extrêmement complexe (Salgado et al. 2006). Tous ces gènes assurent une fonction, ou peuvent assurer une fonction en cas de besoin. Ce réseau de régulation complexe semble également avoir une plasticité, c'est-à-dire différents modes stables de fonctionnement, qui peuvent participer à l'adaptabilité comme nous le verrons plus loin.

Il existe des systèmes de régulations majeurs dont la protéine régulatrice centrale peut contrôler l'expression de plus de 100 gènes. Ces régulateurs sont appelés facteurs sigma. Il y en a sept chez *E. coli*. En particulier, on peut signaler le facteur sigma S, RpoS, qui correspond à une réponse générale au stress, c'est à dire à des conditions défavorables quelles qu'elles soient (Battesti, Majdalani, et Gottesman 2011). Il régule 10% du génome *E. coli* soit 500 gènes. Nous aurons l'occasion de reparler des conséquences liées à ce régulateur.

L'adaptation fonctionnelle liée au réseau de régulation peut prendre de quelques secondes à plusieurs heures.

#### Méthylation de l'ADN

La majeure partie des régulations se fait par interactions spécifiques sans création de liaisons chimiques. Un système de régulation particulier fait intervenir la méthylation de l'ADN, c'est-à-dire la création d'une liaison chimique entre un groupement méthyle et un nucléotide. C'est la modification chimique d'un site spécifique dans la région de contrôle du gène qui change son état d'expression. Ce mécanisme intervient notamment dans la régulation du gène *ag43* qui sera étudiée plus en détail dans le chapitre 3 (van der Woude et Henderson 2008). Ce mécanisme original de régulation a quelques conséquences remarquables. Il fait intervenir une modification chimique de l'ADN. Cette modification est durable. Elle peut même être irréversible, comme chez *E. coli* qui ne possède pas d'enzyme permettant la dé-méthylation. Dans ces conditions, seule la réplication de l'ADN permet

d'obtenir un nouveau chromosome non méthylé. La probabilité de transition d'un état d'expression à un autre est de  $10^{-2}$  à  $10^{-4}$  par génération. Il s'agit d'un mécanisme épigénétique qui conduit à un schéma d'expression du gène appelé variation de phase où deux états différents coexistent. Le changement d'état est aléatoire. Il dépend d'une rencontre aléatoire entre une protéine, la méthylase, et une petite région bien particulière de l'ADN. C'est un exemple de diversification spontanée, aléatoire comme une mutation, mais sous contrôle du programme génétique. Le caractère spontané du changement d'état doit être nuancé. La variation de phase du gène *ag43* semble effectivement indépendante des conditions, mais de manière plus générale une réponse à l'environnement est possible sous deux formes. D'une part, les probabilités de transitions peuvent être modulées d'après des signaux extérieurs. D'autre part, un second niveau de régulation peut se superposer en agissant sur une des étapes qui séparent le gène et la réalisation de sa fonction. Enfin, la fréquence de changement d'état par génération est faible. Par conséquent, il y a une forme d'hérédité puisque la probabilité que le phénotype soit transmis à la génération suivante est forte.

### *Systèmes bistables*

Nous avons vu que la variation de phase permet de maintenir deux états phénotypiques différents au sein d'une population génétiquement homogène. D'autres mécanismes permettent de générer une telle diversité programmée. Il s'agit de systèmes de régulation particulier qui possèdent deux états stables (Veening, Smits, et Kuipers 2008). L'expression d'un gène en tout ou rien a été observé très tôt sur l'exemple de l'opéron lactose (Novick et Weiner 1957). La biologie des systèmes a montré que des circuits de régulation fermés très simples peuvent générer ce genre de réponses (Alon 2007). L'exemple le plus étudié est sans doute l'état de compétence (capacité à intégrer de l'ADN libre dans l'environnement) de *Bacillus subtilis* (Dubnau et Losick 2006). La possibilité pour un schéma de régulation d'être dans deux états distincts ne devient remarquable que si, dans un contexte fixé, les deux états sont possibles c'est-à-dire stables. Deux phénotypes distincts peuvent coexister au sein d'une population. L'influence des conditions environnementales sur la stabilité de chaque état peut être significative mais l'événement de transition d'un état à l'autre est spontané. Il dépend de fluctuations du nombre de molécules régulatrices près du seuil critique de transition. Nous allons à présent discuter de ces fluctuations en détails au prochain paragraphe. Il est plus difficile et plus rare de considérer l'hérédité des phénotypes contrôlés par ces systèmes bistables. Elle existe au sens où lors de la division deux cellules sœurs héritent du même état. Mais des transitions ont de grandes chances de se produire entre deux générations, à moins qu'un des états phénotypiques conduise à un arrêt de la prolifération.

### *Bruit d'expression génique*

Nous venons d'évoquer des fluctuations dans le nombre d'exemplaires d'une molécule donnée dans la cellule. Ici nous souhaitons souligner brièvement l'origine, la généralité et les conséquences théoriques de ce phénomène. Les études expérimentales de ce phénomène et de ses conséquences sur l'adaptation seront discutées en détails plus loin dans ce chapitre (partie 1.3). Lorsqu'un nombre d'objets est petit, les fluctuations sur ce nombre sont d'autant plus conséquentes. Or, dans une cellule, certaines molécules sont présentes en petit nombre. Les fluctuations sur le nombre de protéines sont parfois appelées bruit d'expression. Lors de l'expression d'un gène, le processus part de l'exemplaire unique du gène. Lors de la transcription, on passe du seul gène à quelques copies de l'ARN messager. Ce nombre d'ARN messagers varie au cours du temps à cause des événements aléatoires que sont la dégradation d'une copie ou la synthèse d'une copie par transcription du gène. Chaque ARN messager participera également à un nombre variable de traductions, produisant ainsi

plus ou moins de protéines (Ozbudak et al. 2002). Les fluctuations du nombre d'ARN et de leur taux de traduction contribuent aux variations du nombre de protéines. Tous les gènes sont exprimés de manière bruitée et le niveau de bruit dépend surtout du nombre moyen de protéines dans la bactérie lorsque le gène est exprimé (Taniguchi et al. 2010). Rigoureusement, l'état phénotypique fluctue donc d'un clone à l'autre, et au cours du temps. Ces fluctuations sont généralement plus rapides que la division cellulaire, ce qui exclue toute forme d'hérédité. Néanmoins, au moment de la division, les deux cellules filles héritent de la composition cytoplasmique de la cellule mère. Les fonctions globales sont robustes vis-à-vis de ce bruit qui est donc principalement observable à l'échelle moléculaire. Cependant, dans certaines circonstances, comme une agression chimique soudaine, les phénotypes les plus excentriques pourraient avoir une plus grande chance de survie ou inversement. Par exemple, une concentration inhabituellement haute d'une enzyme dégradant un antibiotique peut leur permettre de survivre aux premières minutes d'exposition. Cet état phénotypique est transitoire puisqu'il est lié aux fluctuations. Par conséquent, si la menace persiste, il ne s'agit que d'un sursis et d'autres mécanismes plus stables doivent prendre le relais. Il n'en reste pas moins qu'au moment de l'exposition, la diversité de « micro-états » phénotypiques due au bruit d'expression a augmenté les chances de survie. Plus de chance de survie correspond à plus de chance de s'adapter. Le bruit peut donc participer à l'adaptabilité (Fraser et Kaern 2009). Ce mécanisme est spontané, il est paramétré par le code génétique qui est responsable de l'amplitude du bruit (Raser 2004).

### *Exemple d'innovation non génétique*

Au début de cette partie sur l'adaptabilité, nous avons mis en avant la nuance entre l'exploitation des possibilités offertes par le génome (« Programme ») et la nécessité d'innovation. Pour le moment, nous avons décrit toutes les contributions non-génétiques à l'adaptabilité comme assujetties au programme du génome. En conséquence, l'innovation serait exclusivement génétique. Nous donnerons donc deux sources d'innovations non-génétiques qu'on peut considérer comme échappant à la prévalence du code génétique. Tout d'abord, la plasticité du réseau de régulation pourrait faire apparaître des états phénotypiques nouveaux en présence de conditions environnementales jamais rencontrées auparavant. Bien que possédant un mode de fonctionnement privilégié, qui est celui qui résulte de l'Évolution, on ne peut exclure que d'autres modes puissent émerger. Cette hypothèse est soutenue par les travaux théoriques de biologie des systèmes sur la stabilité du réseau de régulation (Papp, Teusink, et Notebaart 2009) et par un exemple de sélection d'un mode d'expression par l'activité métabolique globale (Kashiwagi et al. 2006). Une expérience d'adaptation suite à un détournement du circuit de régulation suggère également un rôle de la plasticité du réseau avant l'apparition de mutations (David et al. 2010). Cette plasticité peut être héréditaire, si le mode de fonctionnement du réseau de régulation est transmis lors de la division grâce au partage équitable des éléments de régulations impliqués. Une deuxième source d'innovation non-génétique serait les « erreurs » lors de la synthèse des protéines et pendant leur maturation (Ryall, Eydallin, et Ferenci 2012). L'hérédité d'une telle innovation est peu probable voire impossible. Mais, comme nous l'avons discuté pour le bruit sur l'expression génique, l'hérédité n'est pas nécessaire pour contribuer à l'adaptabilité.

#### 1.2.2.4 La diversification génétique

La diversité nécessaire à l'adaptation peut également apparaître grâce à des modifications du génome. Les changements dans les séquences nucléotidiques de la bactérie sont par nature stables sur plusieurs générations puisque l'ADN est le support de l'hérédité. Cette diversification produit donc une population génétiquement hétérogène. Parmi les variations produites, seules certaines auront des conséquences observables et contribueront à augmenter la diversité phénotypique.

La diversification est favorable pour faire face à un environnement nouveau. Mais elle représente également un risque car elle modifie l'existant qui, a priori, est adapté à un environnement. Ceci explique que de nombreux mécanismes contribuent à un faible taux d'erreurs lors de la réplication de l'ADN.

##### *Mutations*

Le taux d'erreur lors de la réplication est estimé à  $5 \cdot 10^{-10}$  par paire de nucléotides copiés. Dans un premier temps, on considère qu'il est constant ou indépendant de la séquence de l'ADN. Le génome d'*E. coli* comporte environ 5 millions de nucléotides. Il y a donc en moyenne une erreur, soit un mutant, pour 10 000 nouveaux clones. Lors de la croissance d'une population, les mutations qui interviennent tôt sans diminuer le taux de division, constituent une classe de clones beaucoup plus importante que les mutations intervenues lors de la dernière génération (Figure 1-1). Cette contribution à la diversité de la population et à l'adaptabilité ne peut contribuer significativement que pour de très larges populations ou sur des temps très long. Par exemple, la probabilité qu'un clone comporte une substitution quelconque mais localisée dans un gène cible est de  $10^{-7}$ . Cette probabilité est très faible mais il est important de signaler qu'elle est en partie compensée par la taille des populations des bactéries. Nous sommes 7 milliards d'être humain sur Terre, en simplifiant, le temps de génération de l'espèce est d'une vingtaine d'année. Une colonie d'*E. coli* de  $1 \mu\text{L}$ , un cube de 1mm de côté, contient 1 milliard d'individus et son temps de génération est de 20 min. Le nombre de génomes est un atout pour l'adaptation. Lors d'un changement environnemental, plus une population est grande, plus elle a de chances de compter dans ses rangs quelques mutants qui se trouvent être prêts pour les nouvelles conditions extérieures. Les mutations spontanées de nucléotides quelconques constituent en outre une des sources importantes de modifications du génome pour l'adaptation à long terme à un environnement. Elles sont responsables de l'ajustement fin de la structure des protéines et donc de leurs activités enzymatiques. En effet, c'est le seul mécanisme qui modifie une base à la fois, ce qui après la transcription et la traduction peut substituer un acide aminé de la protéine. Pour finir sur les mutations, on a souvent considéré qu'il s'agissait d'événements spontanés indépendants de l'environnement. Il semble que certaines situations, activant les circuits de régulation de réponse au stress, entraînent une augmentation du taux de mutation (Bjedov et al. 2003). La diversification est donc plus rapide en présence d'un environnement hostile.

##### *« Points chauds » et variation de phase*

Dans le paragraphe précédent, la probabilité de mutation était décrite comme constante sur l'ensemble de la séquence ADN. Il existe en réalité des régions du génome où le taux de mutations est plus élevé. Leur probabilité d'occurrence dans un génome à chaque génération varie en  $10^{-2}$  et  $10^{-5}$ . On peut comparer cette valeur à celle calculée précédemment pour une mutation dans un gène cible ( $10^{-7}$ ). Cette mutation peut être réversible ou non et le plus souvent elle active ou désactive l'expression d'un gène. On parle de variation de phase. Nous ne détaillerons pas la variété de

mécanismes moléculaires qui ont été élucidés (Wisniewski-Dyé et Vial 2008). Chaque « point chaud » est responsable de la coexistence spontanée de deux phénotypes au sein de la population. Chacun des phénotypes est probablement avantageux dans des circonstances différentes. Le maintien d'une sous-population dans un état d'expression différent, destiné à des conditions environnementales qui pourraient apparaître, est une stratégie dite de « Bet Hedging », minimisation des risques. Il a été proposé que ces mécanismes de variation de l'expression des gènes, qui participent à l'adaptabilité, aient précédé l'apparition de réseaux de régulation sensibles aux signaux environnementaux (Beaumont et al. 2009).

### *Augmentation du génome*

La dernière source de diversité génétique que nous discuterons rassemble les modifications génétiques impliquant de grands morceaux d'ADN.

Tout d'abord, les transferts de gènes horizontaux sont une source importante de diversité, qui permettent à une bactérie d'acquérir des fonctions nouvelles. Ainsi, alors que son génome comporte 4 500 gènes en moyenne, la collection de gènes rencontrés dans différentes souches d'*E. coli* en compte 18 000 (Touchon et al. 2009). Cela constitue un réservoir de diversité important qui contribue massivement à l'adaptabilité. Cependant, dans le cadre de notre étude, nous travaillons avec une population « clonale » qui ne possède pas, à notre connaissance, les facteurs nécessaires pour de tels transferts.

Le nombre de copies d'un gène peut également augmenter spontanément. Le nombre d'exemplaires d'un plasmide peut varier. Suite à des erreurs, lors de la réplication ou la réparation de l'ADN, un gène du chromosome peut être dupliqué. L'étape de duplication est limitante, une fois qu'un gène est dupliqué son nombre de copie peut augmenter rapidement, on parle d'amplification de gène (Andersson et Hughes 2009). La variation du nombre de copies ne crée pas de nouvelle fonction mais elle fait varier le niveau d'expression d'un gène en particulier. La probabilité d'amplification de gène spontanée est comprise entre  $10^{-2}$  et  $10^{-4}$  par génome. Alors que ces fréquences sont déjà élevées, il a été montré qu'en situation de stress, la probabilité d'amplification de gènes était accrue (Lombardo, Aponyi, et Rosenberg 2004). Ce processus de diversification n'est donc pas indépendant des conditions extérieures et permettrait lui aussi d'augmenter la diversité spécifiquement lors de changements environnementaux difficiles.

## 1.2 La boîte à outils de l'adaptation de la bactérie *E. coli*.

Les mécanismes qui contribuent à l'adaptabilité des bactéries sont nombreux. Les efforts importants en biologie moléculaire depuis la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle ont contribué à donner une image de plus en plus exhaustive de la diversification au sein d'une population de bactéries. Certaines approches expérimentales pour l'analyse de cellules uniques ont permis d'affiner notre compréhension de l'individualité dans une colonie. Pour aller plus loin, il semble intéressant d'envisager comment tous ces « joueurs » de l'adaptabilité se mettent en mouvement lors d'une transition environnementale. Notre travail a notamment porté sur l'analyse des dynamiques de la diversité phénotypique intra-population d'*E. coli* à travers différents changements environnementaux simples. Dans ce but, nous avons considéré des expériences d'adaptation en laboratoire, simples, inspirées par les travaux d'évolution expérimentale sur des microorganismes, discutés dans le paragraphe suivant. Afin de suivre les populations en phase d'adaptation nous avons mis en œuvre une méthode de phénotypage originale qui s'inspire de méthodes d'analyse quantitatives de cellules uniques dont nous allons également présenter deux exemples.

### 1.3 Approches expérimentales de l'adaptation et de la diversité

Pour étudier les dynamiques de l'adaptation d'une population « clonale » d'*E. coli*, nous nous sommes inspirés du développement de nouvelles méthodes quantitatives pour la biologie et de l'évolution expérimentale sur des micro-organismes. Dans ce paragraphe, nous présentons d'abord des expériences qui mettent en œuvre des outils d'observation et de mesure innovants. Elles révèlent ainsi certains mécanismes de l'adaptabilité évoqués dans la partie précédente. Puis nous présenterons quelques expériences d'évolution et microévolution en laboratoire qui nous ont guidés pour mettre en place les transitions environnementales que nous avons étudié.

#### 1.3.1 L'apport d'outils expérimentaux quantitatifs

Parmi les mécanismes participant à la diversité phénotypique présentée dans la partie précédente, plusieurs ont été particulièrement bien mis en évidence grâce à des approches expérimentales nouvelles ou modernisées. Nous allons en présenter deux afin de souligner l'intérêt de l'observation en temps réel et de la mesure quantitative sur des bactéries individualisées. Elles ont permis d'explorer certaines questions sur la diversité phénotypique. Elles apportent un éclairage sur l'adaptabilité des bactéries.

L'un des points de départ, commun à ces approches expérimentales, est le souci d'aller au-delà de l'information moyenne collectée lors des mesures sur des cultures macroscopique. Les paramètres mesurés comme le temps de division, le rendement de biomasse, une activité enzymatique, ou l'expression d'une protéine, peuvent dissimuler une variabilité significative d'un individu à l'autre.

Pour réussir à observer individuellement les bactéries d'une colonie, il convient de les disperser et de les immobiliser tout en maintenant des conditions de croissance favorables. La mise en œuvre de méthodes expérimentales plus ou moins complexes dans ce but n'est pas nouvelle comme l'indique l'article de revue d'Hoffman en 1964. Certaines techniques de microfabrications apportent effectivement de nouvelles possibilités (Whitesides et al. 2001) mais l'avancée majeure vient des moyens modernes d'imagerie, de traitement d'images, et d'automatisation, et de la volonté de quantifier les observations.

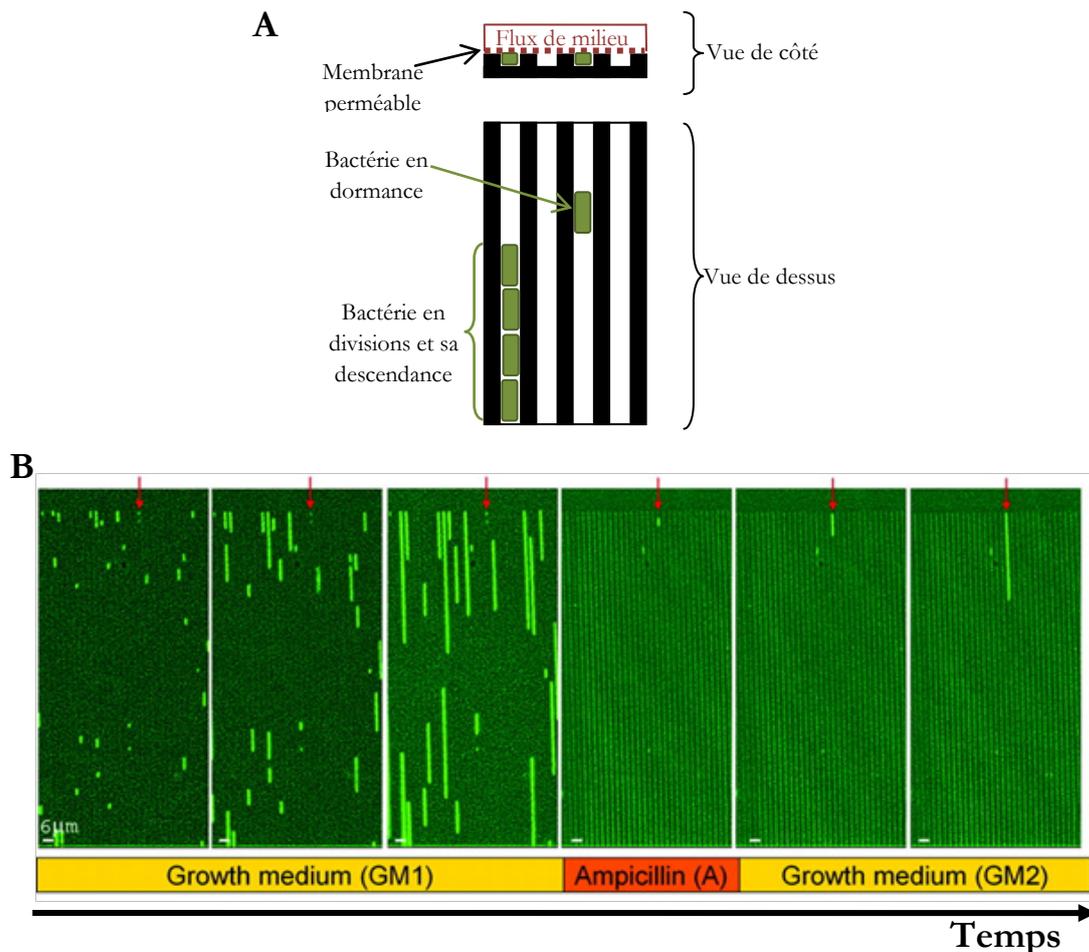
#### *Observation directe de bactéries en dormance*

Une des manifestations évidentes de la diversité qui existe au sein d'une population de micro-organismes est l'observation d'inflexions dans certaines courbes de létalité de traitements antimicrobiens. Dans certains cas, la courbe atteint même un minimum qui correspond à une fraction qui n'est pas sensible au traitement. On parle de persistance pour cette fraction. La dormance est un des mécanismes de persistance identifiés. Certaines bactéries sont dans un état végétatif ou de croissance lente qui leur permet de survivre à l'attaque d'un agent chimique par exemple (Lewis 2006).

La détection des microorganismes viables qui ne se divisent pas est délicate (Oliver 2009). Par conséquent, l'étude de ces sous-populations en dormance afin d'identifier comment elles se constituent, posait un problème expérimental. La solution mise en œuvre par Balaban, sur un mutant à haut taux de persistants, consiste à isoler les bactéries et à les suivre individuellement au cours du temps en microscopie (2004). Il est ainsi possible de mesurer la croissance de chaque individu avant et après un traitement antibiotique. On peut ainsi identifier certaines bactéries qui ne se divisent pas

au début de l'expérience, mais peuvent commencer à se multiplier en fin d'expérience. Balaban et al. ont ainsi montré, en suivant le devenir individuel d'un grand nombre de bactéries, que les bactéries qui persistaient lors d'un traitement antibiotique à l'ampicilline étaient les bactéries dans un état végétatif avant le traitement (Figure 1-5).

Avec cette expérience, on voit l'intérêt de suivre chaque bactérie au cours du temps, car le caractère qu'il fallait mettre en évidence n'est identifiable que grâce la dynamique individuelle. La mesure est quantitative puisqu'on mesure la longueur totale de chaque population au court du temps. Cela permet d'analyser également la vitesse de croissance. Il faut que cette mesure, sur des bactéries uniques isolées, soit réalisée en parallèle sur un échantillon suffisant car le phénotype persistant est



**Figure 1-5**

A : Schéma de principe de l'expérience de Balaban et al. sur les bactéries persistantes. Les bactéries (en vert) sont confinées dans un canal à peine plus large et plus épais qu'elles. Si elles se divisent leur descendance s'étale dans le canal mettant en évidence la croissance. L'environnement est contrôlé grâce à la circulation du milieu de culture dans un réservoir seulement séparé des bactéries par une membrane perméable.

B : Résultats adaptés de la publication de Balaban et al. en 2004 présentant des images de microscopie de fluorescence du dispositif à différentes étapes de l'expérience. Les bactéries sont dispersées dans les canaux puis perfusées avec du milieu de croissance (GM1). Après deux heures, on traite les bactéries avec de l'ampicilline (A) pendant quatre heures ce qui entraîne la lyse d'un grand nombre de cellules. Enfin les bactéries sont à nouveau perfusées avec du milieu sans antibiotiques (GM2). La flèche rouge indique une bactérie en dormance avant le traitement, qui survit à l'exposition à l'ampicilline et repart en croissance lors de l'arrêt du traitement. (Balaban et al. 2004)

rare, moins de 1% de la population. Enfin l'observation « microscopique », au sens de cellules uniques, permet, a posteriori, de modéliser les dynamiques de populations macroscopiques.

#### Fluctuation d'expression génique et lignée

La seconde approche expérimentale présentée ici partage avec la précédente les principes d'individualisation des bactéries et de mesure quantitative suivie dans le temps. Il s'agit de la mesure quantitative de fluorescence en photographie d'accélééré, Quantitative Fluorescence Time-Lapse en anglais (Michael B. Elowitz et Leibler 1999). Une bactérie immobilisée est confinée dans le plan d'observation entre un gel et une lamelle de verre. Elle est photographiée en microscopie de fluorescence à intervalles réguliers. On peut ainsi suivre la fluorescence de la bactérie et de chacune de ces cellules sœurs au cours du temps jusqu'à sept générations environ (Young et al. 2011).

Nous avons présenté les fluctuations d'expression génique, dans la partie précédente, pour leur contribution à la diversité phénotypique instantanée d'une population de bactérie. Cet ingrédient de l'adaptabilité a été très joliment illustré grâce à la technique de time lapse en comparant les fluorescences dues à deux protéines exprimées sous deux promoteurs indépendants (M. B. Elowitz 2002). La Figure 1-6 explique comment les fluctuations temporelles décorrélées de l'expression de ces deux protéines produisent une grande diversité de « teinte » des bactéries. Cette étude constitue une des preuves de référence des fluctuations de l'expression génétique.

Comme indiqué ci-dessus, il est possible, en partant d'une unique bactérie, de mesurer sa fluorescence et celle de chaque cellule sœur au cours du temps. Mais la photographie d'accélééré permet d'aller plus loin grâce à l'analyse d'image automatisée. On peut extraire l'arbre « généalogique » de la population issue de l'ancêtre unique. Cette technique a permis de montrer

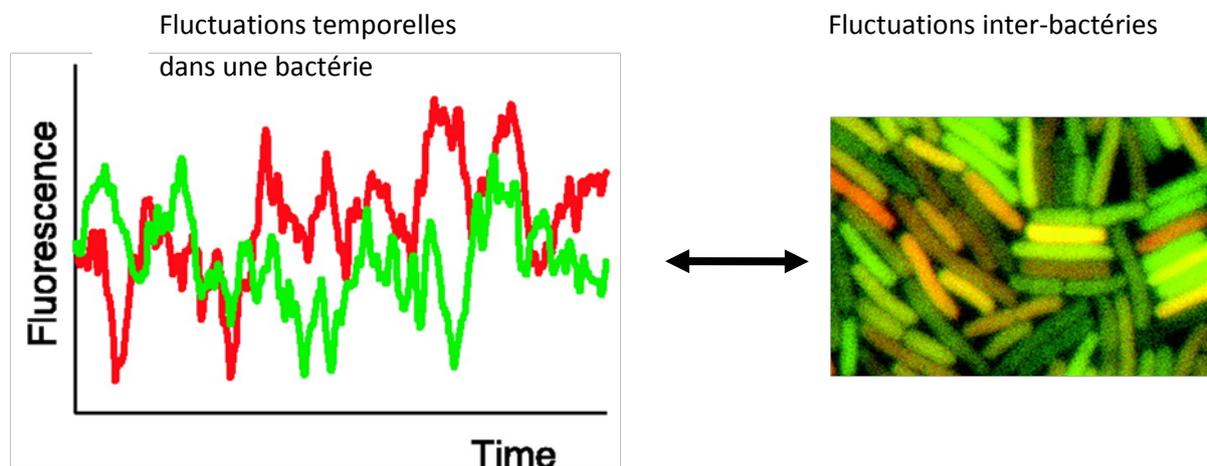


Figure 1-6

Illustration du bruit d'expression mesurée par Elowitz (2002). À gauche, graphe représentant les fluctuations temporelles de l'expression de deux gènes indépendants (*yfp* en rouge et *cfp* en vert) dans une bactérie. À droite, la combinaison des images de fluorescence de la protéine CFP, en vert, et de la protéine YFP, en rouge. Si une bactérie exprime les deux protéines au même niveau elle apparaît jaune, sinon elle tend vers la couleur de la protéine la plus exprimée. La diversité des teintes observée sur cette image est due aux fluctuations de l'expression des gènes *cfp* et *gfp* au cours du temps, comme sur le graphe à gauche (vert CFP et rouge YFP). Comme les deux gènes sont exprimés de manière indépendante, leurs niveaux d'expressions relatifs ne sont pas corrélés et la « teinte » de chaque bactérie fluctue de manière aléatoire. Lors d'une observation instantanée comme sur la photographie, on observe les bactéries dans des teintes aléatoires.

### 1.3 Approches expérimentales de l'adaptation et de la diversité

l'existence de prédispositions à la survie lors d'une transition environnementale brutale, qui sont non-génétiques. On mesure dans chaque bactérie la fluorescence d'une protéine rapportrice qui est exprimée en réponse au stress de la cellule. Les bactéries d'une ramification de la descendance ont la même tendance sur le signal de fluorescence, signe qu'elles sont dans un état de stress comparable. Cette prédisposition est très claire pour des branches isolées après le début du traitement. De manière moins évidente, elle apparaît également pour des sous-familles remontant jusqu'à une division intervenue avant l'exposition à l'antibiotique (Ni et al. 2012). Ce constat d'une détermination du destin par un état épigénétique ancestral qui précède la transition vers un environnement sélectif, peut être vérifié avec une analyse statistique équivalente à celle de Luria et Delbrück. On peut y voir une forme d'hérédité épigénétique sur quelques générations.

Avec ces exemples, nous atteignons le niveau de résolution extrême accessible pour l'étude expérimentale quantitative de la diversité phénotypique. En effet, il est possible de suivre les concentrations cytoplasmiques d'une protéine pour chaque bactérie d'une population et chacune de leurs descendantes sur trois générations avant et trois générations après une transition environnementale.

Notre démarche expérimentale de l'adaptation a en commun avec les démarches expérimentales présentées, la volonté de mettre en œuvre une lecture phénotypique quantitative, pouvant révéler la diversité présente au sein d'une population à l'échelle de l'individu unique. Comme dans le cas de la détection des bactéries persistantes, l'échantillon analysé doit être le plus grand possible pour détecter les phénotypes les plus rares possibles. Notre but est d'aborder la diversité phénotypique et les dynamiques d'adaptation avec une méthode quantitative nouvelle qui pourrait compléter l'éventail d'outils disponibles.

### 1.3.2 Évolution expérimentale sur les micro-organismes

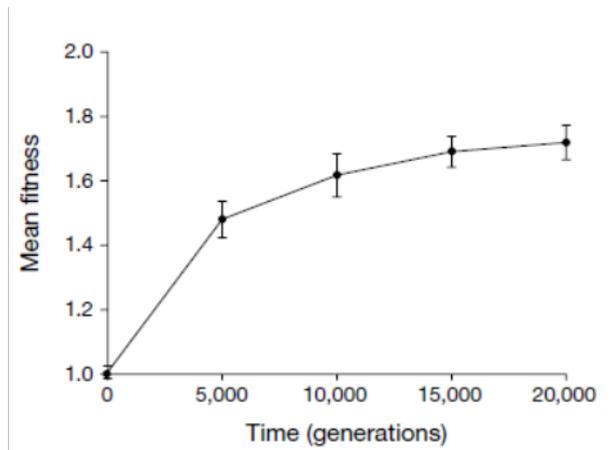
La biologie de l'Évolution s'est longtemps limitée à l'observation et l'interprétation de la diversité dans la nature. Elle s'est également intéressée de préférence aux organismes « supérieurs ». Dans le même temps, les microorganismes ont servi à l'avancée rapide de la biologie moléculaire, sans qu'on s'intéresse à leur évolution. Pourtant ces vingt dernières années, les expériences d'évolution en laboratoire ont produit de nombreux résultats et ont permis de tester certaines hypothèses des théories de l'Évolution (Kawecki et al. 2012). Le cas particulier des expériences sur des microorganismes, possède de nombreux avantages. Les microorganismes se reproduisent rapidement ce qui est décisif pour suivre l'évolution sur un grand nombre de générations. Il est ainsi possible d'observer l'évolution significative de populations sur un temps à l'échelle d'une vie humaine. Les cultures sont également peu encombrantes et peuvent donc être parallélisées. La connaissance génétique et moléculaire de ces organismes modèles permet une maîtrise fine des paramètres de l'expérience et une analyse détaillée. L'exploration a posteriori du processus d'évolution est enfin rendue possible grâce à la possibilité de stocker les populations au cours du temps, figées dans leur état d'avancement. Elles peuvent être relancées en culture ultérieurement, pour des expériences supplémentaires (Elena et Lenski 2003). Enfin les expériences d'évolution sur les microorganismes se sont également développées en raison de l'émergence rapide de résistances aux antibiotiques. L'apparition de souches résistantes est en effet le fruit des mécanismes de l'Évolution (Hall 2004).

Pour illustrer différentes facettes de la démarche d'évolution expérimentale sur les bactéries, nous allons présenter quelques exemples.

#### Expérience à long terme

Si l'on met de côté le cas des souches domestiquées pour diverses transformations agroalimentaires depuis de nombreux siècles, l'expérience d'évolution de microorganismes en laboratoire la plus connue et la plus longue à l'heure actuelle a été lancée par Richard Lenski en 1988. Douze

**A** Rythme d'adaptation sur 20 000 générations.



**B** Photos de la fiole contenant le mutant ayant acquis le catabolisme aérobie du citrate.

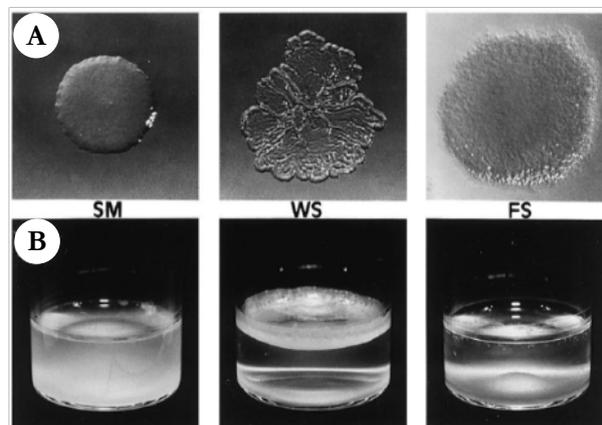


**Figure 1-7**

Illustrations de deux résultats obtenus dans le cadre de l'expérience d'évolution d'*Escherichia Coli* de Richard Lenski. D'une part le rythme d'adaptation, mesuré sur 20 000 générations, ralentit (graphe A, extrait de Cooper et Lenski 2000). D'autre part une des populations atteint des rendements de biomasse, une turbidité plus importante, en raison de l'émergence d'un mutant métabolisant le citrate (photo B, Brian Baer et Neerja Hajela, site internet du laboratoire de Lenski).

populations d'*E. coli* issues d'un unique clone sont propagées par dilution quotidienne depuis 25 ans. Il s'agit d'une adaptation à un environnement nouveau, en partie pour sa composition chimique, mais surtout pour sa très grande stabilité (Lenski 2004). Nous ne détaillerons pas tous les résultats issus de cette expériences ni tous les travaux qu'elle a inspiré, mais simplement deux résultats frappants. Elle a permis de mesurer le rythme de l'adaptation à un environnement constant sur 20 000 générations (Cooper et Lenski 2000). L'augmentation de l'avantage semble ralentir au cours du temps (Figure 1-7 A). Ce ralentissement est interprété comme signe d'une probabilité de plus en plus faible de maintien d'une mutation produisant un avantage minimum. En effet, pour être maintenue, une mutation doit non seulement être bénéfique, mais elle doit aussi avoir la chance d'être conservée lors de la dilution quotidienne qui peut exclure les mutants faiblement représentés. Par ailleurs, une des douze populations propagées en parallèle, a exprimé une innovation fonctionnelle majeure après 31 500 générations (Figure 1-7 B). Une lignée est capable de métaboliser le citrate en conditions aérobie, ce qui n'était pas le cas de la population ancestrale (Blount, Borland, et Lenski 2008). Il s'agit d'un exemple frappant de divergence phénotypique majeure impliquant plusieurs mutations génétiques.

*Microévolution et adaptation à « court » terme.* D'autres approches expérimentales s'intéressent à des périodes d'adaptation plus courtes. On parle de microévolution. Cela correspond davantage à notre démarche dans le cadre de cette thèse, puisque nos expériences n'ont jamais dépassé 30 jours. Les travaux expérimentaux s'intéressent souvent à l'émergence de la diversité dans des habitats contrôlés. Leur but est de tester les hypothèses sur les origines et les circonstances du maintien de populations diversifiées (R. Kassen 2002), ou tout simplement d'envisager le devenir de populations bactériennes dans un environnement défini simple.



**Figure 1-8** Photographies extraites de l'article de Rainey et Travisano, 1998, montrant en association les morphologies des colonies (A) et les niches occupées dans le milieu liquide statique (B) des trois phénotypes observés (notés SM, WS et FS).

Un premier exemple est l'observation d'une radiation évolutive ou adaptative au sein de populations de *Pseudomonas fluorescens* (Rainey et Travisano 1998). Dans cet article, la structuration de l'environnement, obtenue en laissant une culture liquide statique pour 24 heures, apparaît déterminante dans l'apparition rapide, trois jours seulement, puis la coexistence de trois phénotypes distincts. Chaque phénotype est relié à la colonisation d'une niche particulière de l'environnement structuré. L'identification des phénotypes est possible car ils présentent des morphologies de colonies différentes sur milieu gélosé (Figure 1-8). Cette identification par la morphologie et la colonisation de niche apparaît dans le chapitre deux sur l'étude de la variation de phase du gène *ag43*.

Un autre exemple d'évolution en laboratoire que nous souhaitons mentionner est l'adaptation d'*E. coli* lors d'une phase stationnaire prolongée (Zambrano et Kolter 1996). L'étude de populations laissées 10 jours en phase stationnaire a révélé une modification significative de leur phénotype. Après 24 heures en phase stationnaire les bactéries ne montrent plus de signes de croissance, alors

que 10 jours plus tard une fraction de la population croît à nouveau rapidement. Cette observation se traduit par un avantage sélectif, en phase stationnaire, du phénotype isolé après 10 jours sur le phénotype ancestral. Le dernier chapitre de cette thèse s'intéressera à une transition environnementale similaire en ajoutant une structuration spatiale comme celle mise en œuvre par Rainey et Travisano sur *Pseudomonas*.

Le dernier exemple est une expérience sur *E. coli* en chemostat, c'est-à-dire en culture diluée en continue. Cet environnement est supposé homogène et les conditions de croissance sont maintenues constantes. La croissance est limitée par l'apport continu de glucose. En vingt jours, plusieurs phénotypes apparaissent et coexistent. Grâce à un phénotypage moléculaire, plus lourd que dans l'expérience sur *Pseudomonas* ou sur la phase stationnaire, différents compromis de régulation métabolique sont identifiés. Ils favorisent tous l'efficacité d'utilisation du glucose qui est limitant mais selon différentes voies d'améliorations (Maharjan 2006). La structuration spatiale de l'environnement est une solution, mais n'est pas nécessaire, pour observer une diversification phénotypique. Plusieurs solutions à un même défi environnemental peuvent coexister.

Ces exemples d'expériences d'adaptation montrent qu'une population de bactéries produit rapidement une diversité phénotypique aux signatures moléculaires ou morphologiques variées dont nous avons discuté les sources dans la partie précédente sur les ingrédients de l'adaptabilité. Une des limitations opposées à ces approches est liée à leur pertinence dans les environnements naturels. Les travaux publiés en 2010 par Levert et al. répondent en partie à cette question. Ils montrent que lors d'une infection par une souche d'*E. coli*, la population bactérienne prélevée chez un patient présente une diversité phénotypique significative. Les résultats suggèrent qu'une partie de la diversité constatée ressemble à celle obtenue dans les expériences d'évolution en laboratoire (Levert et al. 2010).

### 1.4 Conclusion

Les transitions environnementales que nous allons considérer ont donc déjà fait l'objet d'expériences dont nous n'avons présenté que quelques exemples parmi une littérature croissante depuis trente ans. Mais nous voulons étudier ces cas expérimentaux avec un nouvel outil de mesure qui soit le plus quantitatif possible pour suivre plus spécifiquement la dynamique des phénotypes dans une population en adaptation. Pour cela, nous mesurerons les caractères associés à chaque cellule, prise individuellement, dans un échantillon le plus grand possible. Il s'agit d'accéder à la composition phénotypique la plus finement résolue possible.





## Chapitre 2

---

Outil de phénotypage en millifluidique digitale.

---



## 2 Outil de phénotypage en millifluidique digitale

### 2.1 Vers la millifluidique digitale

#### 2.1.1 Microfluidique

La microfluidique est définie comme l'étude et la conception de dispositifs manipulant de faibles volumes de fluides grâce à leur confinement dans des canaux de 1  $\mu\text{m}$  à 1 mm de diamètre (Tabeling 2003)

La manipulation de fluides dans des dispositifs miniaturisés offre de nombreuses perspectives en recherche et pour les techniques d'analyse (Whitesides 2006). Pour les sciences analytiques, réduire les volumes morts et la taille des prélèvements est un enjeu important. Aussi la microfluidique y trouve un champ d'application naturel (Ohno, Tachikawa, et Manz 2008).

Les applications des techniques de microfluidique pour la biologie ont également connu un développement important ces 20 dernières années (Holmes et Gawad 2010). Avec la microfluidique et les techniques assimilables, on peut manipuler et analyser les cellules individuellement. Leur environnement immédiat peut être modifié à façon avec précision. Les cellules peuvent être étudiées individuellement. L'information chimique et biochimique n'est plus réduite à une moyenne sur une population macroscopique mais devient disponible pour chaque cellule (Boitard et al. 2012). Certains protocoles de préparation des échantillons pour la microscopie sont aussi simplifiés et accélérés grâce à des systèmes microfluidiques simples.

Avec la miniaturisation, on peut envisager de paralléliser massivement les analyses. L'augmentation des débits de tests intéresse bien sûr le domaine médical. Plus d'analyses, plus vite (et moins cher), permet un diagnostic plus rapide et plus précis. Dans de nombreux secteurs industriels, une partie de la recherche et de l'innovation passe par le criblage expérimental massif. Cela consiste à réaliser un très grand nombre d'expériences de manière systématique pour optimiser le ou les paramètres jugés pertinents. La quête d'une nouvelle molécule pharmaceutique, en explorant une collection de molécules disponibles, en est sûrement le paradigme (Macarron et al. 2011). On comprend l'intérêt de la miniaturisation et de la parallélisation, pour réaliser plus de tests simultanément.

Nous avons vu quelques avantages offerts par la microfluidique. Ces avantages correspondent en partie à nos besoins. Nous cherchons à étudier en parallèle un nombre significatif de cellules isolées. Inutile d'isoler un microorganisme d'un micromètre dans un réacteur d'un litre. En étudiant chaque individu dans un petit volume, il est plus facile d'augmenter le nombre de petits volumes étudiés en parallèle.

### 2.1.2 Microfluidique diphasique ou digitale

La parallélisation est une étape qui ne découle pas simplement de la miniaturisation. En microfluidique, les dispositifs de pilotage et de mesure constituent le coût et l'encombrement principal. Pour multiplier les microréacteurs de manière réaliste, il convient donc de mutualiser cette part du dispositif pour le plus grand nombre d'enceintes réactionnelles possibles. Dans le même temps, il faut s'assurer que les réacteurs restent parfaitement indépendants malgré l'homogénéisation rapide par diffusion et les contaminations par adsorption sur les parois des dispositifs. Le nombre de réacteurs est finalement limité dans cette approche car la complexité augmente rapidement.

L'utilisation de deux phases immiscibles possède certains avantages par rapport aux systèmes monophasiques. On disperse la phase réactionnelle sous forme de gouttes dans un fluide immiscible. La phase extérieure est choisie pour sceller ou maîtriser la composition des gouttes. On obtient ainsi autant de microréacteurs fermés et indépendants que de gouttes. La phase continue évite également que la phase réactionnelle entre en contact avec le matériau du dispositif dans lequel on peut faire circuler et mesurer les gouttes (Choi et al. 2012).

En 1998, Tawfik et Griffiths avaient identifié et exploité les avantages de la compartimentalisation et la parallélisation de processus biologiques dans des gouttes d'émulsion (Tawfik et Griffiths 1998). Depuis 10 ans, les techniques de microfluidique pour fabriquer, manipuler et mesurer individuellement de grandes collections de gouttes se sont développées. Elles appartiennent à ce qu'on appelle la microfluidique digitale. Elles ont ouvert la voie à de nombreuses applications de plus en plus sophistiquées. Dans cette approche, le multiplexage ne nécessite plus d'efforts spécifiques. Une fois qu'un dispositif est conçu pour réaliser une opération élémentaire sur les gouttes, alors cette opération peut être réalisée avec ce seul dispositif sur autant de gouttes qu'on le souhaite. Il constitue un module qui peut être combiné avec d'autres (Kintses et al. 2010). Le nombre de réacteurs ne modifie pas la complexité du système. La vitesse de traitement des gouttes devient la seule limite.

### 2.1.3 Millifluidique digitale

Nous avons présenté les avantages de la microfluidique et de la microfluidique digitale. Cependant, cette technologie et la course à la miniaturisation impliquent certaines contraintes et limitations que nous cherchons à éviter.

Les techniques de microfabrication utilisées pour la microfluidique sont efficaces pour le développement des dispositifs car le prototypage est rapide grâce aux techniques de lithographie utilisant des polymères réticulables (S. K. Tang et Whitesides 2009). Mais cette technique de fabrication reste relativement lourde pour une utilisation répétée, une fois la conception terminée. Or, les systèmes microfluidiques sont difficilement réutilisables, car ils sont difficiles à nettoyer. Les propriétés de surfaces sont très importantes, il faut donc absolument les régénérer et les canaux de

petites tailles sont susceptibles de s'obstruer. Par conséquent, chaque expérience nécessite le plus souvent une nouvelle microfabrication. Cette étape est contraignante pour un outil que nous souhaitons utiliser en routine (Becker et Gärtner 2000).

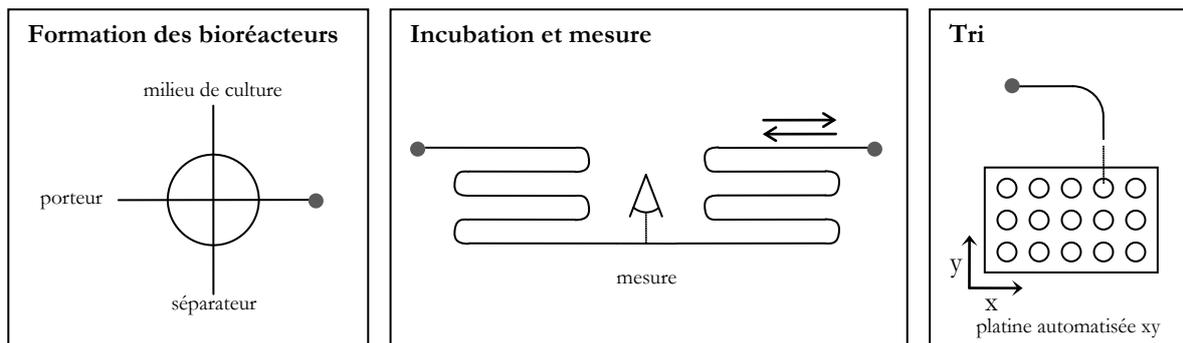
Pour la culture de microorganismes, la réduction des volumes des bioréacteurs n'est pas sans conséquences. En premier lieu pour un système fermé, la quantité de milieu nutritif disponible limite la durée de l'expérience et le nombre de générations observables. Pour un chemostat ou un système perfusé, la durée de l'expérience n'est plus limitée par l'apport de nutriments, cependant la taille de la population observable est déterminée par le volume du réacteur. Le mode de croissance observé dans les microréacteurs peut alors être sensiblement différent de celui observé dans des volumes macroscopiques. Par exemple, le rapport surface-volume élevé dans ces environnements miniaturisés et l'agitation souvent faible favorisent le développement de biofilms. La pertinence ou la généralité des mesures réalisées en microfluidique doivent être évaluées avec précautions. Enfin, la manipulation de petits volumes est facilitée en microfluidique mais lorsqu'on veut extraire un échantillon en fin d'expérience, sa dilution inévitable et les risques de contamination rendent l'opération très difficile.

L'aspect pratique d'une part, et la nécessité d'un volume suffisant d'autre part, ont conduit le laboratoire à développer, à partir de 2006, la millifluidique digitale. L'outil peut servir pour le phénotypage, des expériences d'évolution dirigée ou la détermination de concentrations minimales d'inhibition (CMI) sur différents microorganismes (Baraban et al. 2011).

En millifluidique, les dimensions caractéristiques vont de la centaine de microns au millimètre. Les écoulements en millifluidique conservent en grande partie les mêmes particularités et avantages qu'en microfluidique. Le changement d'échelle augmente principalement les effets de la gravité et les temps caractéristiques de diffusion. Mais les techniques développées en microfluidique digitale sont entièrement transposables en millifluidique. On peut donc former et manipuler des gouttes de quelques centaines de nanolitres qui font jusqu'à 1mm de diamètre (Wilfried Engl et al. 2005).

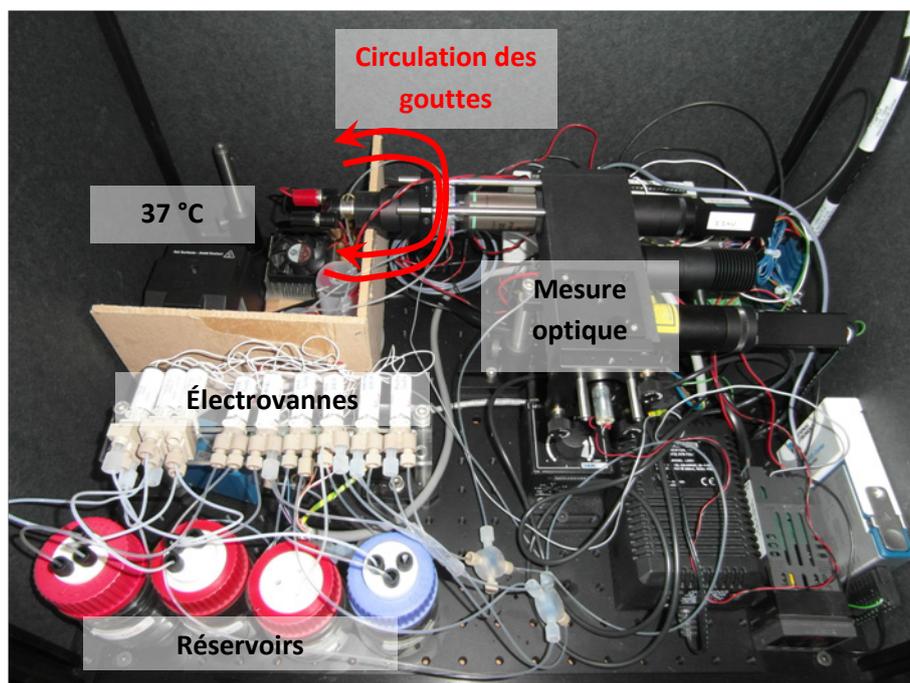
Il est possible de concevoir les dispositifs de millifluidique avec la grande diversité de matériels développés et commercialisés pour la chromatographie liquide. La technologie est facilement adaptable puisque le dispositif peut être modifié simplement en vissant et dévissant les pièces utilisées (W. Engl et al. 2007). Chaque élément est remplaçable facilement et individuellement.





**Figure 2-2**

Schéma représentant les trois modules millifluidiques utilisés : à gauche le dispositif pour générer les gouttes qui constituent les bioréacteurs, au centre le module d'incubation et de mesure, à droite le système pour trier les gouttes en fin d'expérience. Les modules sont facilement associés en connectant les extrémités de tuyaux marqués par un point.



**Figure 2-3**

Photographie du montage expérimental. En haut à gauche, une enceinte est thermalisée à 37°C pour l'incubation des gouttes. En bas à gauche, les réservoirs et les électrovannes permettent le déplacement contrôlé des gouttes dans le tuyau. À droite, le dispositif optique devant lequel les gouttes défilent pour la mesure.

## 2.2.1 Fabrication des micro-bioréacteurs

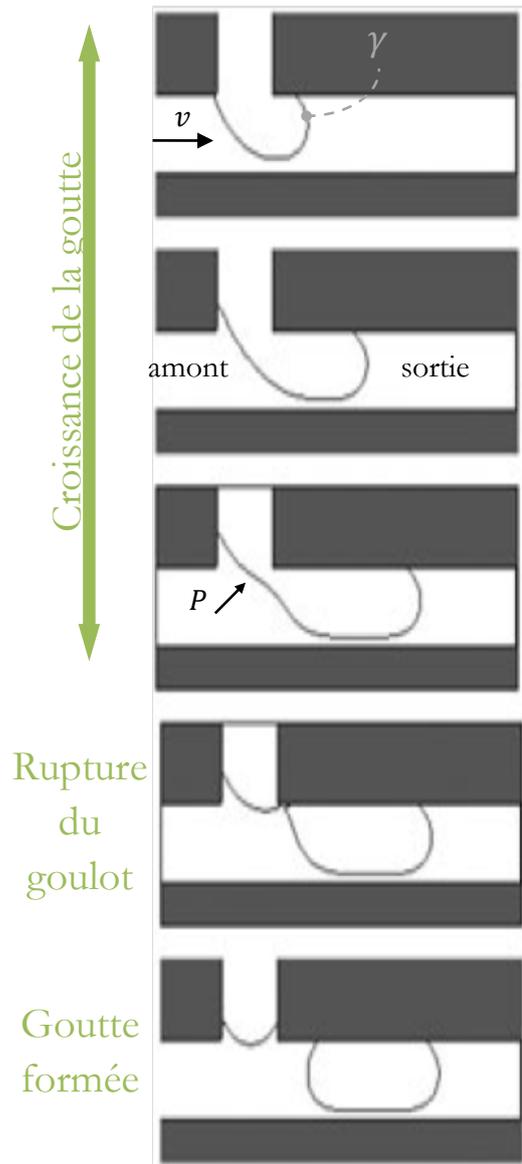
### 2.2.1.1 Formation de gouttes

La première étape consiste à former les bioréacteurs. L'hydrodynamique de la formation de gouttes en microfluidique a été largement étudiée et décrite depuis 10 ans (Baroud, Gallaire, et Dangla 2010). Dans le dispositif millifluidique, les gouttes d'eau sont dispersées dans la phase porteuse selon un procédé assimilable à celui d'une jonction en « T ». Au point de rencontre, la direction du flux du fluide dispersé est orthogonale à celle du flux de phase continue. (Figure 2-4)

Le cas de l'émulsification dans une jonction de flux de deux fluides immiscibles a été décrit en détail par De Menech et Garstecki (De Menech et al. 2008). La dynamique observée dépend du nombre capillaire,  $Ca$ , nombre sans dimension qui rend compte de la compétition entre les forces de cisaillement et les forces de tension de surface. La tension de surface,  $\gamma$ , correspond à l'énergie qu'il est nécessaire de fournir pour créer une unité de surface entre deux phases immiscibles. Le nombre capillaire est défini comme le rapport entre le produit de la vitesse,  $v$ , par la viscosité dynamique,  $\mu$ , et la tension de surface  $\gamma$ .

$$Ca = \frac{v \mu}{\gamma}$$

Pour la formation des bioréacteurs en millifluidique nous pouvons estimer le nombre capillaire à  $10^{-4}$ . Lorsque  $Ca$  est petit, inférieur à  $10^{-2}$ , le cisaillement appliqué par la phase continue sur la phase dispersée au point de rencontre n'est pas suffisant pour vaincre la tension de surface. Autrement dit, le travail des forces de cisaillement ne suffit pas à créer la surface supplémentaire nécessaire pour former une goutte ou un jet. Par conséquent, la phase dispersée s'accumule et envahit progressivement le canal de sortie. La section disponible pour l'écoulement de la phase continue diminue. La résistance à l'écoulement de la phase continue augmente et la pression en amont de la jonction augmente en conséquence. Sous l'effet de cette pression, le goulot, qui relie le flux entrant de phase dispersée au volume qui obstrue le canal,



**Figure 2-4**  
Chronophotographie schématique de la formation d'une goutte dans la jonction « T ». Le régime de génération de goutte représenté est déterminé par le nombre capillaire  $Ca$  qui dépend de la tension de surface  $\gamma$  entre la phase continue et la phase dispersée, de la vitesse, et de la viscosité dynamique de la phase continue. L'augmentation de la pression  $P$  en amont de la jonction provoque la rupture de la goutte qui est entraînée vers la sortie.

devient de plus en plus étroit. Ce goulot finit par se déstabiliser et une goutte est formée. Pendant qu'une autre goutte se forme la goutte formée avance dans le canal, poussée par la phase continue.

**2.2.1.2 Physico-chimie et choix des matériaux**

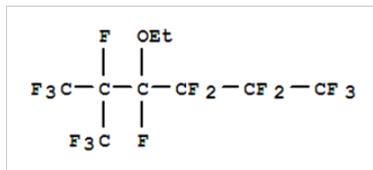
En microfluidique digitale, le choix de la phase continue doit permettre de limiter au maximum les fuites de molécules hors de la phase dispersée. Les huiles fluorocarbures ou les huiles silicones sont donc souvent utilisées car généralement les composés hydrophiles et les composés hydrophobes y sont peu solubles (Chu, Yu, et Curran 2007). Nous utilisons l'huile Novec™ 7500 commercialisée par 3M™, dont la formule est représentée Figure 2-5

Nous souhaitons utiliser la phase dispersée comme bioréacteur. Il s'agit donc d'une phase aqueuse. Différents milieux de cultures bactériennes ont été utilisés. Le plus souvent nous utilisons le milieu Lisogeny Broth (LB).

Pour limiter les risques de contamination, il faut éviter les contacts entre la phase aqueuse et, les tuyaux et les jonctions. Le matériau de ces derniers doit donc être en permanence recouvert par la phase continue. Il faut que le matériau ait une plus grande affinité pour l'huile fluorée Novec™ 7500. L'énergie de surface entre le milieu de culture et le tube doit être supérieure à celle entre la phase continue et le tube. Pour éviter tout contact, il faudrait que l'énergie de surface entre le tuyau et l'eau soit supérieure à la somme des deux énergies de surfaces impliquant la phase continue. On choisit donc les tubes et les connectiques en polytétrafluoroéthylène (PTFE) qui sont commercialisés par un fabricant. La tension de surface entre les deux phases fluorées (solide et liquide) est très faible ce qui favorise le mouillage de la surface des tuyaux par la phase continue. Le volume des gouttes en millifluidique rend l'effet de la gravité non négligeable comparé aux tensions de surface. Si le système est statique, la gravité est responsable de la création d'un contact croissant entre l'eau et le tube. Cependant, les gouttes sont constamment en mouvement. Cette circulation assure l'entretien d'un film de lubrification qui évite tout contact entre le bioréacteur et le tuyau.

Lors de la circulation prolongée du train de bioréacteurs, la distance entre chaque goutte n'est pas constante car la variabilité, même faible, sur le volume des gouttes entraîne des différences de vitesses. La diminution de la distance entre gouttes successives nuit à la stabilité et elle limiterait la durée des expériences. Si deux gouttes sont en contact, il devient difficile de les discerner lors de la détection et de la mesure des bioréacteurs et surtout elles finissent par fusionner. Étant donnée la taille des gouttes, pour éviter la fusion des gouttes, aussi appelée coalescence, l'utilisation de tensio-

Formule de l'huile fluorée Novec™ 7500



Formule du tensio-actif PFPE-PEG-PFPE

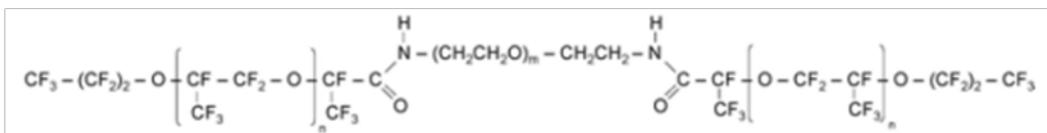


Figure 2-5  
Formule de la phase continue et du tensio-actif utilisés.

actif ne suffit pas. Une autre solution technique a été utilisée. Une troisième phase fluide non miscible est ajoutée dans le système, elle est appelée phase séparatrice. Elle est également dispersée en gouttes ou bulles qui sont intercalées entre chaque bioréacteur et jouent le rôle de séparateurs. Immiscible avec l'eau et l'huile fluorée elle empêche tout contact entre deux gouttes d'eau. Dans le cadre de cette thèse nous avons exclusivement utilisé une huile minérale comme phase séparatrice (Sigma M5904).

Paradoxalement, l'utilisation de cette huile minérale comme phase séparatrice impose l'ajout d'un tensio-actif dans la phase continue. En effet la tension de surface mesurée entre la phase continue et la phase séparatrice est très faible,  $4 \text{ mN.m}^{-1}$ . Les tensions de surface sans tensio-actif, du milieu LB avec l'huile minérale et l'huile fluorée sont comparables, et proches de  $25 \text{ mN.m}^{-1}$ . Par conséquent, on observe une importante surface de contact entre l'huile minérale la phase aqueuse. Cela peut même conduire à une émulsion double, eau dans huile minérale dans huile fluorée, la phase séparatrice ne joue alors plus son rôle. En ajoutant un surfactant dans la phase fluorée, on abaisse l'énergie de surface entre la phase continue et les bioréacteurs,  $15 \text{ mN.m}^{-1}$ , ce qui favorise l'interface eau-huile fluorée et réduit la création d'interface eau-huile minérale. Le surfactant utilisé est un polymère « triblock » alliant du polyéthylène glycol (PEG) pour la partie hydrophile et du polyperfluoropropylène glycol (PFPE) pour les deux parties « fluorophiles ». Ce tensio-actif PFPE-PEG-PFPE a été développé par Raindance™ Technologies pour ses applications en microfluidique digitale utilisant une phase continue fluorée (Holtze et al. 2008).

La formation des gouttes a été décrite dans le paragraphe précédent pour un système diphasique. L'alternance de gouttes dans le système à trois phases que nous venons de décrire s'obtient simplement en plaçant face à face les arrivées des deux phases dispersées qui sont toujours orthogonales à la phase continue. Il y a donc deux « jonction T » face à face. L'hydrodynamique de formation des gouttes est similaire mais les régimes de fonctionnement d'un tel dispositif n'a pas été étudiée de manière exhaustive (Wang et al. 2013). Ce dispositif pour la formation de gouttes alternées a cependant été utilisé pour d'autres applications (S. K. Y. Tang et al. 2009).



Figure 2-6

Photographie du dispositif de génération de gouttes. La phase aqueuse, colorée en jaune, arrive du haut de l'image. La phase continue, l'huile fluorée Novec™ 7500, est transparente et arrive de la gauche. Enfin, en bleu, l'huile minérale, qui assure la séparation des bioréacteurs, arrive par le bas de l'image.

### 2.2.1.3 Gradients de composition

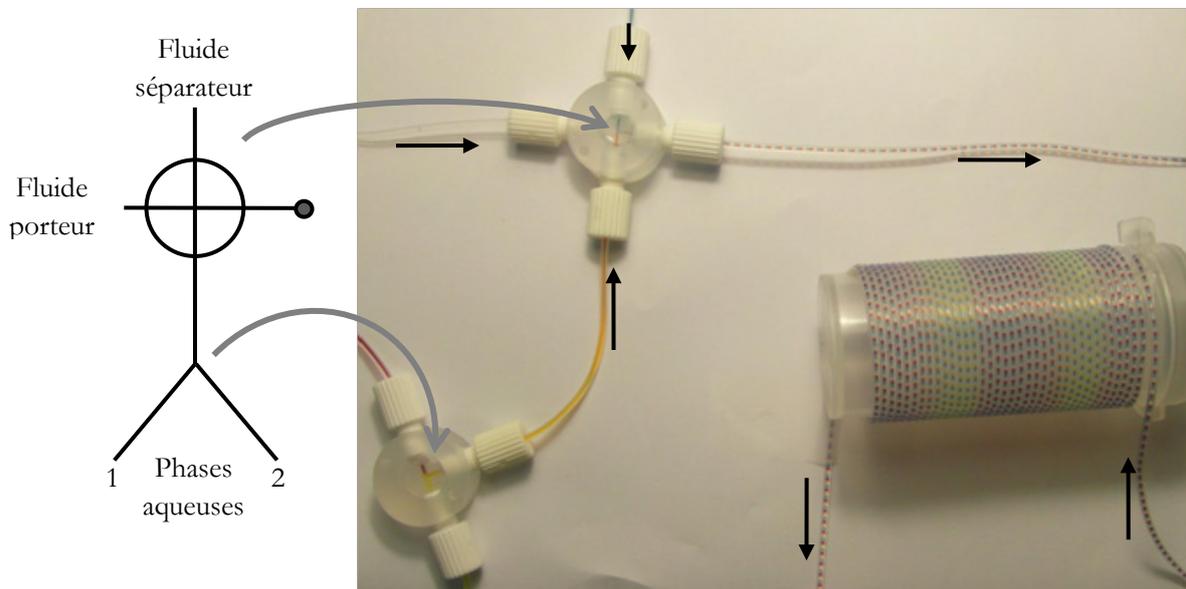
Nous avons vu comment préparer un grand nombre ( $10^3$ ) de bioréacteurs équivalents. Il est également très intéressant de pouvoir faire varier de manière maîtrisée la composition de ses bioréacteurs. Pour cela, on fait varier la composition de la phase aqueuse au cours du temps lors de la préparation des gouttes (Cao et al. 2012).

En amont de la jonction utilisée pour la formation des gouttes, les différentes composantes souhaitées pour la phase aqueuses sont mélangées. On maîtrise les concentrations finales en modifiant les débits respectifs et en maintenant le débit total de phase aqueuse constant. (Figure 2-7)

La réponse du système est en premier lieu limitée par la dispersion de Taylor-Aris (Taylor 1953). Le profil des vitesses dans l'écoulement tend à accélérer la diffusion effective dans la direction de l'écoulement (Figure 2-8). Le coefficient de diffusion effectif  $D_{eff}$  dans un tube cylindrique simple s'exprime sous la forme :

$$D_{eff} = D \left( 1 + \alpha \cdot \left( \frac{\phi v}{D} \right)^2 \right)$$

$D$  le coefficient de diffusion,  $\phi$  le diamètre de l'écoulement,  $v$  la vitesse de l'écoulement,  $\alpha$  un coefficient numérique



**Figure 2-7**

Schéma (à gauche) et photographie (à droite) d'un dispositif de génération de gouttes pour faire varier la composition de la phase aqueuse. Dans la collection de gouttes à droite de la photo nous avons fait varier les débits respectifs d'une solution rouge et d'une solution jaune. Les gouttes d'huile minérale sont colorées en bleu.

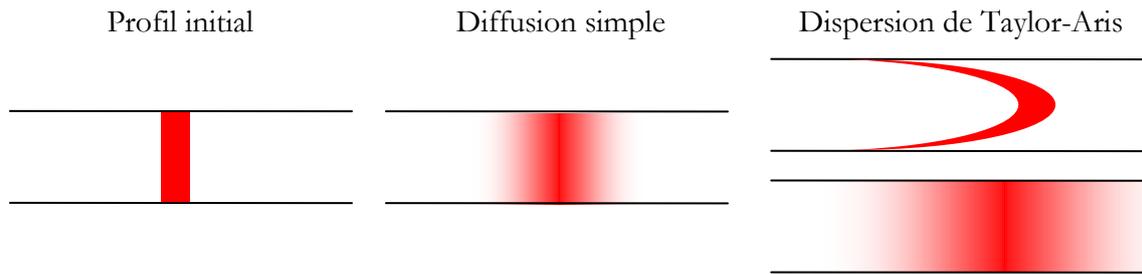


Figure 2-8

Schémas représentant l'effet de la diffusion sur un profil de concentration. À gauche le profil initialement préparé, au centre l'effet de la diffusion dans le cas statique, et à droite l'effet du profil de vitesse (dessus) puis la diffusion effective qui en résulte (dessous).

Cette diffusion effective est responsable de la déformation des profils de concentration que nous cherchons à préparer. Comment réduire cette diffusion ? Il faut réduire le volume de dispersion dans lequel les composés peuvent diffuser avant la formation des gouttes. Avec  $S$  la section du tuyau,  $t$  le temps de parcours entre le point de mélange des phases aqueuses et la formation des gouttes on peut estimer le volume caractéristique de dispersion  $V_{dif}$ .

$$V_{dif} = S \cdot \sqrt{D_{eff} \cdot t}$$

En exprimant ce volume en fonction des paramètres expérimentaux pertinents, le débit de la phase aqueuse  $Q$ , la section du tuyau  $S$  et sa longueur  $L$ , on trouve que  $V_{dif}$  dépend principalement de la section de la connexion et de sa longueur. Le débit  $Q$  est imposé indépendamment pour la formation des gouttes en aval du mélange.

$$V_{dif} = S \cdot \sqrt{L} \cdot \sqrt{\frac{DS}{Q} + \alpha' \frac{Q}{D}}$$

Concrètement, plus le volume du tuyau entre le mélange des phases aqueuses et la génération des gouttes est faible, plus le nombre de gouttes nécessaire pour un changement de composition est petit.

### 2.2.2 Incubation et manipulation du train de gouttes

Les gouttes formées sont chargées dans le module d'incubation et de mesure. Ce module va permettre de stocker les gouttes en préservant leur intégrité et de mesurer chaque bioréacteur toutes les 10 minutes. Pour maîtriser les conditions de culture, il est placé dans une enceinte thermalisée.

Nous avons discuté l'intérêt du déplacement des gouttes pour maintenir la lubrification. Ce flux assure également le mélange à l'intérieur de chaque bioréacteur en raison des recirculations induites par la différence de vitesse entre la goutte et la phase continue (Figure 2-9). Ce mélange est équivalent dans toutes les gouttes et assure des conditions homogènes dans le petit volume du bioréacteur. Pendant l'incubation les gouttes vont donc être maintenues en mouvement.

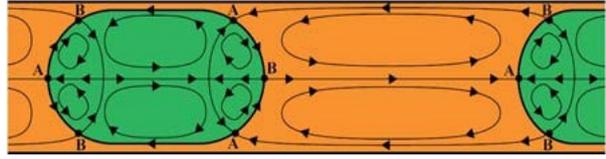


Figure 2-9  
Recirculation dans les gouttes (Baroud et al., 2010)

Ce mélange est équivalent dans toutes les gouttes et assure des conditions homogènes dans le petit volume du bioréacteur. Pendant l'incubation les gouttes vont donc être maintenues en mouvement.

Afin de combiner mesures périodiques de tous les bioréacteurs et mouvement sans fin, la collection de gouttes fait des allers-retours devant le système de mesure. Ce dernier est donc placé au milieu d'un long tuyau de telle sorte que tous les bioréacteurs soient dans une moitié du tuyau, puis tous dans l'autre moitié. Entre temps, ils sont tous passés devant le détecteur.

Le mouvement des gouttes est obtenu en appliquant une différence de pression aux extrémités du tuyau dans un sens puis dans l'autre. Chaque extrémité du tuyau est plongée dans son réservoir d'huile fluorée dont la pression est contrôlée (Figure 2-10). Pour maintenir une vitesse constante, la pression est ajustée grâce à un manostat commandé par le programme de pilotage (Labview®) en fonction du débit mesuré dans le tuyau.

Pour assurer l'intégrité du train nous maintenons les gouttes dans un tuyau. Elles sont donc sur une seule ligne. Leur arrangement à une dimension est immuable. Ainsi chaque goutte est définitivement identifiée par sa position dans la séquence.

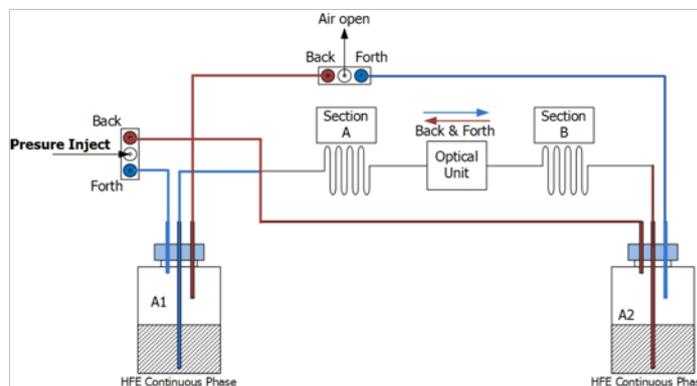


Figure 2-10

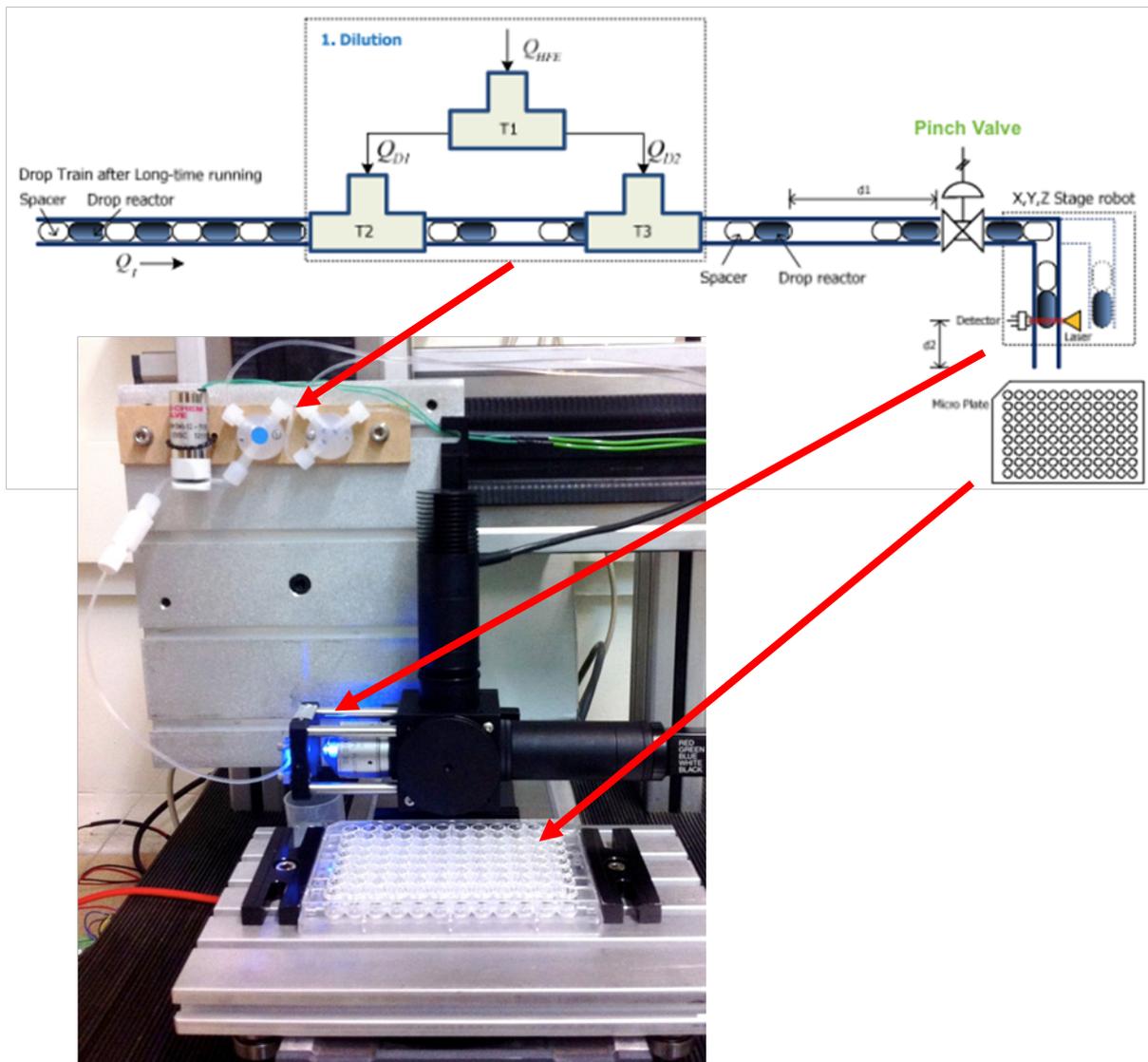
Schéma du dispositif pour l'incubation des bioréacteurs. Les deux réservoirs A1 et A2 sont remplis de l'huile fluorée utilisée comme phase continue ou fluide porteur. (Schéma réalisé par Yuxing Wang)

### 2.2.3 Tri et distribution des gouttes

Avec la fabrication des bioréacteurs et le dispositif de mesure et d'incubation, nous avons constitué un outil d'analyse. Nous pouvons, en effet, réaliser le phénotypage d'une population au sens où l'on mesure dans l'ensemble des gouttes un caractère de cette population. L'outil ne permet que l'analyse. Mais avec le troisième module, qui permet de trier les gouttes et de récupérer le contenu de chaque bioréacteur individuellement, il devient possible d'extraire le matériel biologique qui présente une signature intéressante lors du phénotypage.

Chaque goutte analysée est identifiée par sa position dans la séquence. Le module permet d'éliminer les gouttes sans intérêt et d'adresser les autres vers les puits d'une microplaque.

Le tri se fait goutte à goutte suivant la séquence. C'est-à-dire que la file de gouttes est envoyée vers le dispositif de distribution, puis les gouttes sont triées et délivrées une à une. Les gouttes sont poussées vers l'extrémité du tuyau. Cette sortie du tuyau se trouve au-dessus de la microplaque ou d'une poubelle et peut être déplacée grâce à un système de déplacement relatif motorisé X Y piloté



**Figure 2-11** Schéma du dispositif de tri et photographie de sa réalisation. (Réalisation et photographie Yuxing Wang et Jairo Garnica-Rodriguez.

par un programme Labview®. Les gouttes sortent donc du tuyau une par une dans la position choisie. Un détecteur placé à l'extrémité du tube permet de piloter le déplacement robotisé de la sortie et le flux de gouttes en réponse au passage des gouttes. Toutes les gouttes passent devant le détecteur, leur position dans la séquence est donc identifiée et elles peuvent être adressées suivant leur identité. Pour délivrer une seule goutte à la fois, la vitesse de déplacement du robot et le délai d'arrêt du flux de goutte imposent une distance suffisante entre chaque goutte. Le train de gouttes est donc d'abord dilué en injectant un flux de phase continue. On augmente ainsi la distance entre les gouttes de deux millimètres à une dizaine de centimètres.

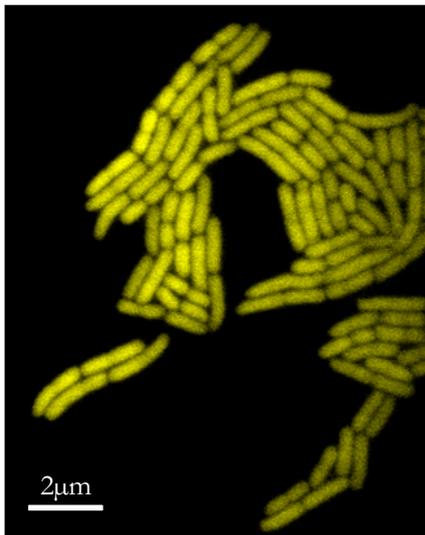
## 2.3 Mesure dans les bioréacteurs

Le dispositif de phénotypage millifluidique permet donc de préparer, d'incuber et mesurer 1000 réacteurs en parallèle. Il est aussi possible de trier et récupérer certains réacteurs en fin d'expérience. Le dispositif de mesure est très facilement adaptable en fonction de l'application souhaitée sans modifier le principe général décrit dans le paragraphe précédent. Dans la partie qui suit nous décrivons la mesure mise en œuvre pour notre étude sur *E. coli*.

### 2.3.1 La bactérie MC4100 YFP

Nous avons utilisé une souche de l'espèce *E. coli* qui est fluorescente. Elle a été construite par Hegreness pour étudier l'apparition de mutations bénéfiques. Dans son expérience deux couleurs de fluorescences différentes sont co-cultivées. L'apparition d'une mutation procurant un avantage à l'une des deux populations est révélée par un déséquilibre sur le rapport des deux fluorescences (Hegreness 2006).

Le fond génétique utilisé est une souche MC4100. Elle est largement utilisée en laboratoire. La souche BW2952 dérivée de MC4100 a été séquencée intégralement (T. Ferenci et al. 2009). La souche est résistante à la streptomycine. MC4100 est aussi un mutant nul pour l'opéron lactose (Peters, Thate, et Craig 2003).



**Figure 2-12**  
Bactéries MC4100 YFP, microscopie de fluorescence (100x)

La construction de Hegreness profite de l'absence d'opéron lactose fonctionnel. En effet, le gène YFP qui code pour une protéine fluorescente a été placé par construction génétique sous le contrôle d'un promoteur appartenant à l'opéron lactose. En l'absence d'opéron lactose, comme chez MC4100, le promoteur est très peu régulé et l'expression du gène est constitutive, c'est-à-dire permanente et quasi constante. Le gène *yfp* est inséré au chromosome de la souche MC4100 avec un gène de résistance à l'ampicilline *ampR* placé sous la régulation du même promoteur. Ces deux gènes insérés sont issus d'un plasmide de Lutz et Bujard (1997).

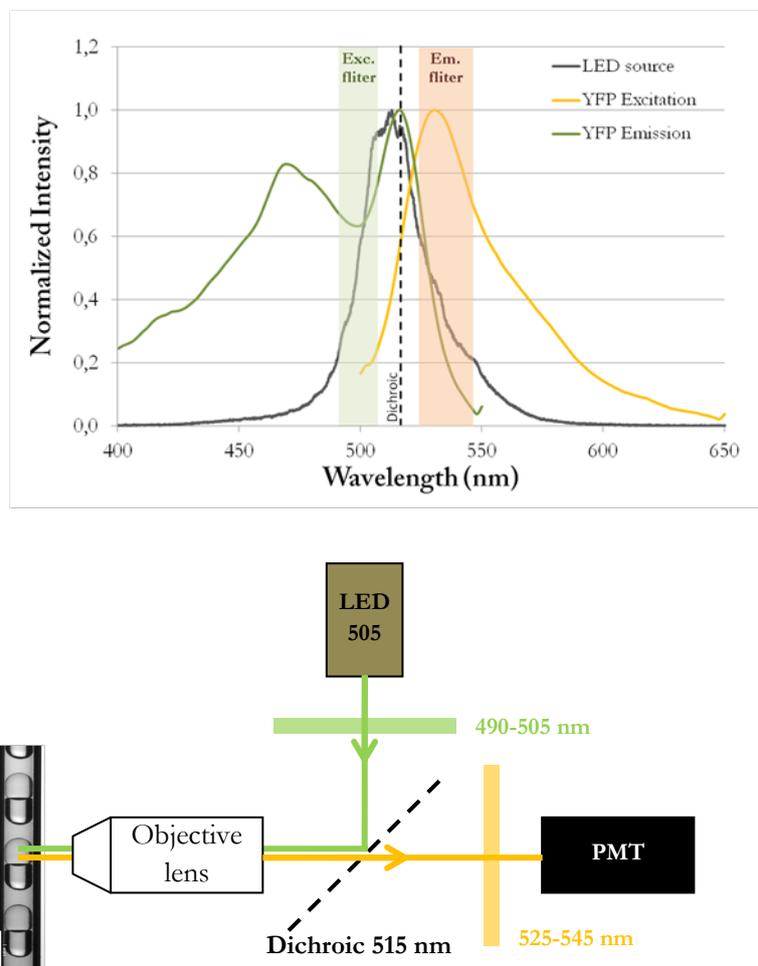
La protéine fluorescente YFP est dérivée de la protéine fluorescente verte (GFP). La GFP a été identifiée au début des années 60 par Osamu Shimomura chez une méduse (Shimomura, Johnson, et Saiga 1962). Martin Chalfie est le premier à exploiter ce gène pour l'étude de cellules bactériennes (Chalfie et al. 1994). Enfin Roger Y. Tsien a développé des allèles de la GFP aux propriétés de fluorescence différentes dont fait partie YFP (Tsien 1998). Tous les trois ont reçu conjointement le Prix Nobel de Chimie 2008 pour leurs travaux.

Les autres souches utilisées dans le cadre de cette thèse ont été modifiées par Christophe Beloin à partir de la souche MC4100 YFP AmpR présentée ci-dessus (Da Re et al. 2007).

### 2.3.2 Mesure de fluorescence

La souche que nous utilisons exprime une fluorescence constitutive. Pour suivre la croissance des bactéries dans les bioréacteurs nous utilisons donc une mesure de fluorescence. La protéine YFP présente un pic d'excitation à la longueur d'onde de 515 nm et son émission maximum se situe à 530 nm (Figure 2-13). La source d'excitation est une diode électro lumineuse (LED) dont le maximum d'émission est à 505 nm (Thorlab® M505L3). On sélectionne l'excitation avec un filtre centré à 497 nm (Thorlab® MF497-16) et de largeur 16nm. Le miroir dichroïque utilisé coupe à 515nm (Thorlab® MD515) et enfin le filtre d'émission transmet entre 525 et 545 nm (Thorlab® MF535-22). L'émission collectée est mesurée avec un photomultiplicateur (Hamamatsu H10722-01).

Des méthodes plus générales pour mesurer la biomasse, basées sur la diffusion de lumière et l'analyse d'image, sont développées pour une application plus générale du dispositif. Elles n'ont pas encore atteint les mêmes niveaux de performance.



**Figure 2-13**

En haut, le spectre d'émission de la source LED utilisée et les spectres d'excitation et d'émission de la protéine fluorescente YFP, sont représentés avec les bandes passantes des deux filtres et la longueur d'onde seuil du miroir semi-réfléchissant.

En bas, schéma du dispositif de mesure de la fluorescence dans les gouttes (PMT : photomultiplicateur, LED : diode électroluminescente).

### 2.3.3 Acquisition du signal de fluorescence

Le signal du PMT est enregistré en continu sur l'ordinateur grâce à une carte d'acquisition National Instrument™. Les gouttes sont détectées grâce à leur signal de fluorescence. L'inoculum est généralement inférieur au seuil de détection de notre dispositif de mesure. Afin de compter les gouttes à chaque passage tout au long de l'expérience et ainsi conserver leur identité, on s'assure que chaque goutte soit fluorescente. L'autofluorescence du milieu Lisogeny Broth (LB) est généralement suffisante, sinon 5nM d'Isocyanate de Fluorescéine sont ajoutés à la phase aqueuse.

La zone d'excitation est plus petite que la goutte. Le passage d'une goutte se traduit donc par une augmentation temporaire du signal de fluorescence (Figure 2-14).

L'analyse du signal a posteriori permet d'extraire, pour chaque goutte, à chaque passage, une mesure de fluorescence. On peut alors reconstituer, pour chaque goutte, l'évolution temporelle du niveau de fluorescence. L'échantillonnage dépend de la fréquence des allers-retours de la file de bioréacteurs.

Le résultat d'une expérience avec ce dispositif est donc un ensemble de courbes de fluorescence en fonction du temps. Chaque courbe décrit la variation de la fluorescence, sur toute la durée de l'expérience, pour une goutte identifiée par sa position dans la file. La fluorescence est due à l'expression stable d'une protéine fluorescente dans chaque bactérie. Elle serait sensible à une altération de l'expression de la fluorescence (voir fin 2.4.3), mais en première approximation, elle rend compte de l'évolution de la quantité de bactéries dans la goutte. La quantité de bactéries dépend du nombre et de la taille des bactéries. Cette courbe de fluorescence, ou de nombre de bactéries, est notre lecture phénotypique. Il s'agit du caractère que nous mesurons.

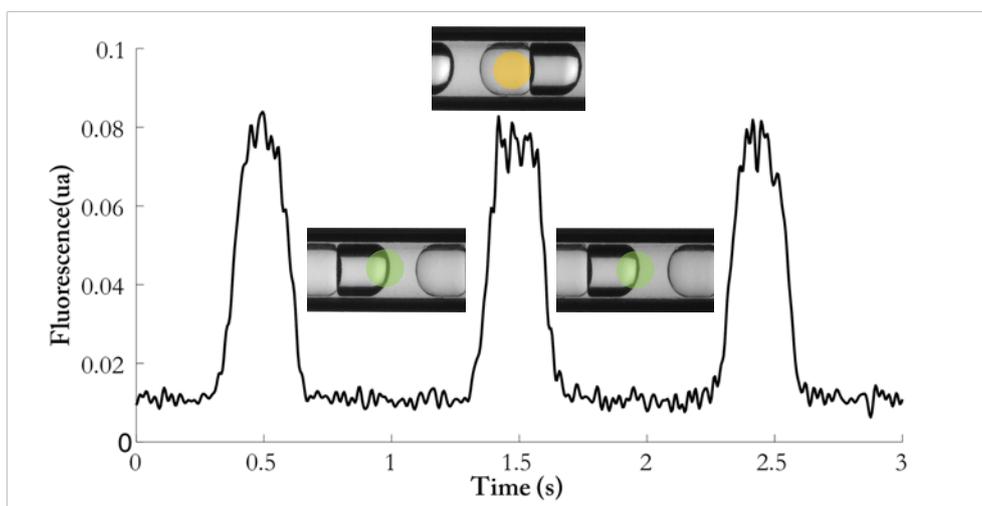


Figure 2-14

Signal du photomultiplicateur (PMT) acquis lors du passage de trois gouttes avec un échantillonnage à 210 Hz. Les images illustrent le défilement des gouttes vers la gauche et le champ d'excitation, avant, pendant et après le passage d'une goutte.

## 2.4 Analyse des données

Pour interpréter la mesure phénotypique permise par le dispositif, il faut évaluer si la mesure et les conditions dans les gouttes sont comparables aux méthodes classiques. Par ailleurs, pour réaliser le phénotypage d'une population avec cette mesure, il faut mesurer le caractère, la courbe de croissance, pour des bactéries uniques. La manière dont les bactéries se distribuent dans les gouttes dépend de la densité de bactérie utilisée. Pour obtenir une distribution adaptée au phénotypage dans les gouttes, nous verrons que l'échantillon doit donc être ajusté à la bonne densité de bactéries. Enfin, les courbes de croissance constituent notre lecture de phénotype, nous pouvons aussi en extraire des paramètres pertinents et analyser la précision et la « résolution phénotypique » accessible sur ces paramètres.

### 2.4.1 Conditions de culture, calibration et seuil de détection

Nous souhaitons évaluer d'une part la mesure, et d'autre part les conditions de croissance en gouttes. Une culture macroscopique sous agitation, d'un volume total de 5mL, est suivie en mesurant la fluorescence dans des gouttes préparées au moment de la mesure. La densité de cellules initiale pour la culture macroscopique correspond à celle préparée pour la croissance en goutte. La dynamique de croissance est équivalente à celle observée pour les croissances dans les gouttes. Cela indique que les conditions de croissance lors de l'incubation en gouttes ne sont pas très différentes de celles dans une culture macroscopique usuelle (Figure 2-15).

La mesure de fluorescence en gouttes est étalonnée vis-à-vis de la méthode plus classique de turbidimétrie à 600nm appliquée à la même culture macroscopique (Figure 2-15). Les deux mesures sont linéairement reliées même jusqu'à des valeurs élevées de turbidité. La mesure de densité optique maximum de 4,6 est obtenue avec une dilution par dix pour rester dans le domaine de linéarité du spectromètre. La mesure de fluorescence en gouttes est peu altérée par cette turbidité car les trajets optiques dans les gouttes sont très courts (<250µm). Il s'agit ici d'un autre atout de la miniaturisation.

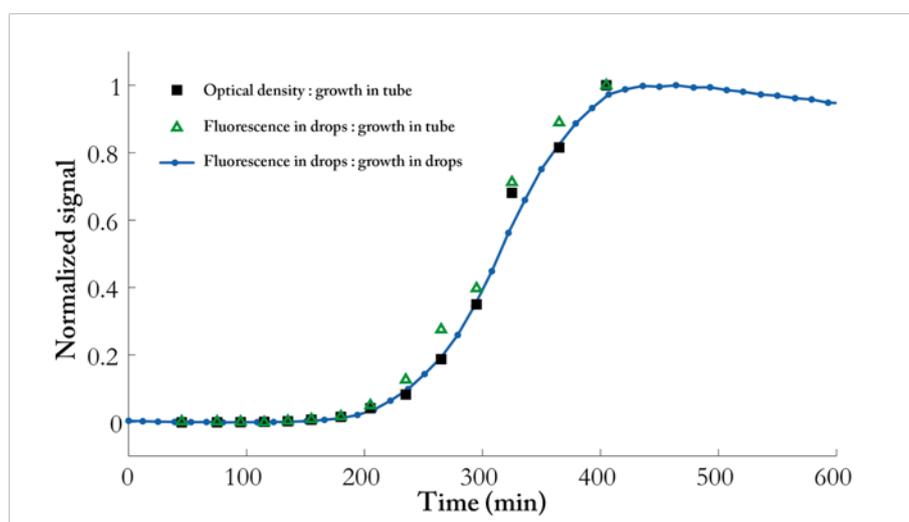


Figure 2-15

Comparaison de la courbe de croissance d'une culture macroscopique (triangles et carrés) et d'une culture en gouttes (ligne). Calibration de mesures de fluorescence en gouttes (triangles) vis-à-vis d'une mesure classique de turbidimétrie à 600nm (carrés). Les courbes sont normalisées par leur valeur maximale.

Pour les données normalisées par le signal de saturation, le seuil de détection, défini à  $3\sigma$ , est de 0,02. Cela correspond à environ  $2.10^3$  bactéries par goutte de 100nL en estimant qu'en phase stationnaire la densité est de  $10^9$  bactéries par millilitre.

## 2.4.2 Encapsulation et inoculum

### 2.4.2.1 Encapsulation simple

Lorsqu'on prépare une solution aqueuse contenant une molécule d'intérêt A, à une concentration donnée  $C_A$ , cette concentration est considérée homogène et continue dans le volume. Si on segmente la solution en petits volumes, pour faire des gouttes par exemple, chaque petit volume aura la même concentration égale à  $C_A$ . Ce raisonnement est tout à fait valable mais il s'agit d'une approximation. Cette approximation n'est plus suffisante lorsque nous voulons préparer des bioréacteurs contenant un nombre connu de cellules.

Si on prélève un petit volume  $v$  d'une solution de concentration  $C$  le nombre  $X$  de molécules qu'il contient suit une loi binomiale. En effet, on considère que les molécules sont réparties de manière uniforme dans le volume total  $V$  et que la probabilité qu'une des  $C \cdot V$  molécules se trouve dans le petit volume  $v$  considéré est  $\frac{v}{V}$ . Les paramètres de la loi binomiale sont :  $C \cdot V$ , le nombre de tirages, et  $\frac{v}{V}$  la probabilité d'un succès. La probabilité qu'il y ait  $k$  molécules dans  $v$  s'écrit :

$$Bin\left(CV, \frac{v}{V}; X = k\right) = C_{CV}^k \cdot \left(\frac{v}{V}\right)^k \cdot \left(1 - \frac{v}{V}\right)^{CV-k}$$

Chacune des  $C \cdot V$  molécules est dans le volume  $v$  avec une probabilité  $\left(\frac{v}{V}\right)$ , ou en dehors avec une probabilité  $\left(1 - \frac{v}{V}\right)$ . L'espérance est égale à  $Cv$ , et la concentration moyenne attendue est bien  $C$ .

La variance est égale à  $Cv \cdot (1 - p)$ , et l'écart relatif sur la concentration est égal à  $\frac{\sqrt{Cv(1-\frac{v}{V})}}{Cv} \sim \frac{1}{\sqrt{Cv}}$

Le nombre de molécules espérées dans le petit volume  $v$  reste très grand et l'écart relatif sur la concentration obtenue est très faible. À titre d'exemple, on peut considérer la préparation de gouttes de 100 nL à partir d'une solution d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) à 20  $\mu\text{g/L}$ , soit  $5.10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup>. L'écart relatif sur la concentration dans une goutte de 100 nL est alors de  $2.10^{-5}$ . Ce faible écart relatif s'explique car ici  $Cv$  est égal à trois milliard de molécules. De ce résultat nous pouvons déduire que la variabilité sur la concentration d'une molécule est négligeable. Nous pourrions ainsi estimer le bruit dû à la méthode de mesure dans notre dispositif de phénotypage par une mesure sur une solution de FITC.

Le nombre de molécules est très grand. Mais lorsqu'on cherche volontairement un petit nombre de bactéries par goutte, la variabilité devient significative (Figure 2-16). Si le nombre moyen par goutte est  $n$ , l'écart type est  $\sqrt{n \cdot \left(1 - \frac{v}{V}\right)} \sim \sqrt{n}$ .

La loi binomiale converge vers la loi de Poisson lorsque le nombre de tirages  $N$  tend vers l'infini et que la probabilité de succès  $p$  tend vers zéro, tels que  $Np$  converge vers un nombre positif. La loi de Poisson est plus facile à calculer. Elle est donc très souvent utilisée pour décrire l'encapsulation d'un petit nombre d'objets avec le paramètre  $\lambda$  égal à  $Cv$  (Najah, Griffiths, et Ryckelynck 2011).

$$Pois(\lambda; X = k) = \frac{\lambda^k \cdot e^{-\lambda}}{k!}$$

Plus  $\lambda$  est petit, plus le nombre de gouttes non inoculées est grand. Pour  $\lambda=3$ , la collection de gouttes formées contient encore 5% de gouttes vides.

$$Pois(\lambda ; X = 0) = e^{-\lambda}$$

La présence de gouttes vides permet a posteriori d'estimer le paramètre  $\lambda$ , nombre moyen de bactéries par goutte, d'après la loi de Poisson. Avec ce paramètre, il est possible de calculer la distribution des inocula dans les gouttes (Figure 2-16).

Lors de la préparation des gouttes, la densité moyenne de bactéries est conservée. Le paramètre  $\lambda$ , nombre de bactéries par goutte, est donc égal à la densité de bactéries dans la solution utilisée pour les bioréacteurs. On peut donc ajuster le paramètre de la distribution des bactéries dans les gouttes.

Dans le but d'analyser le phénotype d'un grand nombre de cellules uniques nous devons trouver un compromis sur ce paramètre  $\lambda$ . En effet, pour assurer l'encapsulation de cellules uniques, et avoir une probabilité de co-encapsulation négligeable, il faudrait que le paramètre  $\lambda$  soit inférieur à 0,1. Mais dans ces conditions, 90% des gouttes préparées et analysées ne contiennent pas de bactérie. L'échantillon de bactéries mesurées est alors petit. Pour nos expériences, nous avons choisi d'augmenter la densité de bactéries pour analyser le plus grand nombre de bactéries possible lors du phénotypage. L'augmentation du nombre de cas d'encapsulation multiple peut rendre difficile l'interprétation des résultats en créant des phénotypes mixtes. Pour déterminer la limite haute pour le paramètre  $\lambda$ , nous devons considérer l'effet sur une lecture de phénotype de la co-encapsulation de plusieurs bactéries de phénotypes différents.

### 2.4.2.2 Co-encapsulation

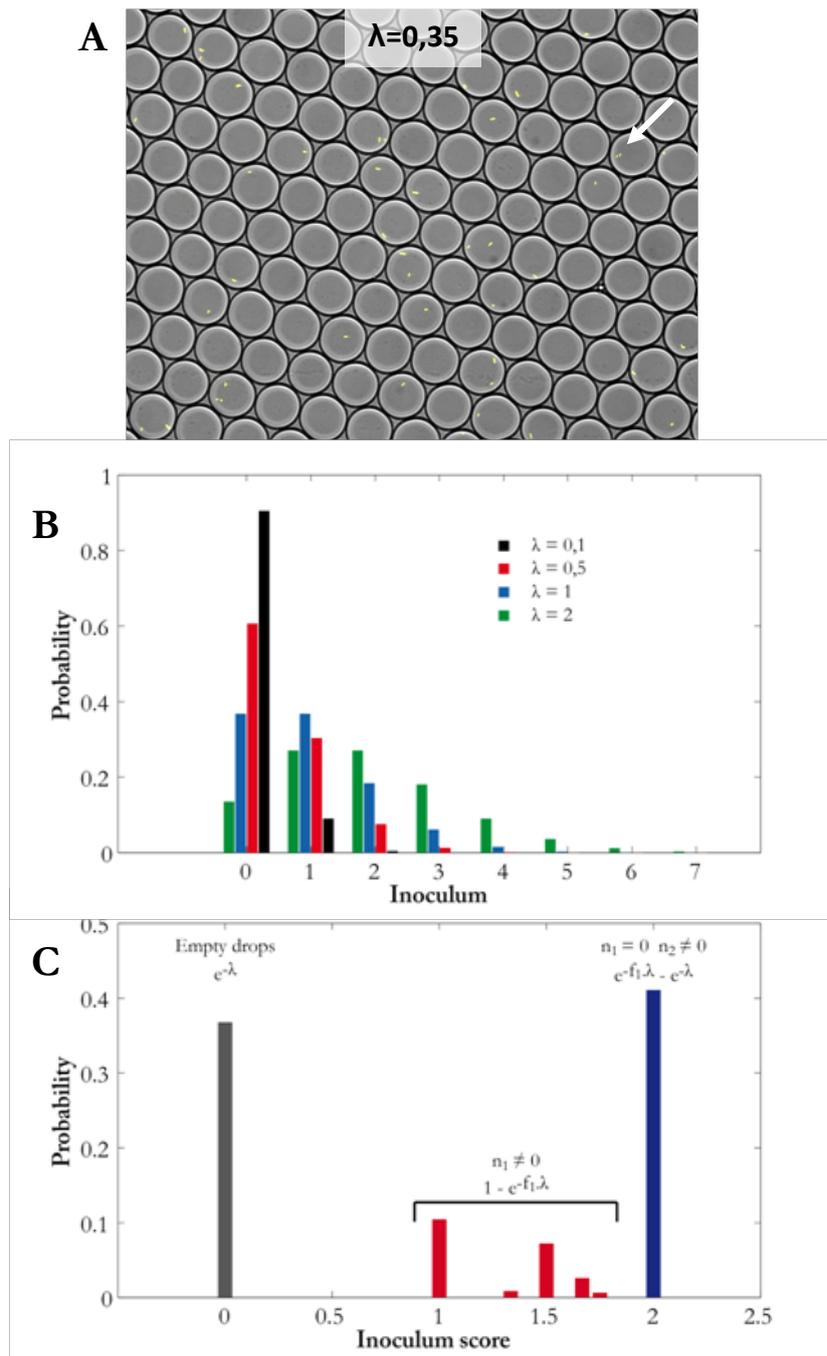
Nous souhaitons analyser la diversité phénotypique au sein de populations de bactéries. Par conséquent, nous supposons que plusieurs phénotypes sont présents lors de la formation des bioréacteurs et qu'ils peuvent être co-encapsulés.

Les probabilités d'encapsulation et de co-encapsulation découlent de la loi de poisson. Pour garder une taille d'échantillon de bactéries analysées la plus grande possible, on travaille avec des densités de bactéries conduisant à un paramètre  $\lambda$  compris entre 0,2 et 1. Dans ces conditions, les cas de co-encapsulation ne sont pas négligeables et doivent être envisagés. Le cas de deux phénotypes distincts permet d'illustrer les conséquences sur le phénotypage. On considère deux phénotypes, 1 et 2, dont les fractions dans la population sont  $f_1$  et  $f_2 = 1 - f_1$ . Nous supposons une mesure du rendement de croissance, c'est-à-dire de la biomasse maximale qui peut être formée dans le milieu utilisé. Le rendement de croissance du phénotype 2 est deux fois supérieur à celui du phénotype 1. Ils sont encapsulés avec un nombre moyen de bactéries par goutte  $\lambda$ . La probabilité d'avoir  $n_1$  et  $n_2$  bactéries des phénotypes 1 et 2 dans une goutte s'écrit :

$$P(n_1, n_2) = Pois(\lambda ; X = n_1 + n_2) \times Bin(n_1 + n_2, f_1; X = n_1)$$

$$P(n_1, n_2) = \frac{\lambda^{n_1+n_2} \cdot e^{-\lambda}}{(n_1 + n_2)!} \times \frac{(n_1 + n_2)!}{n_1! n_2!} (f_1)^{n_1} \cdot (1 - f_1)^{n_2}$$

$$P(n_1, n_2) = \frac{\lambda^{n_1+n_2} \cdot e^{-\lambda}}{n_1! n_2!} (f_1)^{n_1} \cdot (1 - f_1)^{n_2}$$



**Figure 2-16**

Représentation de l'encapsulation de bactéries en gouttes selon la loi de Poisson.

A : exemple d'encapsulation en microfluidique, seules 30 gouttes sont occupées par au moins une bactérie dont la fluorescence est visible en jaune sur l'image, on estime  $\lambda$ , le paramètre de la loi de Poisson, à 0,35. (méthode expérimentale d'après Boitard, 2012)

B : distribution de probabilités sur la taille de l'inoculum pour différente valeur de  $\lambda$ , le nombre moyen de cellules par goutte. C : Distribution de probabilité sur le rendement de croissance des inocula possible dans le cas de la co-encapsulation de deux phénotypes de bactéries pour  $\lambda = 1$ . Le phénotype 1 a un rendement de 1 et représente 20% de la population. Le phénotype 2 a un rendement de 2 et représente 80% de la population. En gris, les rendements nuls correspondent aux gouttes vides ; en bleu, les gouttes, dont le rendement est 2, contiennent exclusivement le phénotype 2 ; en rouge, les gouttes contenant au moins un individu du phénotype 1, on un rendement supérieur ou égal à 1 mais inférieur à 2. (voir le texte pour le calcul des rendements)

La Figure 2-16 montre la distribution des observations de rendement qui dépendent du nombre de phénotypes 1 et phénotypes 2 encapsulés dans la goutte. Le rendement de chaque goutte est déterminé linéairement par la composition de son inoculum. C'est-à-dire que les deux phénotypes n'interagissent pas et contribuent au rendement final à proportion de leur représentation initiale. On distingue trois situations à forte probabilité : les gouttes ne contenant que le phénotype 1, qui ont un rendement de 1, celles ne contenant que le phénotype 2, qui ont un rendement de 2, et les gouttes vides, qui ont un rendement nul. Il reste les cas de co-encapsulations hétérogènes dont le rendement est compris entre 1 et 2.

Dans notre démarche d'analyse de populations, nous souhaitons évaluer les fréquences des différents phénotypes à partir de la distribution d'encapsulation. Deux cas particuliers permettent cette évaluation. D'une part, le cas des gouttes qui contiennent au moins un représentant d'un phénotype :

$$P(n_1 \neq 0) = 1 - \text{Pois}(f_1 \cdot \lambda ; X = 0) = 1 - e^{-f_1 \cdot \lambda}$$

D'autre part le cas des gouttes qui contiennent exclusivement un phénotype donné :

$$P(n_1 \neq 0, n_2 = 0) = e^{-f_2 \cdot \lambda} - e^{-\lambda}$$

On peut identifier les classes correspondant à ces cas simples d'après l'observation comme pour le cas théorique de la Figure 2-16. Les classes rouges contiennent au moins un individu du phénotype 1, et la classe bleu contient exclusivement le phénotype 2. On peut ainsi estimer les probabilités de ces cas particuliers et en appliquant les formules, on en déduit l'estimation des fréquences  $f_1$  et  $f_2$ .

En conséquence, la co-encapsulation ne nous empêche pas d'analyser la composition phénotypique des populations. Cela nous permet de travailler avec des valeurs de paramètre  $\lambda$  allant jusqu'à 2, ce qui augmente significativement la taille de l'échantillon que nous pouvons analyser puisque le nombre de goutte vide peut descendre jusqu'à seulement 10%.

### 2.4.3 Analyse des courbes de croissance

Nous avons montré qu'une grande quantité d'informations quantitatives est acquise en parallèle sur 100 à 1000 croissances de microcolonies initiées par des bactéries uniques.

La collection de courbes ainsi acquise pour des clones issus d'une unique colonie prélevée sur un gel LB-agar est présentée sur la Figure 2-17. À notre connaissance, une telle répétabilité de la croissance mesurée à partir de cellules uniques n'est obtenue avec aucune autre technologie. L'homogénéité des conditions de culture sur 1000 bioréacteurs en parallèles n'est pas facile à obtenir. Il faut assurer une thermalisation homogène et éviter l'évaporation du milieu de culture, deux problèmes couramment rencontrés dans les systèmes de mesures sur microplaques. Dans notre dispositif, les réacteurs sont concentrés dans un espace restreint ce qui facilite la thermalisation. Il n'y a pas d'interface avec l'air, ce qui évite tout problème d'évaporation. Pour obtenir des résultats homogènes il faut également assurer de bonnes conditions d'agitations reproductibles pour prévenir notamment la sédimentation ou la formation de gradients dans le réacteur. Nous avons vu que la recirculation assure l'homogénéisation dans les gouttes (Figure 2-9). Enfin, la formation de biofilm sur les surfaces solides peut également nuire à la fiabilité d'une mesure. Or, notre système ne présente que des interfaces liquides.

L'ensemble des propriétés du dispositif, sans que cela ait été nécessairement anticipé, contribue à l'homogénéité remarquable des courbes de croissance obtenues.

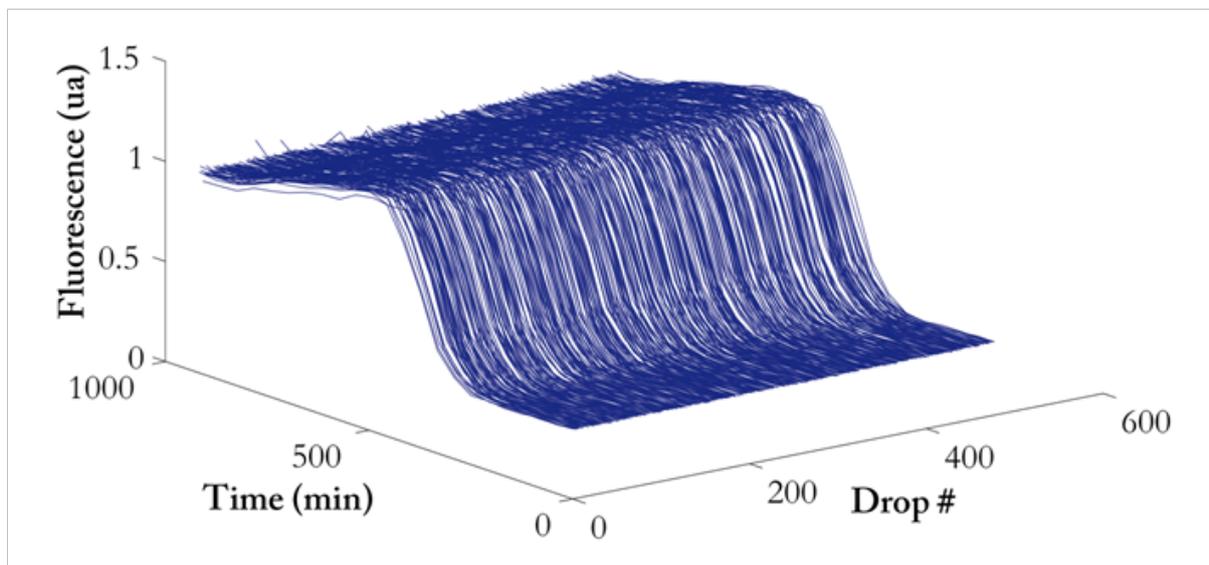


Figure 2-17

Courbes de croissance acquises sur 517 gouttes occupées parmi 1004 gouttes incubées et mesurées pendant 15h. Les gouttes contiennent 0,7 bactérie en moyenne.

Pour exploiter ces collections de courbes, une approche aurait pu consister à réaliser une exploration des données sans a priori avec des méthodes de traitement de données « aveugles ». Nous avons plutôt choisi d'extraire pour chaque bioréacteur les paramètres d'une modélisation simple de la croissance des microorganismes.

Il existe de nombreuses modélisations de la croissance de microorganismes (Kovárová-Kovar et Egli 1998) qui trouvent leur origine dans le travail de thèse de Jacques Monod (Monod 1949) et les modèles mathématiques de dynamique de population de Malthus et Verhulst au XIX<sup>e</sup> siècle.

Le modèle le plus simple est la croissance exponentielle de Malthus qui suppose que le taux d'accroissement de la population est proportionnel à la population existante  $N$ . Le coefficient qui relie les deux est appelé taux de croissance et souvent noté  $\mu$ .

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \text{ et } N = N_0 e^{\mu t}$$

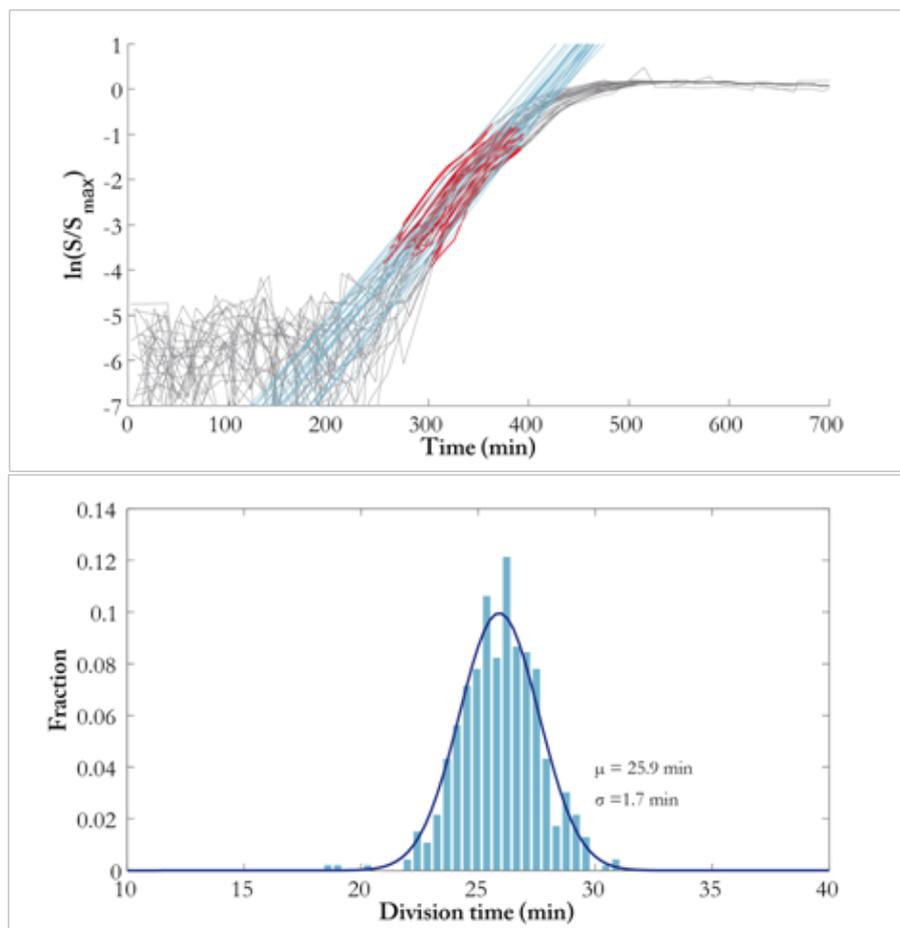


Figure 2-18

En haut, exemple d'ajustement de droites affines (bleu) sur les données sélectionnées (rouge) des courbes de croissance (gris) qui sont normalisées par leur valeur maximum. La pente correspond à l'estimation du taux de croissance. En bas, distribution des temps de division obtenus pour les 517 courbes de croissance.

Ce modèle simple est valable pour la majeure partie des microorganismes, au moins sur une partie de la courbe de croissance qui est appelée phase exponentielle. On peut définir le temps nécessaire pour doubler une population  $\tau$ . Ce temps  $\tau$  est appelé temps de division pour un organisme unicellulaire, car dans ce cas la division cellulaire conduit effectivement au doublement de la population.

$$\tau = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Le temps de division est le premier paramètre extrait des données. Chaque courbe de croissance mesurée en fluorescence est normalisée par sa valeur maximale. On réalise une régression linéaire sur le logarithme pour les valeurs comprise entre 0,02, seuil de détection défini précédemment, et 0,5. La borne supérieure est choisie comme la fin de la phase exponentielle puisque la population débute son dernier doublement avant la saturation à 1 (Figure 2-18). Le temps de division est donc estimé sur un accroissement de la population d'un facteur 25 ce qui n'est pas une très grande dynamique. Or, la phase exponentielle dans le milieu LB est considérée comme terminée pour une turbidité de 0,3. Cela impliquerait de déterminer le temps de division sur une dynamique très restreinte : les valeurs normalisées comprises entre 0,02 et 0,08.

En fait, la majeure partie de cette variabilité est lié à l'estimation. La dispersion des valeurs du temps de division obtenues est très large. En effet, une différence de 5% sur le temps de division correspond à un avantage sélectif très fort, par exemple sur les 17 générations de croissance qui se déroule dans une goutte cela créerait presque une génération d'écart.

Le second paramètre que nous pouvons extraire est le temps de détection (Time to detection : TTD). Il est très facile d'extraire des données le moment auquel le seuil de détection est atteint (Figure 2-19).

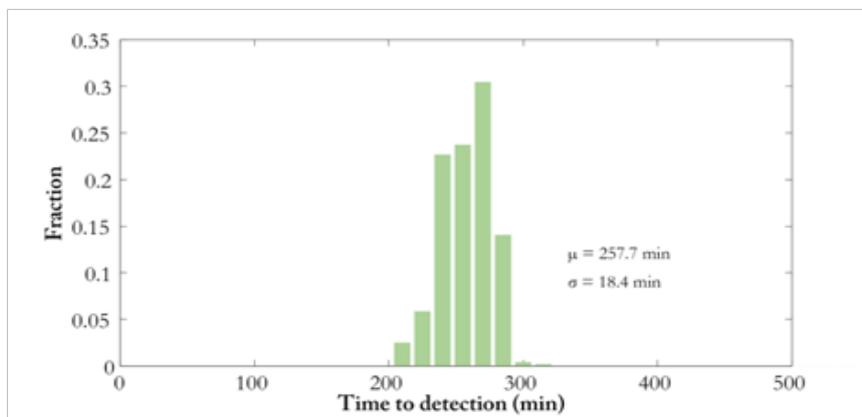


Figure 2-19 Distribution des temps de détection pour les 517 microcolonies mesurées.

Ce temps contient deux contributions distinctes. D'une part, lorsque l'inoculum est faible, c'est le cas pour l'exemple présenté sur les figures de ce paragraphe, il y a un temps de croissance nécessaire pour atteindre le seuil de détection. D'autre part, il peut exister un temps dit de latence, qui correspond à la durée d'une phase hypothétique qui précède la phase exponentielle, dite phase de latence. Cette phase correspond à un éventuel temps d'adaptation physiologique des bactéries au nouvel environnement avant la croissance exponentielle. On peut en déduire une relation affine entre le temps de détection et le temps de division  $\tau$ .

$$TTD = T_{latence} + \log_2 \left( \frac{N_{seuil}}{N_0} \right) \times \tau$$

Mais aucune corrélation n'est observée entre TTD et  $\tau$  (Figure 2-20). La variabilité sur les observations est trop importante.

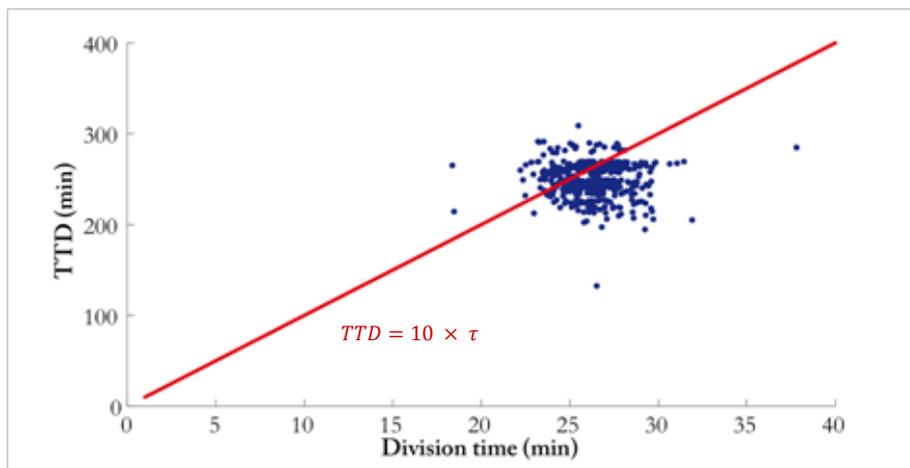


Figure 2-20

Dispersion des temps de détection et des temps de division comparée à la relation supposée entre ces deux paramètres

Le dernier paramètre que nous proposons d'extraire est la saturation du signal de fluorescence (Figure 2-21). Il rend compte du rendement des bactéries dans le milieu, c'est-à-dire la quantité de matière vivante créée grâce aux ressources disponibles dans le milieu. L'écart type relatif constaté sur ce paramètre dans les bioréacteurs est de 4,5%. L'écart type relatif sur la mesure de fluorescence dans des gouttes sans bactéries est de 2%.

Le niveau d'expression du gène de la protéine fluorescente YFP, qui est utilisée pour la mesure, peut influencer la mesure. Nous mesurons rigoureusement un rendement de fluorescence. Pour influencer notre mesure la différence de niveau d'expression doit être héréditaire. La différence doit affecter la fluorescence des  $10^5$  descendants contenus dans la goutte à la fin de la croissance. La mesure moyenne que nous réalisons efface en effet les fluctuations rapides du niveau d'expression. En cytométrie, par exemple, on constate, pour une population clonale, une distribution de la fluorescence mesurée par bactérie dont l'écart type relatif est de près de 30%. Mais ces différences de fluorescences ne sont pas héréditaires. Chaque individu de cette population aurait une descendance avec la même distribution de fluorescence. Ce sont les paramètres de la distribution qui sont héréditaires. Lorsqu'on analyse en goutte des bactéries uniques de cette population clonale,

elles ont chacune une fluorescence différente, comme mesurée en cytométrie. Mais leurs descendance reconstituent des distributions de fluorescence qui sont identiques. Nous mesurons la moyenne de la distribution qui est donc la même dans toutes les gouttes.

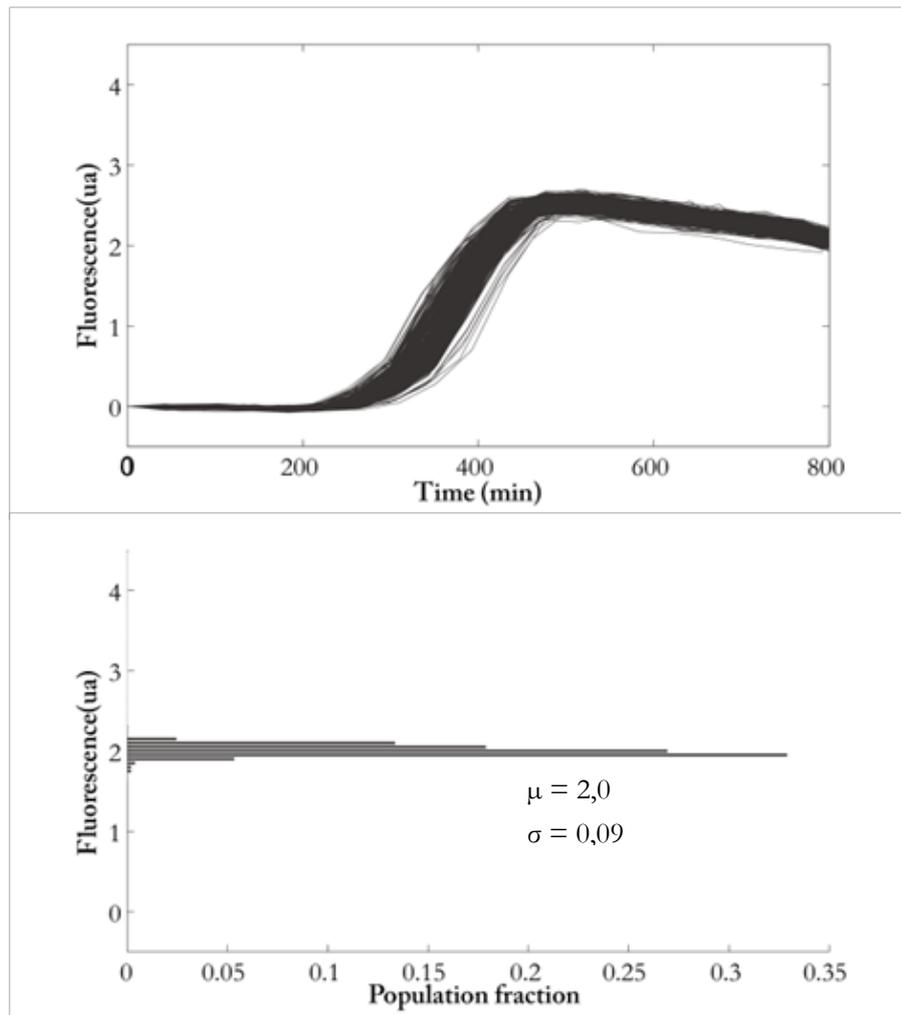


Figure 2-21 Courbes de croissance (à gauche) et distribution des valeurs de saturation (à droite). (N=517)

Le dispositif de phénotypage en millifluidique digitale nous permet de mesurer, via l'expression d'une protéine fluorescente, la croissance de mille colonies en parallèle. L'information quantitative obtenue est analysée grâce à trois paramètres pour chaque bioréacteur : le taux de croissance, le temps de détection et le signal de fluorescence de saturation. Les écarts types relatifs constatés sur ces paramètres sont respectivement 8%, 7% et 5%. Ce coefficient de variation observé pour une population la plus homogène possible est attribuable à notre outil de mesure et nous renseigne sur nos limites de résolution (Tableau 2-1). La précision et l'homogénéité des résultats sont remarquables. À notre connaissance, elles ne sont égalées par aucune autre technologie de cultures parallélisées.

<b>N=517</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Écart type relatif</b>
<b>Temps de division</b>	26 min	8%
<b>Temps de détection</b>	258 min	7%
<b>Intensité de fluorescence à saturation (ua)</b>	2,0 (ua)	5%

**Tableau 2-1**

Tableau récapitulatif la valeur moyenne et de la variabilité pour les paramètres extraits des courbes de croissance mesurées. L'écart type relatif trouvé pour une population clonale nous renseigne sur les limites de résolutions de l'appareil pour le phénotypage.

## 2.5 Conclusion

Notre dispositif expérimental permet d'analyser une population en réalisant une mesure sur un échantillon de cent à mille individus. Pour chaque individu, nous mesurons une courbe de croissance en fluorescence sur sa descendance jusqu'à épuisement des ressources du milieu, soit cent mille individus environ. Le phénotype que nous associons à chaque bactérie encapsulée et à son génotype correspond à l'ensemble de l'information contenue dans la courbe acquise sur sa goutte. La collection de courbes, acquise pour un échantillon, constitue un profil phénotypique de la population dans laquelle il a été prélevé.

D'après l'analyse réalisée sur un échantillon issu d'une colonie sur boîte de Petri, la mesure est particulièrement précise. En particulier, le coefficient de variation sur la valeur au plateau de la courbe est de moins de 5%. Nous devrions donc pouvoir distinguer des phénotypes dès qu'ils diffèrent de 10% sur ce paramètre. Le nombre de bactéries uniques que nous pouvons analyser lors d'une mesure (quelques centaines), nous permet de détecter des phénotypes qui ne représenteraient que 1% de la population.

Sur la base de la diversité des morphologies de colonies sur boîtes de Petri décrites dans des expériences d'évolution en laboratoire, nous devrions observer au moins une diversité similaire avec notre outil de mesure. Nous avons en plus l'avantage de produire, dans les gouttes, des environnements fermés remarquablement équivalents pour chaque individu testé, contrairement à la boîte de Petri où les colonies se développent dans un environnement ouvert et peuvent rapidement être influencées par le voisinage.

Nous allons maintenant utiliser notre outil de phénotypage, pour suivre au cours du temps ce profil phénotypique de populations macroscopiques cultivées selon des méthodes classiques. Un échantillon de la population est prélevé puis analysé avec le dispositif millifluidique.

Les applications de cette approche vont être présentées dans les trois chapitres suivants. D'abord, un cas simple où nous considérerons uniquement les deux états phénotypiques associés à la variation de phase du gène *ag43* (Chapitre 3). Il s'agit de valider notre stratégie sur un cas de diversité phénotypique bien connu. Nous suivrons ainsi au cours du temps la composition phénotypique au sein de populations clonales dans différents environnements. L'outil nous permet de le faire sans introduire de gène rapporteur, avec une discrimination quantitative des phénotypes et sur des périodes assez longues.

Dans les chapitres 4 et 5, nous appliquons cette méthode de phénotypage à des populations qui s'adaptent à un nouvel environnement, sans a priori sur les phénotypes attendus. La première transition environnementale étudiée est l'apparition d'une concentration sub-inhibitrice d'antibiotique. La seconde est l'épuisement des ressources et la dégradation des conditions dans un environnement fermé, aussi appelé phase stationnaire prolongée.





## Chapitre 3

---

Dynamique de population de la  
variation de phase du gène Ag43

---



### 3 Dynamique de population de la variation de phase du gène *ag43*

La diversité au sein d'une population joue un rôle important pour l'adaptation et la survie. Plus une population comporte de variations, plus elle a de chances qu'au moins un individu soit viable et/ou performant après un changement environnemental (Aertsen et Michiels 2005).

Le génome est le support de l'information et de l'hérédité du vivant. Dans les années 50, Jacob et Monod ont mis en évidence la régulation génétique de la synthèse des protéines, sur le cas de l'opéron lactose notamment (Jacob et Monod 1961), ce qui leur a valu le prix Nobel en 1957. Cette découverte a profondément marqué et orienté la manière de penser le lien entre l'information génétique, l'environnement et le phénotype exprimé. Puis, les efforts et les progrès réalisés pour le séquençage de l'ADN, c'est-à-dire la lecture de l'information portée par la séquence de l'ADN, ont abouti avec succès ces vingt dernières années, et ont produit une grande quantité de données (Hutchison 2007). Cet accès à l'information génétique a d'abord renforcé la vision déterministe de l'expression des gènes en réponse à l'environnement suivant un programme établi. Les autres supports d'information et d'hérédité qui existent dans le monde du vivant ont été négligés (Danchin et al. 2011). De même, l'aléatoire et la variabilité intrinsèque de l'expression des gènes avaient difficilement leur place dans l'idée de programmation génétique (Fraser et Kaern 2009)(Silva-Rocha et de Lorenzo 2010).

Évidemment la recherche des sources de diversité si favorable à la survie des espèces a subit le même biais. Ainsi, la capacité d'adaptation du vivant se réduirait, à court terme, à la régulation de l'expression génétique en réponse à l'environnement, puis, à plus long terme, à l'émergence d'une variation du code génétique qui procure un avantage sélectif.

La stratégie évolutive de « bet hedging », minimisation des risques, consiste au contraire à entretenir, à tout moment, une diversité sans relation avec l'environnement présent. Certains variants peuvent permettre la survie en cas de changement environnemental. Il s'agit alors de la survie du génome ou de la population qui est assurée et non plus celle de l'individu. De nombreuses validations théoriques de cette stratégie depuis les années 70 (Seeger et Brockmann 1987) ont précédé les validations expérimentales. En 2009, Beaumont et al. ont montré l'émergence d'une stratégie de « bet-hedging » dans une expérience d'évolution dirigée. Ils ont appliqué à une population des changements d'environnement répétés, combinés à un fort rétrécissement de la population (Beaumont et al. 2009). Un mécanisme de bet-hedging apparaît dans deux lignées sur douze.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à un système simple de « bet-hedging » avec deux états phénotypiques accessibles. Il s'agit de valider notre approche expérimentale pour la mesure de la diversité phénotypique sur un système simple. Nous avons cherché à montrer, par l'expérience et grâce à notre dispositif de phénotypage, comment la compétition entre les phénotypes et les transitions aléatoires de l'un vers l'autre régissent la dynamique de population dans différents environnements. Nous verrons qu'ils permettent à la colonie de s'adapter à son environnement alors que le système de régulation ne répond à aucun signal environnemental. Nous illustrerons

également que la variation de phase permet de préserver la fonction dans un environnement où elle représente un coût sélectif, un désavantage, dont il vaudrait donc mieux se défaire.

Nous présenterons d'abord la variation de phase du gène *antigen43 (ag43)*, le système modèle que nous avons étudié. Puis, nous détaillerons comment le dispositif de phénotypage présenté au chapitre précédent nous a permis de suivre la dynamique de population de deux phénotypes associés au gène *ag43* sans introduire de gène rapporteur spécifique. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus sur la dynamique de population dans différentes conditions. Ils mettent en évidence la compétition intra-clonale et mesurent les avantages sélectifs associés.

### 3.1 Variation de phase du gène *ag43* : état de l'art

Nous souhaitons étudier un système de diversification phénotypique simple ainsi que la stratégie de bet-hedging. Afin d'avoir de bons repères nous avons choisi de travailler sur une source connue et documentée de variabilité chez *E. coli* : la variation de phase du gène *ag43*. Nous allons présenter le phénomène de variation de phase avant de décrire en particulier le cas du gène *ag43*. Enfin, nous exposerons les techniques utilisées jusqu'à aujourd'hui pour étudier ce mécanisme.

#### 3.1.1 Variation de phase

La variation de phase a été observée dès 1922 par Andrewes. Il décrit une « salmonelle diphasique » qui est présente sous deux états d'agglutination différents (Andrewes 1922). Depuis, de nombreux autres systèmes ont été décrits pour une grande variété d'espèces (Henderson, Owen, et Nataro 1999). Les phénotypes sujets à des variations de phase sont la motilité, qui se rapporte aux mouvements, la synthèse de structures extra-membranaires ou la production d'antifongique.

Une variation de phase est un mécanisme qui produit, à partir d'un seul génome, des états phénotypiques distincts partiellement héréditaires. Ces différents états permettent généralement l'adaptation à différentes niches ou d'échapper à une menace. La variation sur certains traits antigéniques peut ainsi permettre d'échapper au système immunitaire d'un organisme hôte. Dans ce cas, il s'agit plus précisément d'une variation antigénique. La variation de phase permet de passer d'un état phénotypique à un autre, généralement de manière réversible. L'idée de « switch », ou d'interrupteur phénotypique, rend cette idée d'aller retour entre deux états.

Un réseau de régulation bistable (Chapitre 1 Ingrédients de l'adaptabilité), peut créer deux états phénotypiques différents qui peuvent être hérités (Veening, Smits, et Kuipers 2008). Cette bistabilité n'est pas considérée comme appartenant aux variations de phase (Dubnau et Losick 2006) bien qu'elle constitue un système tout à fait équivalent. Cette distinction peut se justifier par les mécanismes moléculaires différents qui sont à l'œuvre, mais elle est surtout historique et communautaire.

Enfin, la variation de phase est définie par les bornes imposées aux probabilités, ou fréquences, de transition entre les états phénotypiques. Cette grandeur rend compte des chances, pour une bactérie, de passer d'un état à l'autre. Elle est exprimée par unité de temps ce qui en fait une fréquence. Tout d'abord, chaque phénotype d'une variation de phase doit être au moins partiellement héréditaire. Cela signifie que la fréquence de transition doit rester faible par rapport à la fréquence de reproduction du microorganisme considéré :  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$  par cellule par génération. Ainsi, la descendance a de grande chance d'avoir le même phénotype et de le conserver pour quelques générations. Ensuite, la probabilité de transition doit être supérieure à celles de mutations

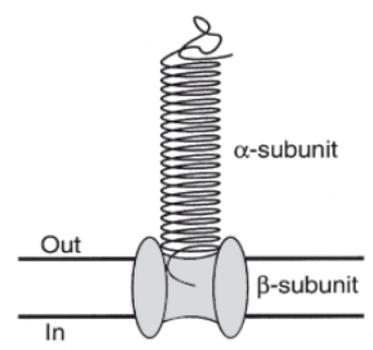
aléatoires de l'ADN. Elle est donc supérieure à  $10^{-6}$  par cellule par génération (Van Der Woude et Bäumlér 2004). Le mécanisme de variation de phase peut être génétique. Il fait alors intervenir des modifications de la séquence ADN qui sont favorisées, c'est à dire qu'elles se produisent plus souvent que les autres mutations (Chapitre 1 « Points chauds »). Un mécanisme qui ne modifie pas la séquence de l'ADN est dit épigénétique (Casadesus et Low 2006). C'est le cas de la variation de phase du gène *ag43* que nous allons étudier.

### 3.1.2 Le gène *ag43*

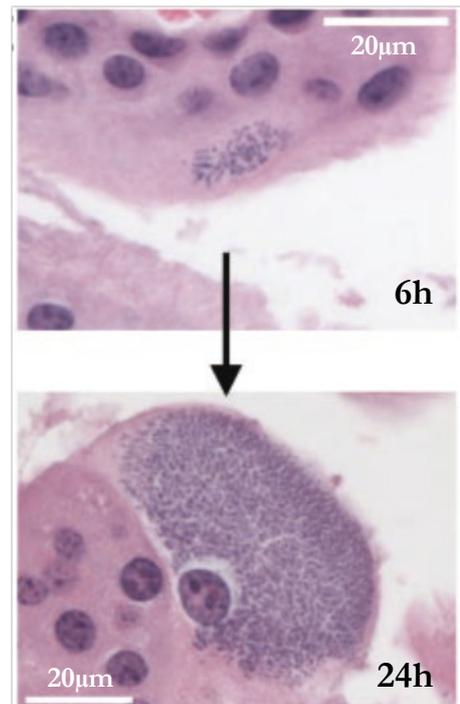
Nous nous intéressons à la variation de phase du gène *ag43*. Nous allons donc présenter ce gène et les phénotypes associés.

Le gène *ag43* code pour une protéine d'adhésion, qui permet à *E. coli* d'adhérer à des cellules animales. Lorsqu'elle est exprimée, elle induit également l'agrégation des bactéries par auto-adhésion. La protéine Ag43 est exprimée à l'extérieur de la membrane externe. Elle possède, dans sa structure, les domaines nécessaires pour se transporter elle-même à travers les membranes jusqu'à sa localisation fonctionnelle : c'est un autotransporteur. Ag43 comporte deux domaines. Le domaine  $\alpha$  qui est exposé à l'extérieur et le domaine  $\beta$  qui lui permet de traverser la membrane externe (van der Woude et Henderson 2008)(Figure 3-2).

La fonction de la protéine Ag43 n'est pas clairement établie. Il pourrait s'agir d'un facteur de virulence et de persistance pour les infections urinaires (Ulett et al. 2007). En effet, Ag43 semble favoriser, ou participer, à l'adhésion aux cellules épithéliales et à la formation de colonies intracellulaires comme celle montrée en Figure 3-1 (Anderson 2003). L'expression du gène *ag43* semble également déterminante pour la formation de biofilm (Da Re et al. 2007). Pour ces raisons, le gène *ag43* est considéré comme un facteur de virulence, c'est-à-dire qu'il participe à la pathogénicité. Même si la fonction du gène est encore mal connue, le gène est présent et conservé dans un grand nombre de souches, ce qui constitue une preuve indirecte de son utilité pour *E. coli*.



**Figure 3-2**  
Schéma de la protéine Ag43 avec son domaine extra-membranaire  $\alpha$  et le domaine transporteur  $\beta$



**Figure 3-1**  
Images au microscope d'une coupe colorée de vessie de souris 6h et 24h après le début d'une infection urinaire par Escherichia Coli. On observe le développement de colonies intracellulaires denses. (Andersson 2003).

Le gène *ag43* est responsable d'une variation de phase. Elle a été observée en premier par Diderichsen qui a remarqué la coexistence d'un phénotype floculant et d'un phénotype planctonique lors de cultures en milieu liquide (1980). La morphologie des colonies est différente pour les deux états phénotypiques (Henderson, Meehan, et Owen 1997). Comme nous le verrons, la fréquence de transition est de l'ordre de  $10^{-3}$  par génome par génération. Les bactéries

d'une colonie, un milliard d'individus issus d'un ancêtre unique, ont massivement le même phénotype que cet ancêtre (Figure 3-3), qui détermine donc la morphologie de la colonie.

Le mécanisme qui contrôle l'expression du gène est épigénétique. Il fait intervenir la méthylation et l'association spécifique d'un répresseur dans la région régulatrice du gène. La protéine de régulation du stress oxydant, OxyR, est le répresseur (Figure 3-3). Lorsqu'elle se lie à son site cible en amont du gène *ag43* elle bloque la transcription. Le gène n'est pas exprimé et le phénotype est appelé Ag43 OFF, ou phénotype planctonique. Si OxyR n'occupe pas son site de complexation, la protéine DAM, DNA Adenine methylation, peut méthyler les motifs GATC situés à cet endroit. C'est-à-dire que la protéine DAM ajoute un groupe méthyl à l'adénine de la séquence GATC. Lorsque ce site est méthylié, OxyR ne peut plus se lier à l'ADN à cet endroit (Lim et van Oudenaarden 2007). Le gène peut alors être exprimé et le phénotype est appelé Ag43 ON, ou phénotype agrégé. Chez *E. coli*, aucun mécanisme de déméthylation n'a été identifié. Lorsqu'un individu est ON, la réplication du chromosome est nécessaire pour obtenir un nouveau chromosome dont le site GATC, en amont du gène *ag43*, ne porte pas la méthylation. Ce nouveau chromosome peut devenir Ag43 ON ou Ag43 OFF. Si OxyR vient se lier au promoteur d'*ag43*, le gène n'est plus exprimé et l'état phénotypique devient Ag43 OFF. Le phénotype est différent de celui de la bactérie ancestrale. Mais si la protéine DAM méthyle le nouveau site GATC, le gène reste exprimé et le phénotype est Ag43 ON.

Les actions des deux régulateurs sont exclusives. La liaison d'OxyR empêche la méthylation par DAM, et la méthylation par DAM empêche la liaison d'OxyR. La transition d'un état phénotypique à un autre exige le passage par un état intermédiaire où le promoteur n'est ni occupé par OxyR ni méthylié (Figure 3-3).

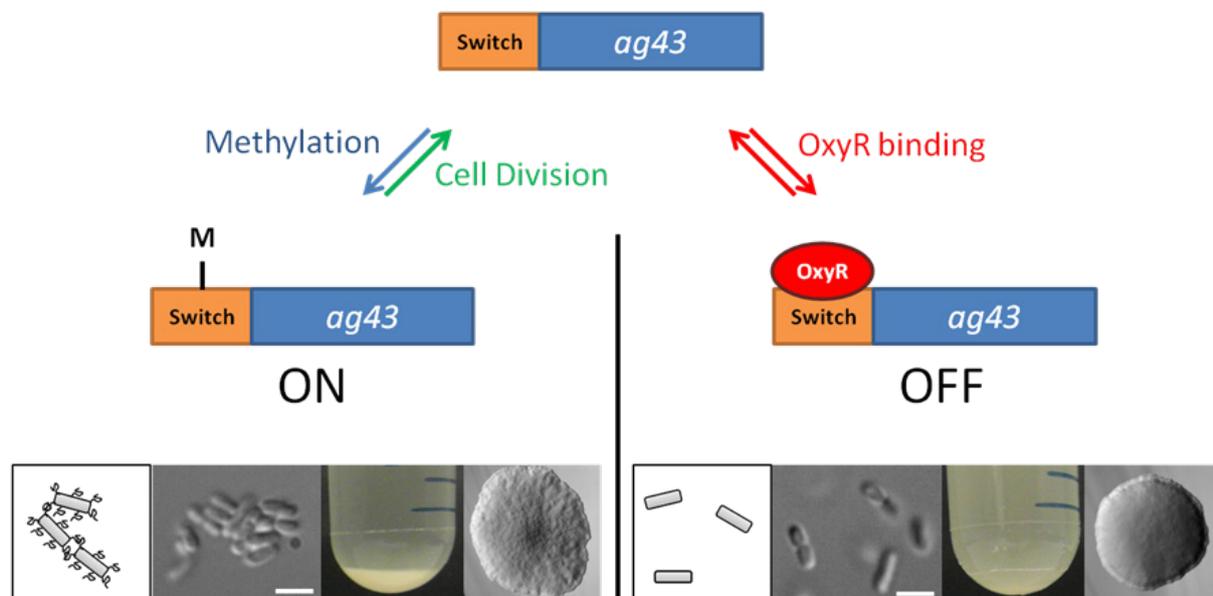


Figure 3-3

Schéma de la régulation du gène *ag43*. Les phénotypes sont illustrés à différentes échelles, de gauche à droite : dessin représentant l'expression de *ag43* (non à l'échelle), une image de microscopie à contraste interférentiel montrant l'agrégation induite par Ag43 (bar : 3µm), une photographie d'une culture sans agitation illustrant la floculation du phénotype ON, enfin la morphologie des colonies sur gel d'agar (microscope à champ clair, le diamètre des colonies est de 3 mm).

### 3.1.3 Identification et comptage des phénotypes

Comme nous l'avons vu dans la présentation d'*ag43*, la variation de phase est observable grâce à la différence de morphologie des colonies sur boîte de Petri. Il est donc possible de comptabiliser le nombre de colonies de chaque type et d'en déduire la composition phénotypique de la population inoculé sur la boîte. En effet, la morphologie de la colonie est déterminée par la bactérie ancestrale unique tant que les fréquences de transitions sont faibles car son phénotype reste majoritaire.

Il serait possible de suivre la dynamique de population des phénotypes en identifiant les morphologies. En pratique, distinguer les morphologies n'est pas évident et donc pas très précis. Pour palier à ce problème, les équipes qui se sont intéressées à la variation de phase ont eu recours à des constructions génétiques pour avoir un rapporteur de l'état d'expression du gène *ag43*. Ce rapporteur convertit l'état ON ou OFF en une information facile à lire. On peut remplacer la séquence codante d'*ag43* par celle d'une protéine fluorescente dont l'expression devient alors régulée par le domaine de régulation d'*ag43* (Figure 3-4 A) (Lim et van Oudenaarden 2007). Un autre rapporteur couramment utilisé est le gène *lacZ* qui code pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase (Chauhan et al. 2013). L'expression du gène peut être révélée en introduisant un substrat chromogénique dans le milieu. L'hydrolyse de ce substrat par la  $\beta$ -galactosidase libère un composé coloré. Le plus utilisé est appelé X-gal et donne une couleur bleu (Figure 3-4 B).

### 3.1.4 Fréquences de transition

La fréquence de transition est une probabilité par unité de temps que l'on assimile à une fréquence. Elle ne décrit pas des événements régulièrement distribués dans le temps mais un nombre moyen d'événements par unité de temps. Dans la suite, nous utiliserons deux unités de temps : la génération, le temps entre deux divisions cellulaires, ou la seconde. La génération est souvent utilisée comme unité de temps car elle est pertinente pour décrire une dynamique de population, mais aussi parce que certains mécanismes de transition dépendent effectivement du cycle cellulaire. Nous préférons, à certains moments, utiliser la seconde comme unité de temps, pour pouvoir comparer des situations où le temps de génération n'a pas de sens évident. Pour une conversion de l'un à l'autre, on considère un temps de génération de 25 minutes soit 1500 secondes. Enfin, cette fréquence, ou probabilité, s'applique au génome de chaque individu. On ajoute donc la précision «par génome » car elle donne du sens bien qu'elle ne soit pas nécessaire.



**Figure 3-4**

A : Illustration de la variation de phase d'*ag43* régulant l'expression d'une protéine fluorescente. Les flèches sur l'image de microscopie de contraste de phase à gauche indiquent les bactéries OFF. Elles ne sont pas fluorescentes sur l'image de microscopie de fluorescence à droite. (Lim 2007)

B : Photographies de colonies sur boîte de Petri illustrant le gène rapporteur qui code pour la  $\beta$ -galactosidase, *lacZ*. Les bactéries *Ag43* ON expriment cette enzyme dont l'activité sur le galactoside X-gal donne un produit bleu facilement observable. (Chauhan 2013)

En mesurant la composition des populations, on peut déterminer les fréquences de transition. Pour cela, on sélectionne sur une boîte de Petri une colonie dont on identifie nettement le phénotype, Ag43 ON par exemple. La population ainsi collectée était initialement composée d'un seul phénotype puisque qu'il n'y avait qu'une bactérie, c'est le phénotype d'origine de cette population. Au fil de la croissance sur la boîte de Petri la variation de phase fait apparaître des individus ayant le phénotype Ag43 OFF. Ainsi, à chaque génération, avec la fréquence de transition vers l'état OFF,  $k_{OFF}$  exprimée par génération, et  $N_{ON}$ , le nombre de bactéries Ag43 ON, le nombre de bactéries qui ont changé d'état est  $N_{ON} \times k_{OFF}$ . On néglige ici la transition dans l'autre sens car le nombre d'individus du phénotype émergent Ag43 OFF est très petit devant celui du phénotype d'origine Ag43 ON. On en déduit, en divisant par le nombre total de bactéries dans la population, qu'à chaque génération la fraction de phénotype d'origine Ag43 ON,  $x_{ON}$  est multiplié par  $1 - k_{OFF}$  :

$$x_{ON}(g + 1) = x_{ON}(g) \times (1 - k_{OFF})$$

Il s'agit d'une suite géométrique, on en déduit :

$$k_{OFF} = 1 - \sqrt[g]{x_{ON}(g)}$$

De manière symétrique on peut déterminer la fréquence  $k_{ON}$ .

Le raisonnement présenté ici applique une fréquence moyenne de transition sur une grandeur considérée continue, la fraction de phénotype Ag43 ON :  $x_{ON}$ . On ignore complètement le caractère aléatoire des transitions. Ce raisonnement est valable si le nombre de bactéries dans la population est grand. Mais, pour un petit nombre de bactéries, les fluctuations peuvent être très importantes. Or, dans les premières générations le nombre de bactéries est petit. Par exemple, la première bactérie sœur sera ON ou OFF. Elle a de grande chance d'être ON comme sa sœur car la probabilité de transition est faible. Mais si elle devient OFF, alors la fraction de ON passe brutalement de 1 à 0,5. Après quelques générations, le nombre d'individus dans la population est suffisamment grand pour rendre les fluctuations sur le nombre de changement d'état négligeables. Les événements rares survenus dans les premières générations sont responsables de la variabilité sur la fraction  $x_{ON}(g)$  mesurée après  $g$  générations (Figure 3-5). Cette variabilité est équivalente à celle trouvée par Luria et Delbrück pour les mutations spontanées. L'estimation de la fréquence à partir de la composition de colonies sur boîtes de Petri n'est pas simple et il faut donc analyser un grand nombre de colonies.

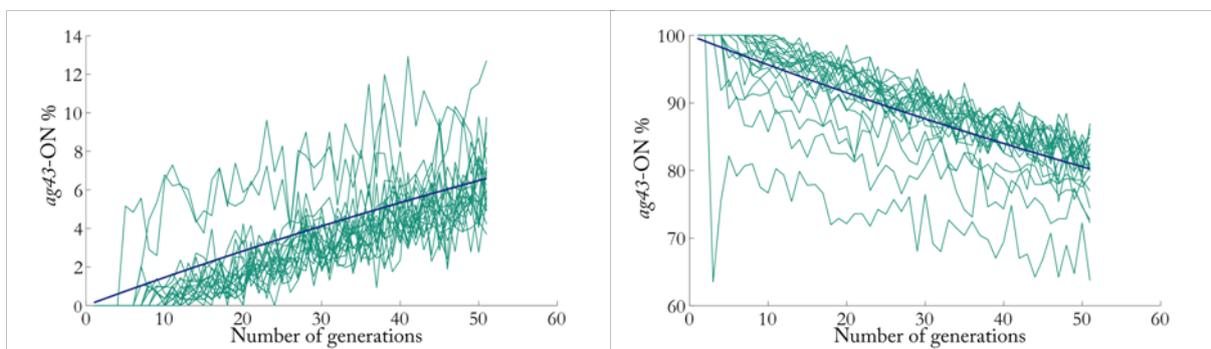


Figure 3-5

Simulation de l'évolution de la composition phénotypique à partir d'une unique bactérie, Ag43 OFF à gauche et Ag43 ON à droite, pendant 50 générations. 20 simulations indépendantes sont représentées. L'incertitude sur la transition phénotypique est simulée par une loi de poisson. La représentation inclut aussi des fluctuations de mesure sur la fraction phénotypique pour un échantillon de 300 individus analysés. La courbe bleue indique la réalisation moyenne, autrement dit le cas d'une population infinie connue sans incertitude.

Nous avons vu que les fréquences de transition d'état phénotypique sont difficiles à estimer. Les méthodes utilisées actuellement sont basées sur des souches génétiquement modifiées ce qui peut biaiser la dynamique vraie entre les deux phénotypes. De plus, le comptage des colonies sur gel LB-agar reste une technique fastidieuse.

Nous proposons d'adapter notre lecture phénotypique en millifluidique pour discriminer les phénotypes par un critère quantitatif et sans système rapporteur. Cette rupture technologique nous permettra de suivre l'ajustement de la composition en phénotypes Ag43 ON et Ag43 OFF d'une population pendant des périodes longues dans différents environnements. L'absence de système rapporteur permettra de considérer absolument sans biais une éventuelle compétition entre les deux phénotypes et le mécanisme de variations de phase.

## 3.2 Phénotypage d'*ag43* en millifluidique

Nous avons présenté la variation de phase du gène *ag43* que nous souhaitons étudier comme modèle d'une stratégie de « bet-hedging ». Les techniques couramment utilisées pour identifier les états phénotypiques du gène *ag43* nécessitent l'introduction d'un système rapporteur. Pour étudier la dynamique de population des deux phénotypes nous souhaitons éviter tout biais. En effet, en introduisant un gène rapporteur l'un des états phénotypiques se trouve désavantagé car il exprime une fonction qui est inutile pour la croissance ou la survie, puisqu'elle ne sert qu'à l'expérimentateur. Dans notre cas, le gène *yfp* introduit dans le chromosome, pour suivre la croissance par fluorescence, est totalement indépendant du gène *ag43* et représente donc strictement le même fardeau sélectif pour les deux états phénotypique du gène *ag43*. Nous avons exploité le signal récolté dans notre outil millifluidique de phénotypage pour identifier les deux phénotypes.

### 3.2.1 Discriminer les états phénotypiques

Comme lors de la croissance sur boîte de Petri, il est probable que le phénotype de l'ancêtre unique encapsulé détermine et modifie significativement la signature de la colonie dans la goutte. Nous analysons les courbes temporelles de fluorescence acquises pour chaque bioréacteur comme décrit au chapitre précédent. Les courbes acquises pour le phénotype Ag43 ON sont très différentes de celles obtenues pour *ag43* OFF (Figure 3-6). La signature du phénotype est simple et quantitative, elle nous permet de dénombrer les phénotypes dans la population analysée.

Dans notre dispositif de détection, le champ d'excitation est plus petit que la goutte (Figure 3-6) : la mesure devient très variable si la distribution des bactéries n'est pas homogène dans la goutte. À chaque passage devant le détecteur, la biomasse d'une goutte, c'est-à-dire l'ensemble des bactéries de la goutte, peut être répartie différemment et la quantité qui passe dans le champ d'excitation varie. Le signal de fluorescence mesuré dépend donc de la répartition dans la goutte. La mesure est sensible aux hétérogénéités de densité de bactéries dans la goutte. On peut quantifier cette hétérogénéité grâce aux valeurs enregistrées à chaque passage dans le plateau de la courbe de fluorescence. En effet, au niveau du plateau la biomasse totale dans la goutte est constante. Si la répartition de la biomasse est différente d'un passage à l'autre, la fluorescence mesurée peut varier très fort autour d'une valeur moyenne constante. En revanche, si la biomasse est idéalement distribuée, la mesure sera à chaque fois identique. Par conséquent, en calculant l'écart type de la collection de mesures faites dans le plateau de la courbe de fluorescence, on obtient une valeur numérique qui quantifie l'hétérogénéité de la distribution de biomasse dans la goutte.

Nous avons vu que le gène *ag43* induit l'auto-adhésion des bactéries lorsqu'il est exprimé. Des agrégats peuvent donc se former. Si une bactérie Ag43 ON est encapsulée, la colonie qui se développe forme essentiellement un agrégat car, après la division, les bactéries restent collées. L'hétérogénéité dans la goutte est donc très grande. À l'inverse, une colonie initiée par un individu Ag43 OFF est très majoritairement planctonique, donc uniformément distribuée dans la goutte. Il y a bien une signature du phénotype encapsulé dans le signal mesuré pour sa descendance. On peut discriminer les gouttes suivant les fluctuations constatées dans le plateau final de la courbe et déterminer ainsi la composition phénotypique de la population encapsulée (Figure 3-6).

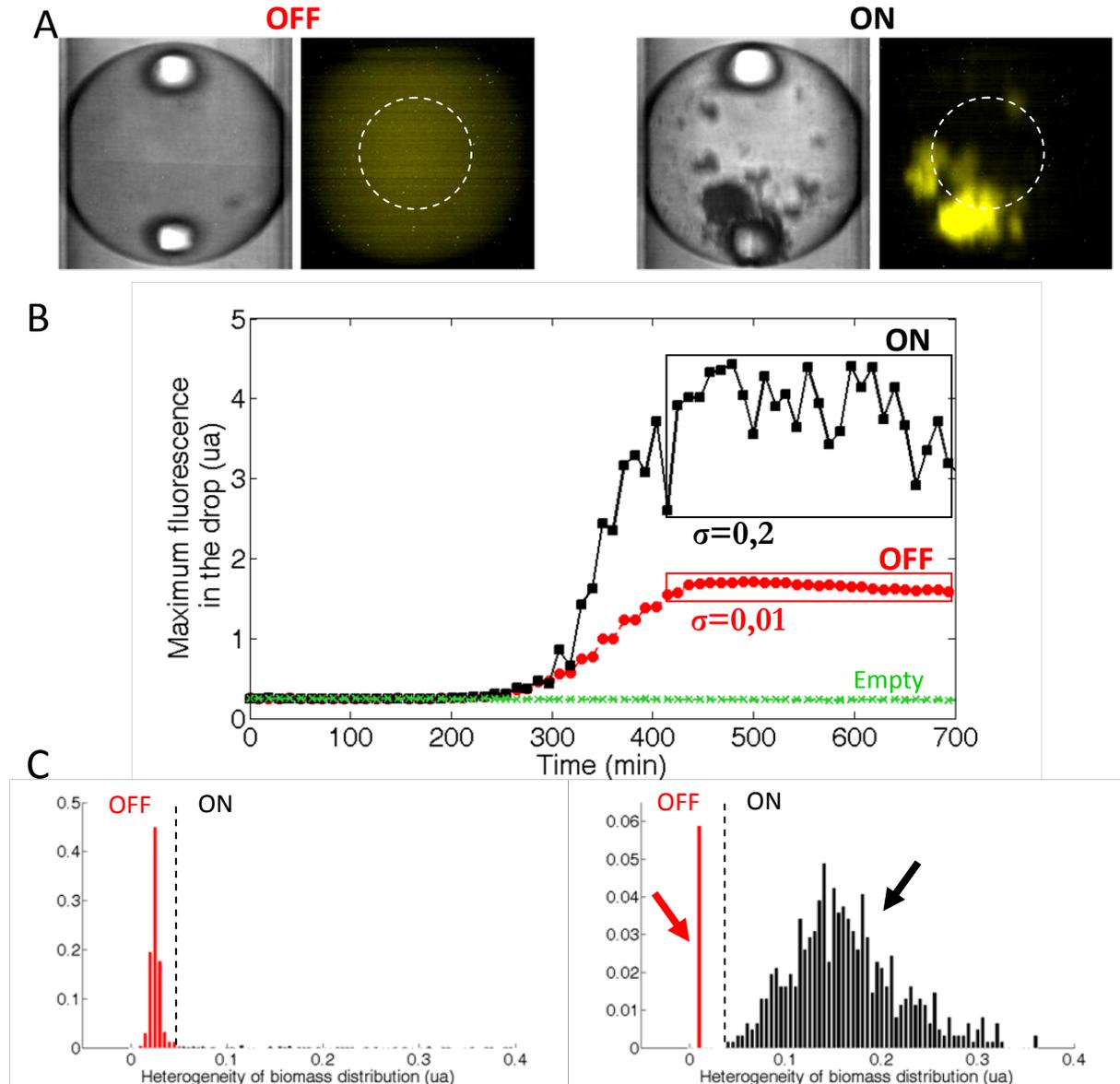


Figure 3-6

A : La répartition de biomasse dépend du phénotype de la cellule unique encapsulée. À gauche, la descendance d'un individu *ag43* OFF est uniformément distribuée dans la goutte (les tâches blanches sont des artefacts). La fluorescence (en jaune) est homogène et la mesure du signal issu du champ d'excitation utilisé (cercle tirets blancs) est répétable. À droite, on a encapsulé un individu *ag43* ON, la présence d'agrégats rend la fluorescence (en jaune) hétérogène et la mesure du signal issu du champ d'excitation utilisé (cercle tirets blancs) sera variable.

B : Pour une goutte, la fluorescence maximale enregistrée pour chaque passage est représentée en fonction du temps. Trois cas sont représentés : l'inoculum est une bactérie *Ag43* ON (carrés noirs) ou *Ag43* OFF (ronds rouges), la goutte est vide (croix vertes). L'écart type  $\sigma$  des valeurs dans le plateau final de chaque courbe dépend de l'hétérogénéité dans la goutte, et il permet de discriminer les phénotypes.

C : Histogrammes des écarts types calculés dans les plateaux des courbes des gouttes occupées. L'écart type est assimilé à une valeur d'hétérogénéité de biomasse dans la goutte. On peut définir un seuil (tirets) discriminant les gouttes occupées par un phénotype *Ag43* ON et les gouttes *Ag43* OFF. Les deux histogrammes correspondent à l'analyse de deux colonies de morphologies différentes sur boîte de Petri. À gauche, l'échantillon vient d'une colonie *Ag43* OFF et à droite d'une colonie *Ag43* ON. On retrouve bien une grande majorité du phénotype identifié d'après la morphologie de la colonie. Les flèches indiquent les positions dans l'histogramme des courbes présentées en B.

### 3.2.2 Vérifier le rôle d'*ag43*

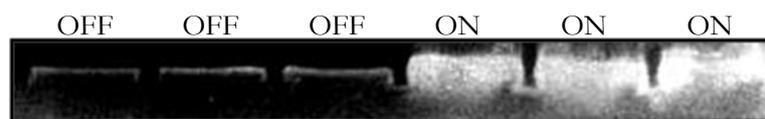
Nous identifions deux phénotypes, la composition phénotypique peut donc être déterminée. Les deux morphologies de colonie sur gel LB-agar coïncident avec les phénotypes que nous discriminons en goutte (Figure 3-6 C). Ces morphologies des colonies suggèrent bien que ces phénotypes sont associés à la variation de phase du gène *ag43*. Cependant, n'ayant pas construit la souche à dessein, nous avons vérifié cette hypothèse en testant la corrélation entre les deux morphologies de colonies et la synthèse de la protéine Ag43. Cette partie a été accomplie avec l'équipe de Spectrométrie de Masse Biologique et Protéomique de l'ESPCI ParisTech.

#### 3.2.2.1 Western Blot

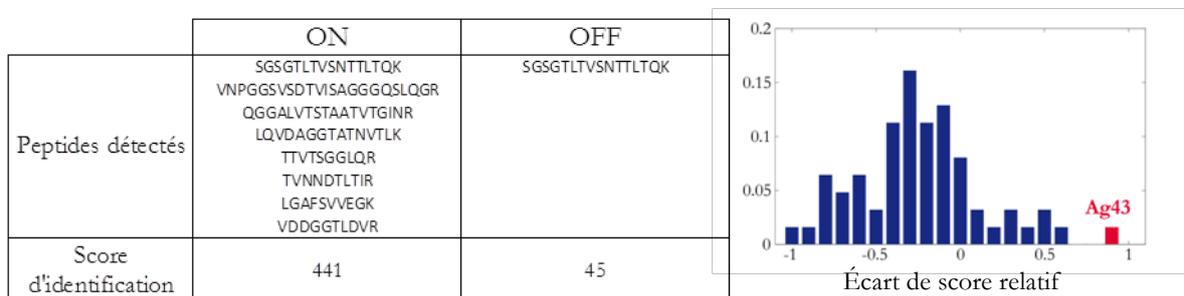
Nous avons isolé trois colonies pour chaque phénotype en les identifiant sur boîte de Petri. Les six populations sont mises en culture pour la nuit dans du milieu LB. Puis, elles sont relancées le matin jusqu'à une densité optique de 0,5, mesurée à 600 nm. Elles sont transférées dans du tampon phosphate (PBS) et les densités de bactéries sont ajustées à la même valeur.

L'extraction des protéines est réalisée en adaptant le protocole décrit par Per Klemm (2003). Les six suspensions de cellules sont chauffées à 60°C pendant 5 min pour libérer les domaines protéiques extra-membranaires. On centrifuge 10 minutes pour éliminer les cellules. On récupère le surnageant qui contient les protéines qui n'ont pas sédimenté. Puis, nous précipitons les protéines en ajoutant de l'acide trichloracétique pour une fraction finale de 10%. Après 15 minutes sur de la glace, les tubes sont centrifugés à 13 000g à 4°C pendant une heure. Le surnageant est éliminé et le culot qui contient les protéines est lavé trois fois à l'acétone à -20°C. Après une évaporation au SpeedVac® de 5 minutes, les protéines sont dispersées dans un tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> à 50 mM avec 5 minutes de bain à ultrason.

#### A Western blot



#### B Analyse protéomique



**Figure 3-7**

Résultats de contrôles réalisés sur l'expression de la protéine Ag43 associée aux phénotypes identifiés.

A : Photographie (inversée) d'un western blot de 3 populations Ag43 ON et Ag43 OFF

B : À gauche, le tableau présente les peptides détectés et le score d'identification de la protéine *ag43* dans les produits d'extraction d'une population Ag43 ON et Ag43 OFF traitées en parallèles. À droite, on a représenté la distribution des différences de score normalisée pour 62 protéines dont le score d'identification est supérieur à 100 dans une des deux préparations. En rouge, la position de la protéine Ag43.

Après une quantification par la méthode Lowry, les 6 échantillons sont chargés sur un gel polyacrylamide-SDS pour l'électrophorèse. Les protéines sont transférées sur une membrane. Les quantités de protéines présentes sont vérifiées avec une coloration au rouge Ponceau. Puis on révèle la présence de la protéine Ag43 grâce à un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre Ag43 et un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (GE Healthcare NA934V-lot 371624). L'anticorps dirigé contre Ag43 a été généreusement donné par l'ancienne équipe de Per Klemm.

Les trois populations identifiées comme comportant majoritairement le phénotype agrégeant montrent bien une bande plus réactive avec l'anticorps dirigé contre Ag43. (Figure 3-7 A)

### 3.2.2.2 Analyse protéomique LC-MS<sup>2</sup>

Le procédé d'extraction est identique que pour le Western Blot. Mais l'échantillon n'est pas chargé sur un gel d'électrophorèse. Il est digéré à la trypsine et les peptides sont analysés en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Nous avons bien détecté la protéine Ag43. Un plus grand nombre de peptides est identifié pour la population supposée Ag43 ON que pour celui supposé Ag43 OFF. Bien que la méthode ne soit pas quantitative, le nombre de peptides détecté est lié à la quantité de matériel présent dans l'échantillon analysé (Figure 3-7).

### 3.2.2.3 Immunofluorescence

Enfin, nous avons observé l'expression de la protéine Ag43 sur la membrane des bactéries qui s'agrègent en immunofluorescence indirecte. Le sérum de lapin dirigé contre Ag43 est d'abord adsorbé contre une population d'*E. coli* dépourvue du gène *ag43* pour éliminer tous les anticorps non spécifiques de la protéine Ag43. Ce protocole a été suggéré par Christophe Beloin.

Puis, les cultures de chaque phénotype sont rincées dans le PBS et déposées sur une lame de microscope traitée par une solution de poly-lysine à 0,1%. Les bactéries collées à la lame sont marquées avec l'anticorps rendu spécifique contre Ag43. Le marquage est révélé avec un anticorps secondaire anti-lapin fluorescent Alexa 534. Puis l'observation est faite au microscope, en épifluorescence, avec un jeu de filtre TRITC. (Figure 3-8)

Nous avons bien montré la corrélation entre l'expression de la protéine Ag43 et les deux phénotypes identifiés par la morphologie des colonies sur gel LB-agar. Nous avons montré précédemment que les phénotypes identifiés en millifluidique correspondent aux morphologies de colonies sur boîte de Petri. Notre dispositif permet bien de déterminer les fractions de bactéries dans chacun des états d'expression du gène *ag43*, au sein d'une population. Nous allons donc pouvoir suivre la dynamique des deux phénotypes de la variation de phase du gène *ag43* dans différents environnements.

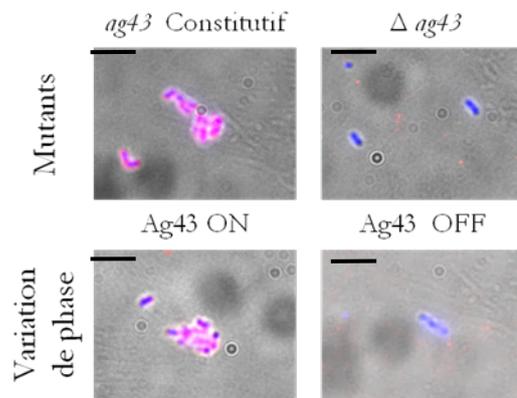


Figure 3-8

Images d'immunofluorescence avec un marquage DAPI (bleu sur l'image), et un marquage par l'anticorps dirigé contre Ag43 et un anticorps secondaire fluorescent (rouge sur l'image). La superposition des fluorescences à l'image en champ clair (100X, barre= 4µm) révèle l'expression de la protéine Ag43 à gauche pour le phénotype Ag43 ON (bas) et une souche exprimant le gène *ag43* de manière constitutive (haut). À droite, un mutant privé du gène *ag43* (haut) et le phénotype Ag43 OFF n'exprime pas Ag43.

### 3.3 Dynamique phénotypique d'une population clonale

Dans cette partie, nous présentons les résultats expérimentaux obtenus sur la dynamique phénotypique d'une population clonale d'*E. coli* dans différents environnements. Nous souhaitons montrer les contributions du mécanisme de variation de phase et de la compétition intra-colonie sur la composition phénotypique. Cette compétition fait partie du mécanisme de régulation du gène.

#### 3.3.1 Contribution de la variation de phase

Dans un premier temps, on s'intéresse à des conditions de laboratoire classiques. Pour une population incubée dans du milieu LB liquide sous agitation, le mécanisme de variation de phase suffit-il à expliquer la dynamique de population dans ces conditions ?

##### 3.3.1.1 Protocole

Les populations sont sélectionnées sur une boîte d'agar pour démarrer, suivant la morphologie choisie, soit d'une population contenant environ 5% de bactéries Ag43 ON soit d'une population en contenant 85%. Puis, la population est cultivée dans du milieu LB liquide selon les conditions choisies. Tout au long de la culture, des échantillons de cette population sont prélevés pour être congelés et analysés avec notre outil de phénotypage pour déterminer les fractions de phénotypes Ag43 ON et Ag43 OFF.

##### 3.3.1.2 Détermination des fréquences de transition

Pour commencer, nous caractérisons le mécanisme de variation de phase de notre souche d'*E. coli*. Nous avons vu, dans la partie 3.1.3, que la composition phénotypique des colonies prélevées sur gel d'agar nous permet habituellement d'estimer la fréquence de transition suivant l'équation :

$$k_{OFF} = 1 - \sqrt[g]{x_{ON}(g)}$$

On considère que la croissance d'une colonie sur un gel d'agar, à partir d'une bactérie unique, représente trente générations environ. Nous avons mesuré que les colonies Ag43 OFF comportent en moyenne 5% ( $\pm 3\%$ ) de phénotype Ag43 ON. Tandis que les colonies Ag43 ON comporte 15% ( $\pm 3\%$ ) de phénotype Ag43 OFF. Les fréquences de transition sont donc :

$$k_{OFF} \sim 4,5 \cdot 10^{-3} \text{ par génome et par génération}$$

$$k_{ON} \sim 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ par génome et par génération}$$

Ces fréquences sont en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature (Owen et al. 1996). La première contribution de la variation de phase est simplement d'assurer que la population contienne les deux états phénotypiques en moins de 10 générations environ. Cette apparition de diversité, et d'un changement phénotypique en particulier, est très rapide comparée à la fréquence d'apparition d'une mutation sur un gène en particulier qui est de  $10^{-7}$  par génome et par génération. On considère pour la suite que les fréquences de transition ne sont pas modifiées par l'environnement. Cette hypothèse repose sur l'absence de régulation connue du changement d'états. En effet, plusieurs études ont cherché, sans succès, à montrer une modulation des fréquences de transition par l'environnement pour la variation de phase d'*ag43* (Wallecha et al. 2003)(van der Woude et Henderson 2008).

### 3.3.1.3 Croissance en milieu homogène

Nous connaissons les fréquences de transition du système de régulation d'*ag43*. Nous allons maintenant voir si la dynamique de population dans un milieu homogène renouvelé est contrôlée par la transition de phase. Pour assurer l'homogénéité, le milieu est maintenu sous agitation, et pour maintenir la population en croissance, la culture est diluée dans du milieu frais deux fois par jour.

L'environnement considéré est inoculé avec une colonie dont la morphologie correspond au phénotype Ag43 ON sur une boîte de Petri. La population initiale dans ce milieu liquide comporte donc environ 85% d'individus de phénotype Ag43 ON. On propage la population pendant 6 jours à raison de deux dilutions par jour. Chaque dilution correspond à 16 générations de croissance avant d'atteindre une phase stationnaire jusqu'à la prochaine dilution. La population est analysée une fois par jour avec le dispositif de phénotypage.

On constate que le pourcentage du phénotype Ag43 ON diminue de 85% à 40% en 6 jours ou 180 générations environ. Cette évolution est très bien décrite par un modèle simple de la transition de phase en utilisant les fréquences  $k_{ON}$  et  $k_{OFF}$  déterminées précédemment (Figure 3-9 à gauche). Pour convertir les fréquences par génomes et par générations en fréquences temporelles, nous avons considéré 32 générations par tranche de 24h. L'équation et les valeurs utilisées pour la courbe de la Figure 3-9 sont les suivantes :

$$\frac{dx_{ON}}{dt} = k_{ON} \cdot (1 - x_{ON}) - k_{OFF} \cdot x_{ON}$$

$$k_{ON} = 5 \cdot 10^{-7} s^{-1} \quad k_{OFF} = 1,7 \cdot 10^{-6} s^{-1}$$

Avec cet exemple, on constate que la variation de phase contrôle la dynamique de population et tend à ramener la composition vers une valeur d'équilibre qui, d'après les fréquences de transitions, serait  $x_{ON} = 25\%$  et serait atteinte en 15 jours. L'agitation permanente du milieu liquide limite la formation d'agrégats et empêche la sédimentation. Les deux phénotypes ont donc principalement les mêmes conditions de croissance. Seule la variation de phase modifie la composition phénotypique.

### 3.3.1.4 Famine en milieu homogène

Nous avons vu la dynamique de population dans des conditions de croissance rapide. Les bactéries se divisent souvent et à chaque division elles répliquent leur ADN. Or, la réplication de l'ADN joue un rôle déterminant dans le mécanisme de variation de phase décrit à ce jour. Elle est indispensable pour sortir de l'état Ag43 ON (Figure 3-3).

Si notre hypothèse de contrôle principal de la dynamique de population par la variation de phase est valable, en l'absence de division cellulaire ou du moins dans des conditions de croissance restreinte, l'évolution temporelle de la fraction d'Ag43 ON devrait être modifiée. C'est ce que nous avons testé en maintenant en condition de carence deux populations dont les fractions Ag43 ON initiales étaient respectivement de 0,87 et 0,04 (Figure 3-9 à droite).

Nous observons que la fraction de phénotypes *ag43* ON élevée diminue très peu en six jours. Ce qui se justifie bien car en situation de carence il y a peu de réplication de l'ADN donc peu d'occasion de basculer vers *ag43* OFF. On considère qu'elle est constante (une droite sur la Figure 3-9) et que la fréquence  $k_{off}$  est nulle. Dans la population comportant initialement 4% d'*ag43* ON, le pourcentage de ce phénotype agrégeant augmente. Cette dynamique peut être modélisée en considérant que la

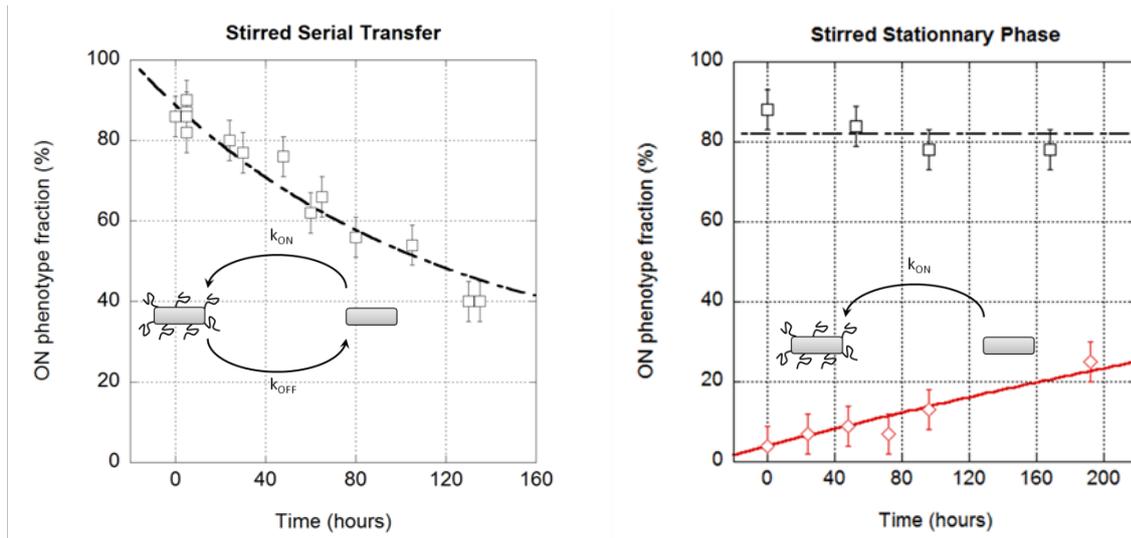


Figure 3-9

Dynamique de la composition phénotypique dans un environnement liquide homogène (agité). À gauche, la population est diluée dans du milieu frais deux fois par jour, elle est principalement en phase de croissance. À droite, la population est maintenue dans le même milieu, elle est donc exclusivement en situation de carence. On suit la fraction de ON en partant d'une population à 87% ON (carrés noirs) ou à 4% ON (diamants rouges). (voir le texte pour le modèle des courbes ajustées)

transition vers OFF est nulle (courbe continue rouge sur la Figure 3-9). On trouve alors une valeur de  $k_{on}$  de  $3.10^{-7} s^{-1}$  proche de celle trouvée précédemment.

$$\frac{dx_{ON}}{dt} = k_{ON} \cdot (1 - x_{ON})$$

$$k_{ON} = 3.10^{-7} s^{-1}$$

$$k_{OFF} \sim 0$$

La dynamique de population est bien décrite par le mécanisme de variation de phase. Nous avons ici considéré un environnement très homogène et dont l'agitation constante empêche la floculation du phénotype Ag43 ON. On peut considérer que le phénotype ne s'exprime que partiellement. La protéine Ag43 est bien synthétisée, mais l'agitation est trop importante pour permettre la floculation ou pour former des agrégats affectant la croissance. Les amas ne sont pas assez gros pour changer l'accès aux nutriments comparé au phénotype planctonique. Finalement, la seule différence sélective serait le coût de la production de la protéine Ag43 qui ne semble pas avoir d'effet significatif.

Pour tester l'effet d'un réel avantage sélectif sur la dynamique de population, il faut étudier le devenir de la composition phénotypique dans un autre environnement.

### 3.3.2 Compétition intra-clonal

Il est intéressant de constater qu'en l'absence de réponse active à l'environnement, si un état phénotypique est plus performant que l'autre pour se multiplier, il va augmenter son contingent au sein de la population clonale. Finalement, au sein même d'une population de génomes rigoureusement équivalents, la sélection naturelle module la composition phénotypique.

#### 3.3.2.1 Dynamique de population en milieu statique

Pour observer cet effet, nous avons considéré la dynamique de population dans deux nouveaux environnements. Dans l'un, on procède aux dilutions dans du milieu frais deux fois par jour, et dans l'autre, on laisse les bactéries en situation de carence. Les conditions de cultures sont analogues aux précédentes mais le tube n'est pas agité, il est maintenu statique. En l'absence d'agitation, le liquide est stagnant et se structure en formant des gradients de composition. Les bactéries n'ont pas de flagelles, il n'y a pas de motilité, et il n'y a pas de mouvement de fluide pour les déplacer dans l'environnement. Enfin si des agrégats se forment, ils peuvent croître sans risquer d'être dispersés par le cisaillement de l'agitation. Ils sédimentent rapidement.

Pour suivre la dynamique de population, le milieu est homogénéisé avant la prise d'échantillon afin de mesurer la composition phénotypique d'ensemble. Cette étape détruit la structuration de l'environnement. Par conséquent, dans le cas d'une population en situation de carence (Figure 3-10 droite), chaque mesure est réalisée sur une éprouvette différente. Dans le cas de la dilution en série, qui maintient la population en phase de croissance (Figure 3-10 gauche), l'inoculum utilisé pour la dilution est aussi prélevé après homogénéisation. Nous pouvons donc analyser la composition phénotypique grâce aux prélèvements réalisés lors des dilutions.

Dans les conditions statiques, on observe que le phénotype Ag43 ON disparaît plus rapidement que dans les conditions homogènes étudiées précédemment. La fraction phénotype Ag43 ON diminue

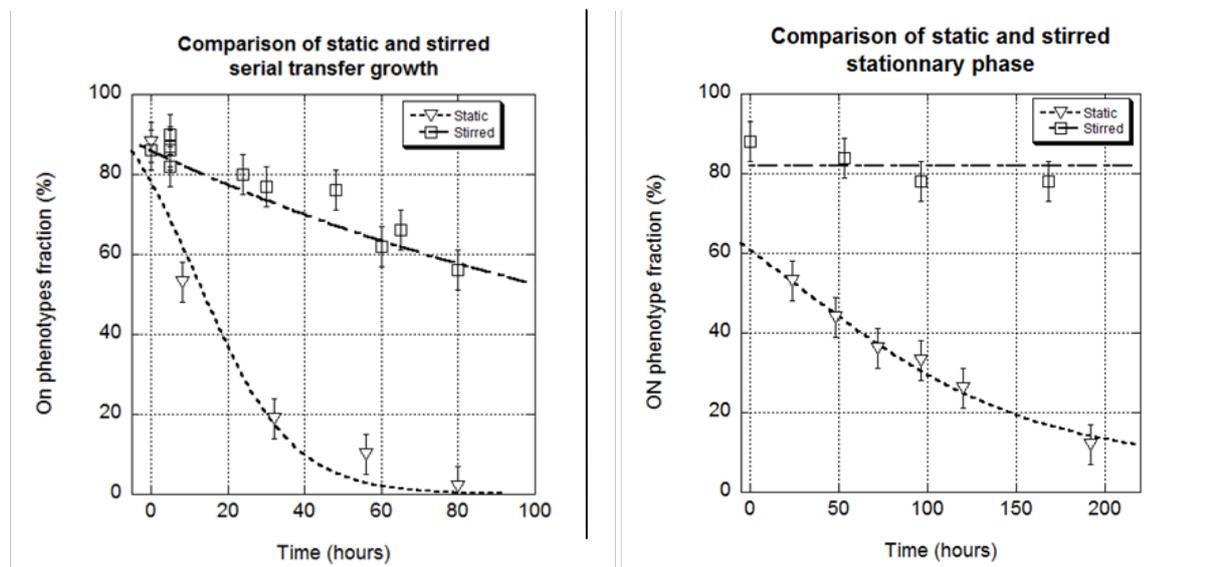


Figure 3-10

Comparaison des dynamiques de population dans deux environnements statiques (triangle), qui permettent la sédimentation et l'hétérogénéité chimique, et deux environnements homogénéisés par agitation (carrés). À gauche, la population est principalement en croissance car elle est diluée deux fois par jour dans du milieu neuf. À droite, après une phase de croissance d'une dizaine de générations, la population est maintenue en carence dans l'environnement statique. Les courbes ajustées différentes de la Figure 3-9 sont expliquées dans le texte (page 90)

particulièrement brutalement dans le cas de la culture statique diluée deux fois par jours dans du milieu frais (Figure 3-10 gauche). Dans cet environnement, le phénotype Ag43 ON qui représente 85% de la population initialement est réduit à moins de 20% en moins de 48 heures. Il semble converger vers une fraction inférieure à 1% en quatre jours seulement alors que, dans les conditions homogènes, la composition phénotypique mettrait deux semaines à se stabiliser vers 25%.

Un résultat similaire est observé pour les populations laissées en phase stationnaire (Figure 3-10 droite). Le décrochage initial de la fraction d'Ag43 ON est dû à la phase de croissance exponentielle initiale nécessaire pour atteindre la phase stationnaire. Dans la phase stationnaire la fraction de phénotype Ag43 ON continue à diminuer de près de 10% par jour. Pourtant, dans l'environnement homogène, la fraction de phénotype Ag43 ON est quasiment constante.

Nous n'avons pas de raison de penser que les fréquences sont modifiées lorsqu'on arrête d'agiter les tubes de culture. Et nous avons évoqué le fait qu'aucune régulation du mécanisme de variation de phase du gène *ag43* n'a été identifiée. Par conséquent, pour expliquer la disparition du phénotype ON, autrement dit l'envahissement de ces environnements statiques par le phénotype OFF, nous devons considérer une sélection naturelle, un avantage sélectif.

### 3.3.2.2 Modèle incluant la compétition

Pour modéliser la dynamique de population radicalement différente observée dans les environnements statiques, nous proposons un modèle simple incluant une compétition entre les deux phénotypes. Ce modèle est basé sur l'hypothèse que les fréquences de transition ne sont pas modifiées directement par les conditions environnementales. En effet, si les fréquences de transition phénotypique restent les mêmes que dans les milieux sous agitation, un autre mécanisme doit contribuer à l'évolution temporelle de la composition phénotypique. Un avantage sélectif pour l'un des deux phénotypes

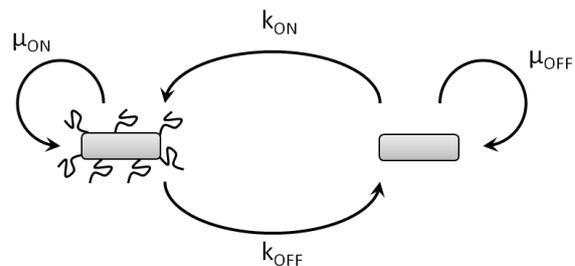


Figure 3-11

Schéma de la dynamique de population incluant la variation de phase et une différence de croissance entre les deux phénotypes qui induit un avantage sélectif pour l'un des deux.

pourrait expliquer nos observations (Figure 3-11). Dans le milieu statique, le phénotype Ag43 ON forme de gros agrégats. Ces agrégats peuvent nuire à l'efficacité de capture de nutriment par ce phénotype. De plus, les bactéries agrégées sédimentent rapidement et les conditions de croissance au fond du tube sont probablement moins favorables que dans la région la plus proche de l'interface eau-air. Le pH et la composition en gaz dissout ne sont pas homogènes dans un environnement sans agitation. Par conséquent, le phénotype planctonique aurait un taux de croissance supérieur car il occupe probablement des régions de l'environnement plus favorable.

On suppose qu'en dehors de la variation de phase, les populations ont un taux de croissance constant dans un environnement donné. Ce taux croissance tient compte du rythme de division cellulaire et de la mortalité. On le note  $\mu_{on}$  et  $\mu_{off}$  pour les phénotypes Ag43 ON et Ag43 OFF. S'il n'y a pas de changement d'état phénotypique, le nombre de bactéries ON est simplement décrit par :

$$N_{ON}(t) = N_{ON}^0 e^{\mu_{ON}t}$$

### 3.3 Dynamique phénotypique d'une population clonale

On peut écrire l'équation différentielle déterminant le nombre de bactéries de chaque phénotype,  $N_{ON}$  et  $N_{OFF}$ , et en déduire celle sur la fraction du phénotype ON,  $x_{ON}$  :

$$\frac{dN_{ON}}{dt} = \mu_{ON} \cdot N_{ON} + k_{ON} \cdot N_{OFF} - k_{OFF} \cdot N_{ON}$$

$$\frac{dx_{ON}}{dt} = \frac{d \frac{N_{ON}}{N_{ON} + N_{OFF}}}{dt} = \frac{(N_{ON} + N_{OFF}) \cdot \frac{dN_{ON}}{dt} - N_{ON} \cdot \left( \frac{dN_{ON}}{dt} + \frac{dN_{OFF}}{dt} \right)}{(N_{ON} + N_{OFF})^2}$$

$$\frac{dx_{ON}}{dt} = k_{ON} \cdot (1 - x_{ON}) - k_{OFF} \cdot x_{ON} + \mu_{ON} \cdot x_{ON} - x_{ON} \cdot (\mu_{ON} \cdot x_{ON} + \mu_{OFF} \cdot x_{OFF})$$

$$\frac{dx_{ON}}{dt} = k_{ON} \cdot (1 - x_{ON}) - k_{OFF} \cdot x_{ON} + (\mu_{ON} - \mu_{OFF}) \cdot x_{ON} \cdot (1 - x_{ON})$$

On voit apparaître un terme supplémentaire qui rend compte de la compétition entre les deux phénotypes et de l'écart de performance  $\mu_{ON} - \mu_{OFF}$ .

On peut ajuster les données avec ce nouveau modèle (Figure 3-10) en fixant les fréquences de transition aux valeurs déterminées précédemment en laissant l'écart de performance,  $\mu_{ON} - \mu_{OFF}$ , comme seul paramètre ajustable.

Dans le cas de la croissance en milieu statique avec deux dilutions par jour, l'ajustement des données avec le modèle nous donne un avantage sélectif de  $2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  (courbe ajustée Figure 3-10 à gauche). Cela signifie qu'après 24h, la descendance par bactérie du phénotype Ag43 OFF est 4 fois plus grande que celle du phénotype ON. Sur ces 24h, la population alterne croissance exponentielle et phase stationnaire. Elle croît d'une vingtaine de générations en phase exponentielle sur 24 heures. Si l'avantage sélectif porte sur la vitesse de croissance, alors le phénotype Ag43 OFF se divise 10% plus vite soit un temps de division 10% plus court. Comme notre population épuise le milieu avant chaque dilution dans du milieu frais, l'avantage sélectif peut également venir d'une efficacité accrue à croître sur les ressources disponibles. Enfin, pour compléter l'interprétation de cet avantage sélectif du phénotype planctonique, il faut considérer que les conditions de croissance des deux phénotypes évoluent au cours du temps. En effet, le phénotype Ag43 ON a tendance à flocculer et occupe donc une fraction restreinte de l'environnement au fond du tube en fin de croissance. La répartition des ressources est donc sans doute un facteur déterminant dans la différence de performance constatée. L'avantage sélectif dépend alors de la composition phénotypique de la population ce que notre modèle simple ne prend pas en compte.

En situation de carence dans un milieu statique, on trouve un avantage sélectif de  $4 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  (courbe ajustée Figure 3-10 à droite) pour le phénotype planctonique. Cela correspond à une différence de croissance ou de survie de 30% sur 24h. Ici, bien que la tendance soit la même, la dynamique de population qui se joue est radicalement différente du cas précédent. En phase stationnaire, il n'y a quasiment plus de division cellulaire. Il s'agit plus d'une lutte pour la survie. Cela peut expliquer que la dynamique apparaisse plus lente que dans les conditions de croissance exponentielle. En revanche, les causes de l'avantage sélectif pour le phénotype planctonique Ag43 OFF sont probablement les mêmes. Le phénotype Ag43 ON a plus de chance de se retrouver au fond du tube où les conditions sont probablement les moins favorables. Ses chances de survie ou de division sont réduites par

rapport au phénotype planctonique. Ce dernier peut coloniser le surnageant où il peut trouver des conditions plus favorables ou tout simplement un « réservoir » plus grand.

Nous verrons au chapitre 5 que dans ces conditions de carence statique d'autres phénotypes apparaissent. Ils sont planctoniques mais rien ne nous garantit qu'ils soient *Ag43 OFF*. La population est beaucoup plus complexe et notre représentation avec deux phénotypes n'est peut être plus tout à fait valable au-delà de 5 jours. D'autres mécanismes de diversification modifient la composition phénotypique.

### 3.3.2.3 Colonisation de niche et préservation de fonction

Les quatre environnements présentés jusqu'à maintenant, semblent indiquer que le phénotype agrégé, associé à l'expression du gène *ag43*, est inutile voire désavantageux pour la souche. En effet, l'état planctonique présente un avantage sélectif important dans les environnements statiques. Pourtant, le gène est présent dans de nombreuses souches d'*E. coli*, signe d'une conservation qui ne doit pas être due au hasard. Dans cette dernière partie nous présentons deux résultats qui illustrent comment l'expression du gène *ag43* peut constituer un atout, et pourquoi le mécanisme de variation de phase est un système de préservation de la fonction.

Comme nous l'avons discuté dans la présentation du gène *ag43*, une des fonctions supposées de la protéine extra-membranaire *Ag43* est l'adhésion à des cellules animales. Cette adhésion peut permettre la colonisation de niches autrement inaccessibles. Dans ce cas, seul le phénotype *Ag43 ON* peut accéder à la niche. Par conséquent, il a un avantage sélectif radical sur *Ag43 OFF*. Nous pouvons concevoir simplement un environnement artificiel reproduisant partiellement ce potentiel de colonisation de niches. Le phénotype *Ag43 ON* aura alors un avantage sélectif et nous devrions en observer les conséquences sur l'augmentation de sa fraction dans la population. Nous avons réalisé cette expérience en imaginant un environnement sans agitation permettant la formation d'agrégats par le phénotype *Ag43 ON* et la sédimentation de ces derniers. Deux fois par jour, on

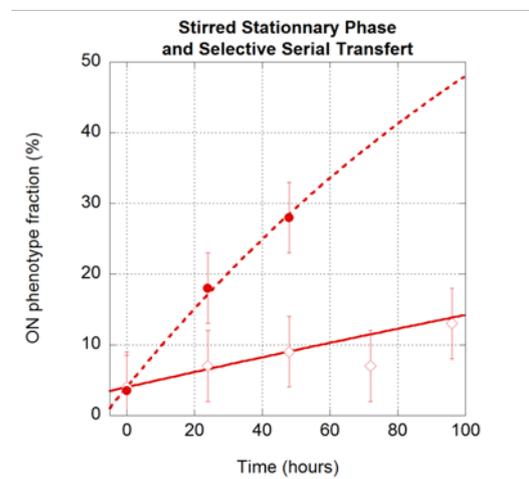


Figure 3-12

Envahissement de la population par le phénotype *Ag43 ON* lorsqu'on exerce, en sa faveur, une pression de sélection artificielle (ronds pleins). Elle consiste à laisser la culture statique pour permettre la floculation. Lors des reprises, deux fois par jour, on prélève systématiquement 10  $\mu$ L de sédiment au fond du tube pour inoculer la culture suivante. Le phénotype *Ag43 ON*, agrégé, sédimente plus vite. Sa fraction est donc plus grande dans le sédiment. La dynamique sous contrôle de la variation de phase en phase stationnaire homogène (losanges blancs) est rappelée pour comparaison.

Deux fois par jour, on prélève un échantillon pour inoculer un nouveau tube. Cette fois-ci, sans homogénéiser le tube, on aspire 10 $\mu$ L au fond du tube. De la sorte le phénotype qui sédimente le plus est avantagé lors du renouvellement du milieu. Le nouveau milieu est une niche que les deux phénotypes n'ont pas les mêmes chances de coloniser. Nous initions cette expérience avec une population comportant

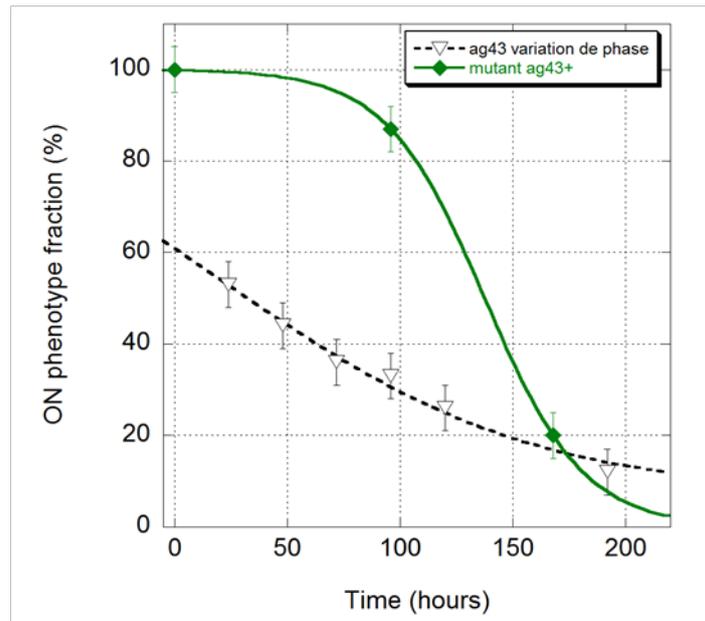
seulement 5% de phénotype Ag43 ON. On observe sur la figure (Figure 3-12) qu'en deux jours seulement la fraction d'Ag43 ON atteint 28%.

Cette augmentation peut être comparée au seul cas où nous avons vu la fraction Ag43 ON augmenter jusqu'à présent : la phase stationnaire homogène. Dans ces conditions l'augmentation était due uniquement à la fréquence de transition de l'état OFF vers l'état ON. La comparaison sur la Figure 3-12 met en évidence la part de l'avantage sélectif dans cette dynamique.

Les conditions environnementales discutées dans ce paragraphe sont équivalentes à la dilution en série en milieu statique. Seul le mode de prélèvement lors de la dilution change. Il était justement réalisé après avoir parfaitement homogénéisé la culture pour éviter tout biais. En l'absence d'un avantage sur les chances de colonisation, le phénotype Ag43 ON voit sa fraction passer de 85% à moins de 1% en quatre jours (Figure 3-10 gauche). La différence entre les deux scénarios est donc frappante.

Ce résultat est obtenu avec un avantage à la colonisation qui est bien moins fort que celui d'une bactérie qui, grâce à son adhésine Ag43, serait la seule à pouvoir initier une croissance intracellulaire comme nous l'avons évoqué au début de ce chapitre (Figure 3-1). De plus, l'enjeu de la colonisation est accentué dans un contexte multi-espèces.

Finalement, nous voyons que le gène *ag43* exprimé peut constituer un avantage sélectif ponctuel. Dans de nombreuses situations, nous avons également vu qu'il est très défavorable car il induit l'agrégation. Par conséquent, si une souche exprime ce gène de manière constitutive, elle a de grandes chances d'être envahie par un mutant. Une modification de la séquence peut empêcher l'expression fonctionnelle du gène *ag43*. La fonction serait alors perdue pour la souche. Pour illustrer ce rôle de protection de la fonction, nous avons comparé la dynamique de composition phénotypique de notre souche, sujette à la variation de phase, avec celle d'un mutant porteur d'un gène Ag43 dont l'expression est constitutive. Ce mutant a été construit par Christophe Beloin de l'Institut Pasteur (Chauhan et al. 2013). Le mutant exprime donc exclusivement un phénotype Ag43 ON (Figure 3-13). On constate que la variation de phase permet effectivement de générer un phénotype non agrégé, plus rapidement que s'il faut attendre une mutation. Les phénotypes Ag43 OFF de la variation de phase peuvent donc coloniser l'environnement défavorable au phénotype Ag43 ON avant les mutants qui ont altéré durablement la fonction du gène *ag43*. De cette manière, la fonction du gène est préservée en atténuant son coût sélectif. C'est un mécanisme plus simple qu'une régulation sensible à des signaux environnementaux, mais qui permet tout autant de conserver des fonctions dans les périodes où elles ne sont pas utiles. Enfin, l'expression pertinente d'un gène en réponse à l'environnement n'est probablement pas toujours possible.



**Figure 3-13**

Comparaison de l'évolution de la fraction de phénotype Ag43 ON au cours de la phase stationnaire dans un environnement statique, pour un mutant strictement Ag43 ON (diamant vert), et la souche originale qui est sujette à la variation de phase pour *ag43* (triangle noir). Pour le mutant, la disparition du phénotype Ag43 ON indique l'apparition de mutation qui empêche l'expression du phénotype. On constate que la variation de phase permet de générer plus rapidement le phénotype Ag43 OFF et cela peut prévenir l'apparition des mutants et préserver la fonction du gène *ag43*.

### 3.4 Conclusion

Nous avons montré que notre méthode de phénotypage sur bactérie unique permet de déterminer la composition phénotypique d'une population. En effet, grâce à l'analyse d'une mesure quantitative riche, ou à « haut-contenu », nous pouvons discriminer et compter les deux phénotypes de la variation de phase du gène *ag43*. Ce phénotypage est réalisé sans rapporteur spécifique, ni milieu révélateur particulier.

La technique a ensuite été utilisée pour montrer expérimentalement que la sélection naturelle et la compétition intra-clonale jouent un rôle majeur dans la dynamique de population des états phénotypiques d'une variation de phase. Cet effet est souvent supposé mais il n'a jamais été mesuré à notre connaissance. Nous avons mesuré l'avantage sélectif associé. Ce résultat soutient l'idée que le mécanisme de régulation permet simplement de générer rapidement et spontanément deux phénotypes possibles. Aucune interaction particulière avec l'environnement ne déclenche les changements d'état phénotypique. C'est la sélection naturelle, appliquée aux deux états d'expressions d'un même génome, qui régule ensuite la composition de la population. La population s'adapte ainsi à son environnement sans voie de signalisation moléculaire particulière pour reconnaître les conditions environnementales. Enfin, la variation de phase permet, comme nous l'avons illustré, de conserver des fonctions potentiellement utiles qui représentent un coût sélectif le reste du temps. Beaumont et al. suggèrent ainsi que les mécanismes de variation de phase, totalement indépendants de l'environnement, seraient antérieurs aux systèmes de régulations stimulables.

Cette première étude est une validation de la démarche, qui consiste à lire le profil phénotypique d'une population dans notre champ d'observation qui est défini par notre technique de mesure. L'idée est d'observer indirectement les phénotypes par une lecture neutre pour éviter d'introduire un biais. Évidemment, il est probable que notre phénotypage soit partiel, qu'il ne permette pas de distinguer certains phénotypes et/ou génotypes radicalement différents mais qui auraient la même signature. Cependant, on peut probablement déjà observer beaucoup de phénomènes de diversité phénotypique dans la limite de notre technique d'analyse. C'est ce que nous allons présenter à présent.



## Chapitre 4

---

# Adaptation à une faible concentration d'ampicilline

---



## 4 Adaptation à une faible concentration d'ampicilline

### 4.1 Introduction

#### 4.1.1 Contexte

La découverte des antibiotiques dans les années 30 et leur utilisation massive depuis la seconde guerre mondiale ont considérablement modifié la médecine moderne. Non seulement les antibiotiques permettent de soigner de nombreuses infections microbiennes, mais surtout ils ont permis le développement de techniques médicales très exigeantes pour notre système immunitaire : chirurgie et chimiothérapie par exemple. Les enjeux économiques et l'utilisation d'antibiotiques sont également importants dans les filières agricoles et agroalimentaires. (Bud 2007)

L'utilisation des antibiotiques a été accompagnée de l'apparition de micro-organismes résistants. Ce phénomène est une conséquence de l'adaptation des micro-organismes à leur environnement. Lors d'un traitement antibiotique, les bactéries les plus sensibles sont éliminées plus rapidement. Les plus résistantes sont sélectionnées. La plupart des mécanismes de résistance, et les gènes associés, étaient présents dans la nature avant l'utilisation des antibiotiques par l'homme. Le recours parfois déraisonnable aux antibiotiques a augmenté la part de bactéries résistantes dans notre environnement (Davies et Davies 2010). Mais le plus inquiétant pour notre santé est l'émergence de bactéries multi-résistantes (BMR) qui ont acquis les moyens de survivre à plusieurs classes d'antibiotiques. Ces classes correspondent à des modes d'actions différents contre les bactéries. Elles exigent donc le plus souvent l'acquisition de mécanismes de résistance différents (Wright 2007).

Le nombre de classes d'antibiotiques est limité. En trouver d'autres est devenu une tâche visiblement difficile. Entre 1962 et 2000 aucune nouvelle classe d'antibiotique n'a été découverte (Wright 2007). Les infections multi-résistantes sont difficiles à soigner. Dans certains cas nous ne disposons plus de traitement efficace contre des bactéries dites hautement résistantes (Teillant et Reynaudi 2012).

L'apparition de BMR a conduit à des mesures restrictives sur l'utilisation des antibiotiques dès les années 70. Depuis les années 2000, les cas d'infections multi-résistantes dans les hôpitaux restent en constante augmentation. De nombreux efforts visent à organiser et modifier l'utilisation des antibiotiques pour qu'elle soit plus raisonnable et stratégique. (Teillant et Reynaudi 2012)

Pour répondre à cette menace, les mécanismes d'émergence des résistances doivent être élucidés. Comprendre les lois de l'écologie et de l'évolution liées aux résistantes aux antibiotiques pourraient permettre de modifier nos pratiques pour prévenir ou ralentir le phénomène (Davies et Davies 2010). Par exemple, l'utilisation d'antibiotiques à titre préventif dans les élevages, ou la prescription inappropriée chez l'homme, semblent favoriser l'apparition et le maintien de micro-organismes résistants.

Les expériences d'évolution en laboratoire sur des populations bactériennes exposées à un agent antibiotique contribuent à cet effort (Hall 2004). Les techniques de séquençages de l'ADN permettent de cataloguer les mutations qui émergent en laboratoire et de les comparer avec celles observées dans les souches issues de patients (Palmer et Kishony 2013). Le plus souvent, on observe une concordance des résultats. Cela pourrait motiver des travaux d'anticipation en laboratoire, pour

connaître à l'avance les mécanismes de résistance plausibles contre les nouveaux antibiotiques (Perron, Zasloff, et Bell 2006).

Certains facteurs pourraient favoriser le développement de souches résistantes. L'un d'eux est l'exposition répétée, ou prolongée, à de faibles concentrations d'antibiotiques (Gullberg et al. 2011). Les bactéries peuvent croître mais en présence de l'antibiotique certaines mutations, ou certains états phénotypiques, peuvent avoir un léger avantage sélectif. Leur représentation dans la population augmente en conséquence (Lauret, Matic, et Gutierrez 2013). Il ne s'agit pas d'un crible brutal pour une résistance radicalement plus élevée. Progressivement, les mutants plus résistants s'accumulent (Martinez et Baquero 2000). Ces conditions de faibles concentrations en antibiotiques constituent une menace sérieuse qui peut intervenir dans deux contextes différents. La pollution de l'environnement, avec les résidus de traitements des patients ou du bétail, crée de véritables pépinières à souches résistantes (Kümmerer et Henninger 2003). Les concentrations en antibiotique dans les différentes parties du corps d'un patient varient localement et au cours du temps. Cette hétérogénéité pourrait créer un terrain favorable à l'apparition de résistances pendant le traitement (Zhang et al. 2011). Si ce phénomène est confirmé et mieux étudié, les efforts pour limiter les rejets d'antibiotiques dans la nature pourraient s'accroître. Les modes d'administration des antibiotiques aux patients pourraient également être adaptés.

### 4.1.2 Objectifs

Une exposition à de faibles concentrations d'antibiotique pourrait favoriser l'accumulation d'une multitude de phénotypes résistants (Martinez et Baquero 2000). Elle favoriserait la diversité au sein de la population qui s'enrichit avec différents niveaux et différents modes de résistance. Nous souhaitons observer et mesurer cette diversité.

Pour modéliser l'effet d'exposition à de faibles concentrations dans la nature, nous proposons d'étudier la dynamique de population sous l'effet d'une concentration d'antibiotique inférieure à la concentration qui inhiberait la croissance. Ainsi, nous évitons de sélectionner violemment des mutants rares possédant une résistance très grande. Nous cherchons à nous placer dans les conditions les plus favorables à l'émergence de diversité, et à nous rapprocher de situations qui existent dans la nature. Les défis environnementaux que rencontre une population de bactéries ne sont pas toujours radicaux.

Actuellement, l'étude des mutations responsables de la résistance à un antibiotique passe par l'utilisation de milieux concentrés en antibiotique pour révéler les clones les plus résistants (Salverda et al. 2011). Cette approche se concentre donc sur les meilleurs mutants et bien souvent les plus rares. Toute la diversité est éliminée par une sélection forte. Nous cherchons à analyser les modifications progressives qui permettent à une population de s'adapter sans nécessairement de rupture brusque. Par conséquent, nous réduisons la sélection lors de l'analyse de la diversité au minimum. La phase d'adaptation et la mesure de la composition phénotypique sont découplées le plus possible. Pour cela, nous lisons la diversité dans du milieu sans antibiotique, c'est-à-dire dans des conditions les plus neutres et les plus favorables possibles.

Même en diminuant la sélectivité, l'analyse de la diversité reste problématique. L'idéal pour révéler la diversité serait d'analyser tous les individus de la population. Ce n'est évidemment pas possible pour une population de quelques milliards de bactéries. Le plus souvent il faut donc choisir en aveugle un nombre de colonies que l'on va caractériser. Les techniques d'analyse étant encore peu

parallélisées, la durée d'une étude augmente linéairement avec le nombre de clones que l'on souhaite étudier.

Nous proposons donc d'utiliser notre instrument de mesure parallélisée en millifluidique pour lire la diversité. Nous pouvons ainsi mesurer entre 100 et 1000 individus de la population. Il s'agit encore d'une vision très partielle de la diversité. La taille de l'échantillon analysé implique que nous ne détecterons pas les mutants qui représenteraient moins de 1% de la population. Nous observons donc les phénotypes nouveaux qui ont réussi à augmenter suffisamment leur part dans la population. En revanche, nous pouvons obtenir sur chaque bactérie une information quantitative riche. Nous mesurons la courbe de croissance dans le milieu LB. Nous obtenons une image de la population. Cette image a ses limites de résolution. Pour autant, elle contient de l'information sur les phénotypes qui composent la population.

Le phénotypage est réalisé dans un milieu permissif (sans antibiotique). La population de bactéries placée sous contrainte avec l'antibiotique, est donc analysée en relâchant cette contrainte lors de la culture de bactérie individuelle en goutte sans antibiotique. Cette démarche évite d'exercer une sélection supplémentaire au moment de la lecture. En revanche, elle nécessite que l'adaptation à la présence d'antibiotique ait des conséquences sur la croissance sans antibiotique. Autrement dit, il faut que le phénomène qui nous intéresse ait des conséquences dans notre espace d'observation.

Notre lecture des paramètres de croissance d'une colonie entre 1000 et  $10^5$  individus est très globale. Elle a l'avantage d'être simple et nous pensons qu'elle peut permettre de lire une part de la diversité. Elle intègre massivement de nombreuses fonctions cellulaires sur un grand nombre de bactéries. Elle peut être sensible à une grande variété de modifications. Mais il faut que ces modifications soit suffisamment fortes pour induire un changement observable sur la courbe de croissance. De tels changements ne sont sans doute pas les plus nombreux a priori, car de nombreuses modifications mineures de protéines ou de niveau d'expression n'auront aucune répercussions sur la vitesse de croissance ou la quantité finale de bactéries. Les expériences d'évolution et d'adaptation en laboratoire semblent indiquer que nous devrions observer des effets. En effet, de nombreux scénarios d'adaptation impliquent en premier lieu des modifications de grandes voies de régulation, qui peuvent donc avoir un effet massif sur la croissance (Ryall, Eydallin, et Ferenci 2012).

Notre lecture opère également un filtrage sur le caractère héréditaire des modifications. Le phénotype, que nous associons à chaque bactérie unique encapsulée, est mesuré sur sa descendance, entre la 10<sup>e</sup> et la 17<sup>e</sup> génération. Pour qu'un caractère reste identifiable à cette « distance » temporelle et à travers la moyenne opérée sur toute la descendance, il doit être très largement conservé par la descendance (Chapitre 2, 2.4.3). Le cas de l'identification de l'état d'expression du gène *ag43* illustre très bien ce principe.

Nous souhaitons observer la dynamique de population et la diversification induite par un traitement antibiotique faible. Ce sous-dosage en antibiotique conduit-il tout de même à une population plus résistante ? Quelle est la complexité de cette population qui s'adapte ?

Enfin l'exposition à un antibiotique peut être un changement environnemental temporaire. Nous avons donc envisagé la persistance des modifications apparues dans un environnement sans antibiotique.

### 4.1.3 Méthode expérimentale

Notre protocole comporte deux phases distinctes. La première est l'adaptation d'une population soumise à l'antibiotique. La seconde est l'analyse de cette population avec l'instrument de phénotypage.

#### *Adaptation de la population*

Une population de bactéries *E. coli*, constituée à partir d'une colonie prélevée sur un gel LB-agar, est exposée à l'ampicilline. Elle est propagée dans un volume macroscopique (5mL) de milieu de culture avec une concentration d'ampicilline inférieure à la concentration minimale d'inhibition (CMI). Deux fois par jour, on relance la culture dans du milieu frais avec une dilution d'un facteur 2000. Une fois par jour, un échantillon de cette population est prélevé et congelé. On s'arrête après 80 générations en présence d'antibiotique. On caractérise l'adaptation de la population par une nouvelle mesure de CMI en microplaque.

#### *Analyse des échantillons de population*

Dans un second temps, on réalise le phénotypage des échantillons collectés avec le système millifluidique. Nous mesurons alors la diversité. Nous utilisons ensuite le module de tri (2.2.3 p.54) pour isoler un phénotype nouveau. On observe alors la stabilité de ce phénotype en absence d'ampicilline. Enfin, nous analysons la résistance à l'antibiotique des différents phénotypes observés.

## 4.2 Adaptation à une faible concentration d'antibiotique

Notre objectif est d'observer une dynamique de diversification avec notre lecture quantitative sous l'effet d'un antibiotique sous-dosé. Nous avons d'abord ajusté cette « faible » concentration d'ampicilline à laquelle est exposée la population de départ. La concentration doit constituer un stress pour la population mais ne pas inhiber la croissance. Nous voulons surtout éviter de sélectionner un unique mutant rare à cause d'une pression de sélection trop forte. Ensuite, nous évaluons le processus d'adaptation qui a eu lieu en mesurant le changement de résistance à l'ampicilline à l'échelle de la population.

### 4.2.1 Ajuster le défi adaptatif

Pour le dosage d'un antibiotique, on se réfère à la Concentration Minimum d'Inhibition (CMI). Celle-ci est déterminée suivant des méthodes standards.

Dans sa thèse, Fabien Bertholle (2010), a développé la technique de culture de microorganismes en millifluidique, utilisée dans notre étude, pour l'appliquer à la détermination de CMI. Il soulignait alors l'importance de l'effet de l'inoculum. En effet, la mesure de la CMI dépend du nombre de bactéries initialement exposées à l'antibiotique. Ce constat ne fait pas l'unanimité (Craig, Bhavnani, et Ambrose 2004). Beaucoup de mécanismes peuvent contribuer à cet effet et ils dépendent du couple antibiotique-bactérie considéré. Il est donc difficile d'arriver à une compréhension générale et simple

	Gouttes millifluidiques	Microplaque 96 puits		
Cellules/test	10	$5.10^3$	$1.10^5$	$1.10^7$
Cellules/mL	$10^5$	$5.10^4$	$1.10^6$	$1.10^8$
<b>Ampicilline</b>	<b>130</b>	<b>150</b>	<b>600</b>	<b>&gt;2500</b>

Tableau 4-1

Valeurs de concentrations minimales inhibitrices en  $\mu\text{g/mL}$  pour l'ampicilline. Deux techniques et différentes tailles d'inoculum sont comparées, en soulignant l'importance du nombre et de la densité de cellule.

du phénomène. La pertinence clinique de ce résultat de laboratoire est souvent contestée et réduit les efforts de recherche sur le sujet.

Pour l'étude discutée dans ce chapitre, cet effet de l'inoculum sur la sensibilité d'une population aux antibiotiques joue un rôle significatif. On constate que les valeurs de CMI varient en fonction de la taille de l'inoculum (Tableau 4-1). Le nombre et la densité de bactérie initiaux sont indiqués dans le tableau, car les deux peuvent jouer sur l'effet d'inoculum. On donne également un résultat obtenu en préparant un gradient en millifluidique (2.2.1.3) avec en moyenne dix bactéries par goutte.

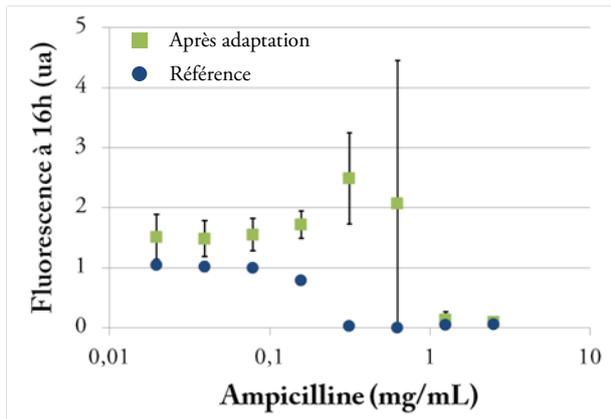
Nous cherchons à propager une grande population avec une concentration d'antibiotique juste inférieure à sa CMI. L'inoculum est de l'ordre de  $5.10^6$  dans 5 mL. Par conséquent, nous avons choisi, comme référence, la CMI obtenue en microplaque avec un inoculum de  $10^6$  cellules par millilitre. Ainsi, notre population de départ est exposée à  $100\mu\text{g/mL}$  d'ampicilline, soit une concentration six fois inférieure à sa CMI.

La population que nous soumettons à l'ampicilline possède un gène de résistance à l'ampicilline, *ampR*. Il a été introduit en même temps que le gène de fluorescence *yfp* et ils sont donc contigus. Le gène de résistance est responsable de la synthèse d'une enzyme, la bêta-lactamase, qui dégrade l'ampicilline et la rend inactive. L'activité de cette enzyme implique que la concentration d'antibiotique dans le milieu n'est pas constante. Elle décroît au cours du temps. La pression de sélection est donc plus forte au début, puis elle diminue.

#### 4.2.2 Résistance à l'antibiotique acquise par la population

Les populations traitées pendant 70 générations avec une concentration de  $100\mu\text{g/mL}$  d'ampicilline ont une résistance à l'ampicilline accrue. La concentration nécessaire pour inhiber leur croissance est devenue deux à quatre fois supérieure à celle de la population de départ (Figure 4-1). L'exposition prolongée à une faible dose d'antibiotique, n'inhibant pas la croissance de la population bactérienne, conduit systématiquement à une augmentation de la résistance mesurée pour cette population. Cet effet a été observé pour quatre expériences indépendantes.

Ce résultat confirme que l'exposition à une concentration d'antibiotique même faible conduit à une résistance accrue. On peut imaginer ce processus comme un mécanisme à cliquet. C'est-à-dire, des



**Valeur de CMI en mg/mL**

Pour quatre expériences indépendantes, les CMI sont mesurées avec un inoculum de  $10^6$  bactéries par millilitre en plaque 96 puits avant et après 80 générations d'exposition à 0,1 mg/mL d'ampicilline.

	1	2	3	4
Avant	0,6	0,6	0,6	0,3
Après	1,2	1,2	1,2	1,2

Figure 4-1

À gauche, comparaison de la sensibilité à l'ampicilline pour une population avant (rond bleu) et après (triangle vert) une exposition pendant 80 générations à 0,1 mg/mL d'ampicilline.

À droite, évolution de la CMI après l'exposition à l'ampicilline pour quatre expériences indépendantes.

petits pas sans retour possible. La contribution de ce phénomène à l'émergence de populations résistantes semble confirmée. En effet, une population peut être progressivement exposée à de petite augmentation de concentration en antibiotique. Chaque palier adaptatif est aisément franchi et à long terme le processus peut conduire à des niveaux de résistance très élevés. L'apparition de phénotypes hautement résistants n'est plus, selon cette route, dépendante de l'acquisition d'une mutation exceptionnelle et donc très rare. De plus, la population qui se maintient dans un environnement contenant des concentrations élevées d'antibiotique par d'autres moyens a de grandes chances d'acquérir plus tard cette mutation exceptionnelle, à la manière d'une assimilation génétique (Kaneko 2009) (Waddington 1953).

### 4.3 Dynamique phénotypique de la population

Nous allons maintenant présenter l'évolution de la diversité au cours du temps sous l'effet de l'antibiotique. Nous réalisons le phénotypage systématique de la population après différentes périodes d'exposition à l'antibiotique. Nous mesurons les courbes de croissances issues de bactéries uniques dans du milieu LB qui constitue notre image de la diversité. Notre lecture est neutre au sens où nous n'appliquons aucune sélection lors de cette mesure, contrairement à de nombreuses études sur l'émergence de résistances aux antibiotiques. Cette neutralité implique que nous ne verrons que les modifications collatérales à l'augmentation de la résistance. Et ces modifications doivent être héréditaires et avoir un effet significatif sur la croissance dans un milieu LB.

Nous avons effectivement observé une diversification au sein de la population. La population de départ n'exprime qu'un seul état identifiable dans notre espace d'observation. Après l'exposition à l'antibiotique on identifie systématiquement au moins un nouveau phénotype dont la courbe de croissance a changé. Ce phénotype semble terminer sa croissance avec deux fois plus d'intensité. Enfin, nous avons étudié la stabilité de ce phénotype lorsqu'on le cultive à nouveau dans un milieu sans ampicilline.

### 4.3.1 La population initiale

Dans un premier temps nous analysons notre point de départ. Il s'agit d'un « blanc » et d'un « étalonnage » de notre mesure de la diversité.

Nous faisons le choix de limiter la diversité présente dans cette population initiale. On sélectionne un individu unique. La diversité pour un individu est réduite au minimum. Au cours de la croissance de la colonie, les nombreux mécanismes décrits dans le Chapitre 1 participent à la diversification.

Notre population initiale, ou population de référence, résulte de la croissance d'une bactérie unique sur un gel de LB-agar à 37°C. Après environ trente générations, la population constitue une colonie de 1 mm de diamètre sur le gel. Cette colonie isolée est dispersée dans 5 mL de milieu LB et incubée à 37°C. Lorsqu'elle atteint la phase stationnaire, la population est congelée en ajoutant 20 % de glycérol. Au final la population de référence est séparée de l'ancêtre commun unique par 40 générations.

La variation de phase du gène *ag43*, vue au Chapitre 3, participe à la diversification pendant ces 40 générations. Notre mesure est plus précise pour le phénotype qui ne s'agrège pas. Nous faisons le choix de partir d'un ancêtre n'exprimant pas l'antigène 43. Pour la suite, nous décidons d'ignorer les phénotypes Ag43 ON, agrégés, qui apparaissent en raison du mécanisme de variation de phase.

La population qui sert de point de départ à nos expériences est caractérisée avec notre méthode de phénotypage. Sur la Figure 4-2, on peut voir que la diversité mesurable initialement est faible. L'analyse détaillée donne les mêmes résultats que ceux décrits à la fin du Chapitre 2 (2.4.3 p.64). On peut conclure que notre population de référence ne révèle aucune diversité mesurable avec notre instrument. Tous les phénotypes de la population ont la même image dans notre espace d'observation

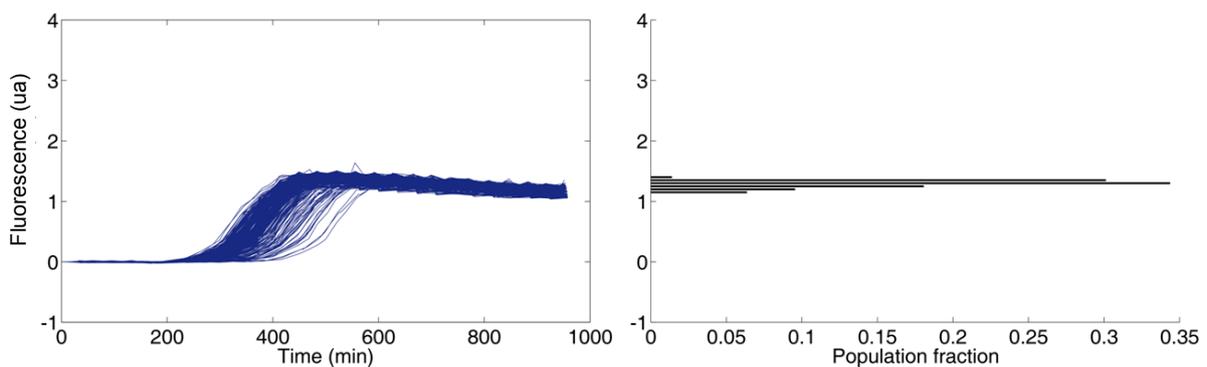


Figure 4-2

Courbes de croissances (à gauche) d'un échantillon de cellules uniques issues d'une colonie obtenue à partir d'une seule bactérie (30 générations sur un gel LB agar et 10 générations dans du milieu LB liquide). La distribution de la fluorescence finale (à droite) est très étroite.

### 4.3.2 Apparition de diversité

Le phénotypage des échantillons révèle l'apparition de nouveaux phénotypes au cours du traitement à l'ampicilline. La diversification phénotypique a été observée lors de sept expériences distinctes, à partir de clones différents. Elle est observable dès 20 générations d'exposition. Elle apparaît sous la forme de quelques courbes très différentes de la population de référence.

D'après les courbes de croissance mesurées, on peut définir au moins quatre classes distinctes, ce qui indique la coexistence de plusieurs phénotypes (Figure 4-3). Ces classes sont identifiées grâce l'intensité de fluorescence finale. Certaines courbes saturent à des valeurs deux et trois fois supérieures (courbes jaunes et rouges) à celles du phénotype de départ (courbes bleues). Ce résultat illustre également le cas des co-encapsulations (Figure 2-16 p.62). Certains réacteurs peuvent contenir initialement deux bactéries ou plus. On peut donc observer des phénotypes mixtes. C'est le cas de la classe verte sur la Figure 4-3, qui correspond à la co-encapsulation de deux autres phénotypes (bleu et jaune).

Les temps de division et temps de détection, estimés d'après les courbes ne révèlent pas de diversification (Figure 4-3). En effet, on n'observe pas de classes distinctes, et les coefficients de variation n'augmentent pas significativement par rapport à notre référence (2.4.3 p.64).

L'ensemble des phénotypes nouveaux qui apparaissent présentent des courbes de croissances de plus grande amplitude que le phénotype de la population de départ. Cela suggère une augmentation de rendement, c'est-à-dire la quantité de bactérie, ou un niveau d'expression de la protéine fluorescente YFP plus élevé. Si le rendement est plus élevé, cela constitue un avantage sélectif non négligeable. On considère le plus souvent la vitesse de croissance comme dominante, pourtant dans la situation d'une culture par dilution en série, la capacité à exploiter au mieux l'environnement est déterminante. En effet, la population expérimente l'épuisement des ressources avant chaque dilution. Dans ce contexte, un phénotype qui a un meilleur rendement augmente sa représentation dans la population. Pourtant, il est difficile d'envisager comment la concentration d'antibiotique appliquée pourrait favoriser un phénotype à rendement accru. Nous verrons dans le paragraphe 4 ce qui l'en est.

L'apparition de la diversité, dans notre espace d'observation, se fait sous forme de classes discrètes. Les états phénotypiques qui émergent sous l'effet de l'antibiotique s'organisent en quelques groupes d'intensités de fluorescence finales. Cette image de la diversité dans la population, que nous donne l'instrument de phénotypage, est particulière. La diversité aurait pu apparaître sous la forme d'une élargissement des distributions des valeurs des paramètres extraits des courbes. Mais on constate qu'elle se traduit par l'apparition de nouvelles valeurs possibles dans notre espace d'observation. Au sein des classes qui correspondent à ces valeurs possibles, le coefficient de variation ne change pas. Les pics correspondant à la classe jaune et la classe bleu ont la même largeur (Figure 4-3 B). Cette organisation de la diversité vis-à-vis du caractère que nous mesurons témoigne de la dynamique de population qui se joue dans la phase d'adaptation.

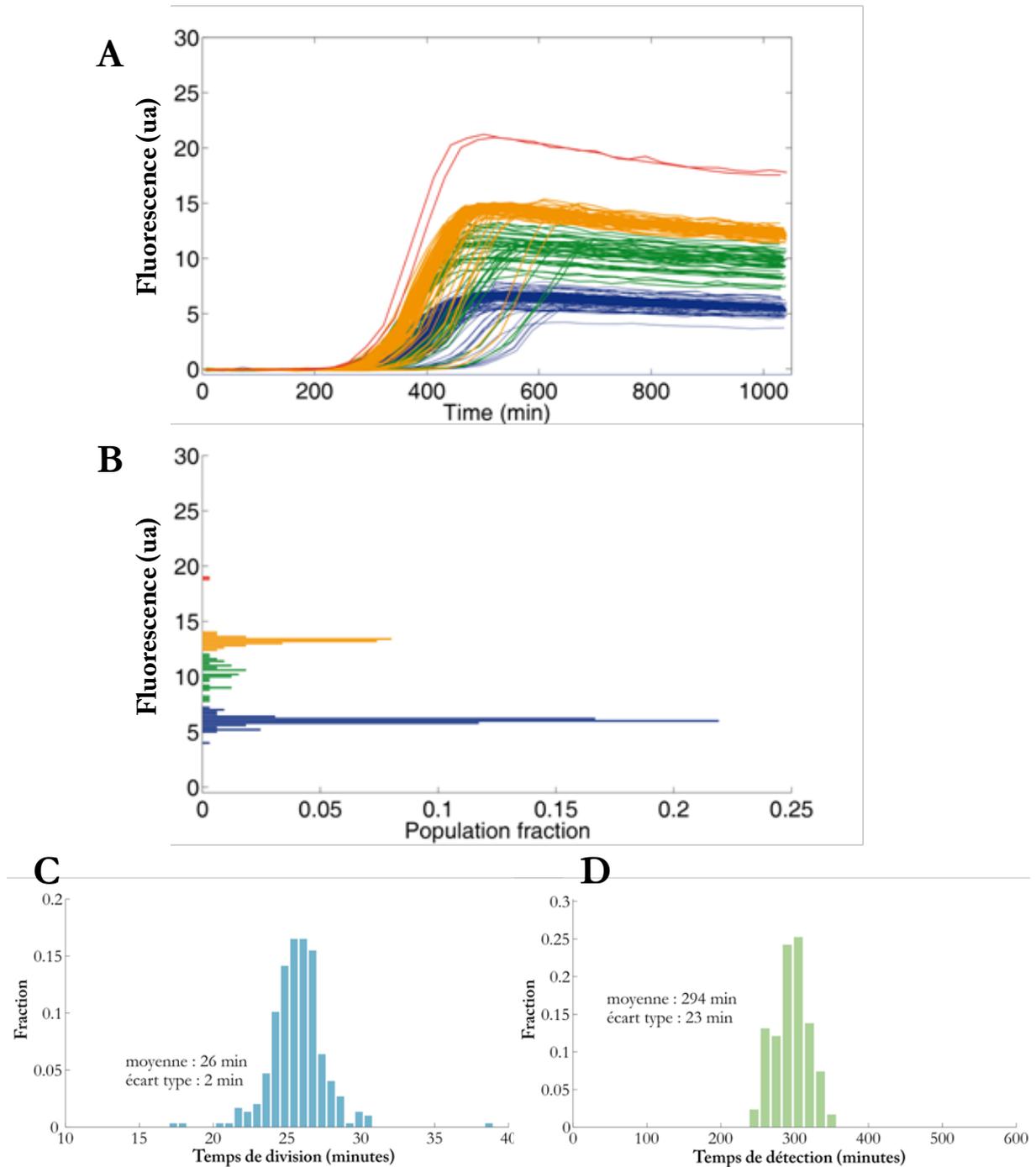


Figure 4-3

A : Courbes de croissances obtenues lors du phénotypage d'une des lignées après 70 générations sous 100 $\mu$ g/mL d'ampicilline

B : Histogramme des niveaux de fluorescence à saturation.

Les couleurs mettent en évidence 4 classes de courbes distinctes. On peut identifier 2 phénotypes (rouge, jaune) dont les courbes de croissances diffèrent nettement du phénotype original. La classe bleue rassemble un phénotype assimilé à la population initiale. Enfin la dernière classe (vert) rassemble majoritairement les courbes de croissance dues à la co-encapsulation (2.4.2 p.60) d'individus des classes jaune et bleue.

C et D : Histogrammes des temps de divisions et des temps de détections (2.4.3 p.64). Il n'y a pas de diversité identifiable : ni classe ni élargissement significatif des distributions.

La dynamique de population pendant l'adaptation peut en effet expliquer l'observation de classe. Si l'antibiotique n'entraîne la sélection que d'un clone particulier dont la courbe de croissance est distincte du phénotype de départ, on obtient cette structure en bande que nous observons. Cette dynamique n'a rien de surprenant, elle coïncide avec l'idée que les modifications bénéfiques, susceptibles d'être sélectionnées, sont rares. Dans le temps de l'expérience une seule a pu apparaître. Sa descendance a pris de l'importance dans la population, grâce à un avantage. Toute cette descendance partage naturellement une même signature dans notre espace d'observation et constitue une classe. L'autre mode de diversification imaginé au départ, sans classe apparente, exige une dynamique de population radicalement différente. Une diversification continue se traduisant par une augmentation du coefficient de variation, exige l'apparition d'un grand nombre de modifications efficaces simultanément. En effet, pour former une distribution élargie sur notre image de la diversité, il faut que plusieurs phénotypes parviennent à augmenter leur représentation dans la population jusqu'à être observable, c'est-à-dire jusqu'à représenter environ 1% de la population. Ceci est peu probable étant données les fréquences des ingrédients de la diversification cités au Chapitre 1. En plus de la rareté, un autre élément de dynamique de population intervient. Le nombre de phénotypes nouveaux observables est limité car seules les modifications les plus avantageuses vont augmenter leur représentation suffisamment rapidement pour être observées. On parle d'interférence clonale. Ce compromis inévitable sur la probabilité d'apparition et l'avantage sélectif associé est très bien décrit par les travaux de Hegreness (2006). Quel que soit la relation imaginée entre la probabilité d'apparition et l'avantage sélectif acquis, il existe un optimum pour les chances de succès. Le changement ne doit pas être trop rare, et être suffisamment avantageux. Dans notre cas, nous n'observons que les phénotypes nouveaux qui sont apparus et ont réussi à augmenter leur présence dans la population au-dessus de 1% en moins de 80 générations.

On observe systématiquement l'apparition d'un nouveau phénotype principal (jaune sur la Figure 4-3), dont la courbe de croissance atteint un plateau plus élevé que le phénotype de départ. Ce principal phénotype nouveau que nous observons est non seulement exclusif lorsqu'il apparaît, mais il semble avoir une très forte probabilité d'apparaître. Cela confère un caractère prédictible, et donc déterministe, à l'adaptation d'une population à une concentration d'antibiotique sub-inhibitrice.

Un autre aspect des résultats nous renseigne sur la dynamique en jeu lors de l'adaptation. Toutes les répétitions de l'expérience, y compris celles réalisées avec des clones de départ différents, conduisent à la même image de diversification. La Figure 4-3 est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. La Figure 4-4 représente la fraction de phénotypes nouveaux en fonction du temps d'exposition à l'ampicilline.

L'observation de l'évolution temporelle de la fraction de nouveaux phénotypes, qui sont différents du phénotype de départ, semble indiquer un envahissement rapide sur les 60 premières générations, puis un ralentissement voire une stagnation (Figure 4-4). Ces deux régimes peuvent être dus à une perte de l'avantage lorsque ces phénotypes augmentent en proportion dans la population. On peut également imaginer que d'autres modifications apparaissent avec un avantage équivalent, mais avec une signature identique au phénotype de départ dans notre espace d'observation.

Le coefficient de sélection des phénotypes émergents par rapport au type ancestral peut être estimé à 0,1 (Figure 4-4). Autrement dit la fraction du phénotype augmente en moyenne de 10% de sa valeur à chaque génération. Dans les conditions de la phase d'adaptation on peut interpréter cet

avantage de plusieurs manières différentes. Soit le taux de croissance en présence d'ampicilline pourrait être 10% plus rapide, c'est-à-dire que le temps de division dans ces conditions serait 13% plus court. Soit le taux de survie peut être ponctuellement trois fois supérieur toutes les dix générations. Ce serait par exemple le cas si le nouveau phénotype survivait mieux au transfert dans le milieu frais qui contient effectivement 0,1 mg/mL d'ampicilline avant que l'antibiotique ne soit progressivement dégradé.

Si on extrapole la dynamique de population avec cet avantage sélectif, vers le début de l'exposition à l'antibiotique, on estime que le phénotype émergent représentait une fraction de la population comprise entre  $10^{-4}$  et  $10^{-3}$ . Or la population initialement exposée à l'antibiotique, ou prélevée lors de chaque dilution, est de  $10^7$  individus. Dans ces conditions, les phénotypes que l'on voit émerger sont présents avant la première exposition à l'antibiotique. On estime que 1000 ou 10 000 individus exprimant ces phénotypes feraient déjà partie de la population au début de l'expérience. Cette situation expliquerait le caractère prédictible ou systématique de l'apparition de ce phénotype. Il s'agirait d'une forme de stratégie de « bet hedging », comme celle discutée au sujet du gène *ag43*. On peut également imaginer que le phénotype apparait après l'exposition à l'antibiotique. À son apparition dans la population, il est unique dans la population, et celle-ci contient entre  $10^7$  et  $10^{10}$  individus. Dans ce cas, son avantage sélectif doit lui permettre d'envahir violemment la population pour passer de  $10^{-5}$  % à 1% de la population en seulement 20 générations. Sous forme de survie ponctuelle, il aurait  $10^5$  fois plus de chance de survivre lors du transfert dans le milieu frais contenant l'ampicilline. En termes de temps de divisions, il se diviserait près de deux fois plus vite en présence d'antibiotique.

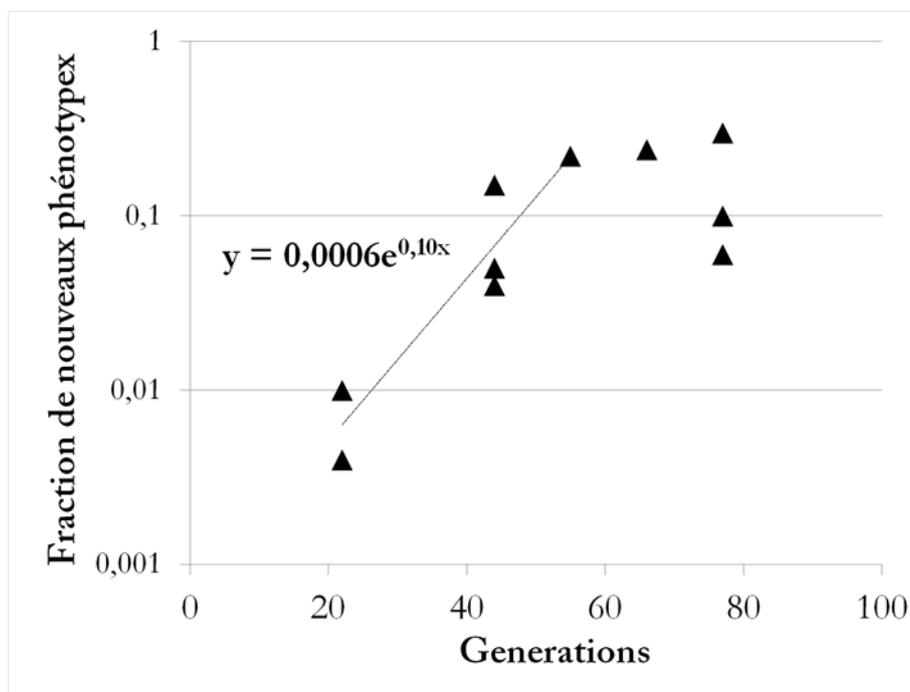


Figure 4-4

Représentation de la dynamique générale d'envahissement de la population par les phénotypes adaptatifs.

L'avantage sélectif des nouveaux phénotypes estimé sur les premières générations est de 0,10. Il semble que l'avantage sélectif diminue nettement après 50 générations.

Avec ces premiers résultats, nous avons vu que l'augmentation de la résistance à l'ampicilline de la population s'accompagne d'une diversification phénotypique. Cette diversité est révélée par notre instrument de phénotypage, ce qui signifie que les modifications sélectionnées en présence d'ampicilline ont un effet que nous mesurons sur la courbe de croissance en milieu LB sans ampicilline. La diversité se structure en classes dans notre espace d'observation. Cette image de la diversité est très probablement la conséquence des dynamiques de population décrivant l'adaptation : la rareté des modifications bénéfiques et les interférences clonales. Un phénotype produisant apparemment deux fois plus de biomasse apparaît systématiquement (classe jaune). On peut expliquer cette apparition inéluctable, soit par un avantage sélectif très fort pendant les premières générations suivant son apparition, soit par sa présence au sein de la population avant l'exposition à l'antibiotique. Dans les deux cas, l'avantage sélectif semble diminuer au fil des générations.

Nous avons suggéré que les faibles concentrations produisent une adaptation à l'antibiotique progressive. Si chaque petit palier adaptatif est stable, c'est à dire si la légère augmentation de la résistance ne disparaît pas dès que le milieu ne contient plus d'antibiotique, on peut imaginer un « effet cliquet ». La résistance à l'antibiotique peut augmenter par petits pas non réversibles. Pour envisager plus en détail cette réversibilité, nous avons étudié la stabilité du nouveau phénotype. Nous l'avons isolé grâce au module de tri (2.2.3 p. 54). Puis nous l'avons cultivé sans ampicilline en suivant au cours du temps l'image de la diversité que nous donne notre instrument de phénotypage.

### 4.3.3 Relaxation en milieu permissif

Nous voulons étudier la stabilité d'un phénotype apparu sous l'effet d'une exposition temporaire à une faible concentration d'antibiotique. Nous proposons d'isoler le phénotype qui a une saturation de courbe de croissance plus élevée, de le cultiver en milieu sans antibiotique tout en suivant la composition phénotypique. Le milieu est permissif car nous relâchons la contrainte sélective que représentait la faible concentration en antibiotique. Ce que nous appelons la stabilité du phénotype peut se décomposer en deux phases. D'abord, il y a le temps nécessaire à l'apparition d'une diversité phénotypique en partant du phénotype « pur ». Nous verrons que ce temps est court, il est inférieur à 30 générations. Ensuite, à plus long terme, nous évaluons ses chances de persistance dans la population.

La première étape consiste à isoler le phénotype qui nous intéresse grâce au dispositif de tri de gouttes en millifluidique (2.2.3 p. 54). On peut ainsi délivrer une goutte dans un puits de plaque 96 puits. Nous choisissons une goutte dont la courbe de croissance présente un plateau deux fois plus élevé (classe jaune Figure 4-3). Nous avons ainsi isolé une population issue d'un individu unique comme nous l'aurions fait en prélevant une colonie sur un gel LB-agar. Nous avons choisi ce clone d'après le phénotype mesuré et identifiable, alors que sur boîte Petri nous n'observons aucune différences notables parmi les colonies. Nous savons que le phénotype responsable de cette saturation élevée est un caractère au moins partiellement héréditaire car il est observé avec notre outil de phénotypage qui lit un caractère moyen sur l'ensemble de la descendance après 10 à 17 générations. La stabilité de transmission de ce caractère dépasse donc les 17 générations de croissance dans la goutte à partir de l'ancêtre unique. Après la collecte de la goutte dans le puit, la population est amplifiée pendant 20 générations dans du milieu LB. Nous pouvons ensuite analyser la diversité de cette population par le phénotypage en millifluidique. On réalise la mesure initiale comme celle réalisée avant l'exposition à l'antibiotique. On constate que 96 % des individus présentent le caractère de saturation élevée (Figure 4-5 A). Les 4% de phénotypes différents correspondent à la croissance observée pour la population avant l'exposition à l'antibiotique.

Ce résultat est étonnant, il indique une diversification rapide. En moins de 40 générations une population issue d'une bactérie unique contient un phénotype secondaire qui représente 4% de la population. Pour confirmer ce résultat nous avons isolé un clone de cette population sur boîte de Petri. Cette méthode simple s'impose cette fois-ci, car même en prélevant une colonie en aveugle, la probabilité de prélever le phénotype à saturation élevée est de 0,96. L'analyse en millifluidique de cette colonie montre à nouveau une deuxième classe représentant 4% de la population. Une colonie issue d'une cellule unique à fluorescence élevée, après 30 générations de croissance sur un gel LB-agar, comporte déjà 4% d'individu différents. Ce phénotype qui apparaît rapidement est assimilable à celui de la population avant l'adaptation à l'ampicilline. Cette génération rapide de diversité à deux états phénotypiques, évoque la variation de phase du gène *ag43*. Cette observation suggère un mécanisme de transition phénotypique rapide. D'après la méthode présentée au Chapitre 3 (3.1.4 p. 79), on peut estimer une fréquence de transition. La probabilité de basculer serait de  $10^{-3}$  par génération. Il y a apparition rapide du phénotype ancestral.

Nous avons ensuite étudié la persistance du phénotype isolé propagé dans du milieu LB pour 180 générations. Une colonie de ce phénotype est sélectionnée sur un gel LB-agar. Elle est ensuite propagée avec des dilutions d'un facteur  $4 \cdot 10^4$ , deux fois par jour, dans du milieu liquide sans antibiotique. Nous avons congelé des échantillons régulièrement, puis ils ont été analysés avec notre

outil de phénotypage. On constate l'augmentation de la fraction du phénotype minoritaire qui est assimilable à la population de référence (Figure 4-5 A et B).

La dynamique a été mesurée sur 180 générations, soit 6 jours (Figure 4-6). Deux mécanismes peuvent contribuer à cette dynamique. Ce sont les mêmes que ceux utilisés dans le cas d'ag43.

Tout d'abord, le phénotype à fluorescence finale plus élevée peut être perdu dans la filiation à cause d'une transition phénotypique, comme une variation de phase, qui se produit à une fréquence constante. Il s'agit d'une faille dans l'hérédité du caractère. Ce retour au phénotype ancestral serait assimilable à une réversibilité de l'adaptation. Cette contribution à la dynamique de population est représentée par la courbe rouge (tirets) sur la Figure 4-6. La probabilité de transition phénotypique pour ajuster la droite est de  $10^{-3}$  par génération. Nous avons estimé la même valeur d'après le pourcentage observé après 30 générations. Ce mécanisme suggère un phénotype instable. On peut

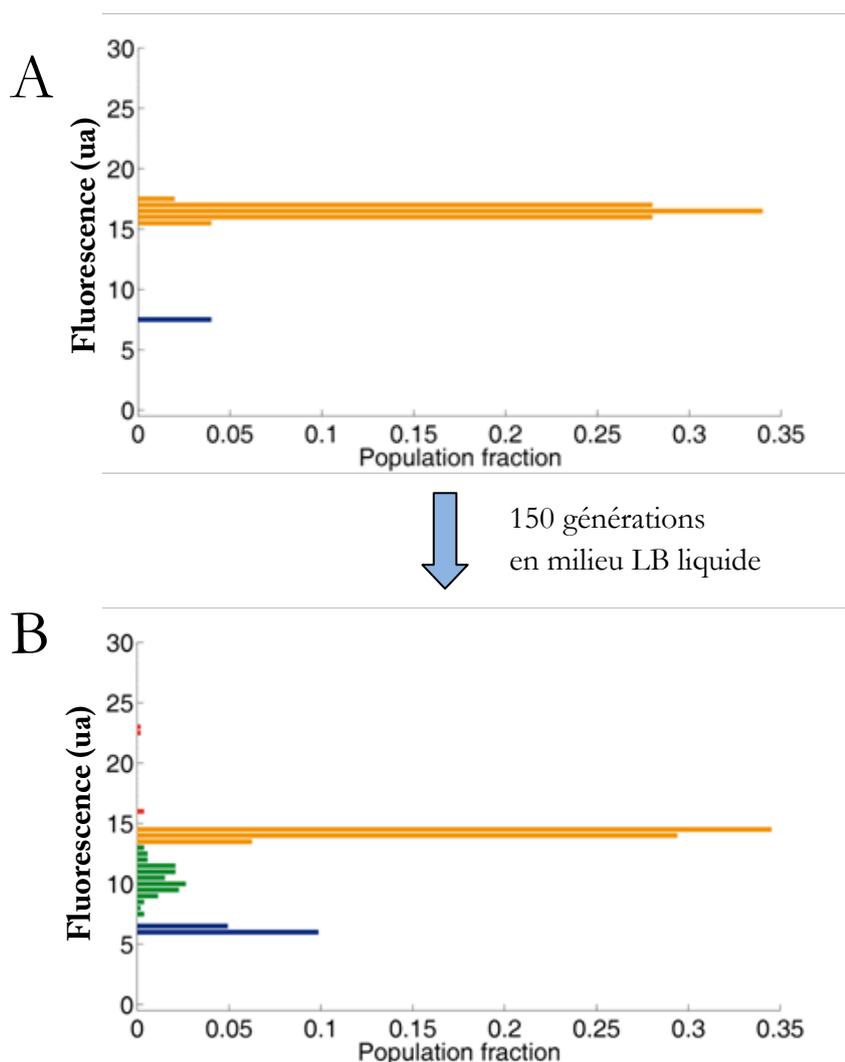


Figure 4-5

Distribution du signal de fluorescence à saturation des collections de courbes acquises pour deux échantillons A : population isolée à saturation élevée isolée avec le module de tri en millifluidique.

B : Après 150 générations de croissance dans du milieu LB liquide sans antibiotique. La représentation du phénotype assimilable à la population de référence (en bleu) a augmenté de 4% à 23%.

En rouge, un phénotype à saturation plus élevé apparaît avec une représentation de 1%. La classe verte correspond à la co-encapsulation de deux phénotypes

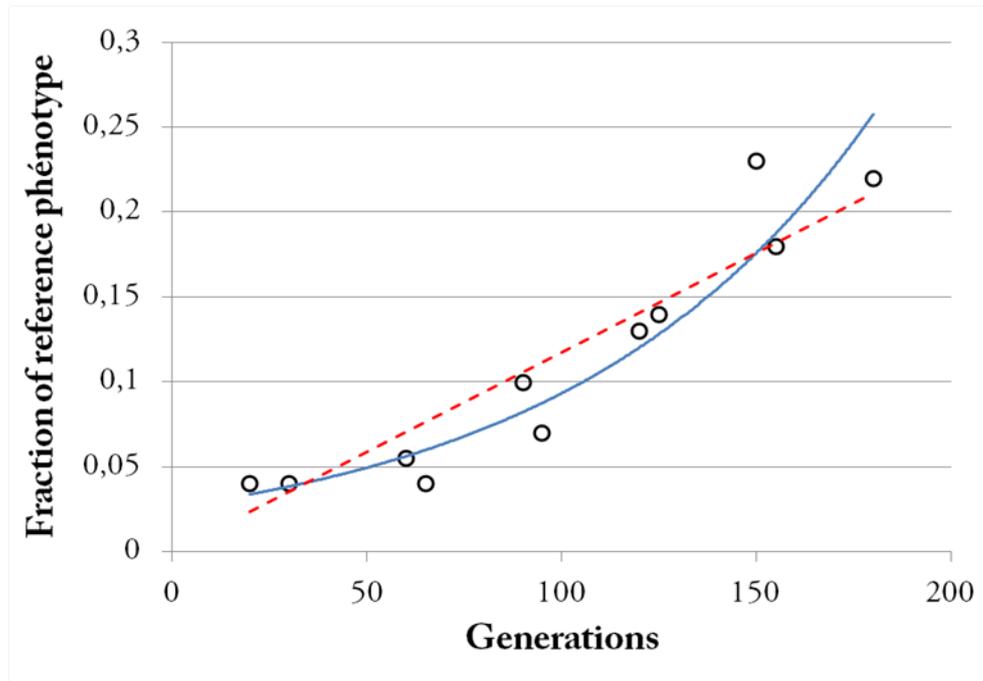


Figure 4-6

Dynamique d'invasion d'une population du phénotype isolé par le phénotype de référence lors d'une croissance par dilution en série dans du milieu LB pour 180 générations. Deux modèles d'invasion sont comparés. En bleu (continu), un avantage sélectif pour le phénotype de référence de 0,013 par génération. En rouge (tirets), un mécanisme de mutation du phénotype à fluorescence élevée vers le phénotype de référence à une fréquence de  $1.10^{-3}$  par génome et par génération.

comparer à la fréquence de mutation par substitution d'un nucléotide dans un gène donné, qui est de  $10^{-7}$  par génération. La population très minoritaire présentant une fluorescence à saturation encore plus élevée (classe rouge sur la Figure 4-5), soutient l'hypothèse d'une dégénérescence spontanée de l'état phénotypique. Il relaxerait spontanément vers différents états avec une forte probabilité.

Le second mécanisme qui peut contribuer à la dynamique de population observée est la compétition entre les deux phénotypes. Si le phénotype de référence possède un avantage sélectif sur le phénotype à saturation élevée, sa fréquence au sein de la population augmente. La courbe bleue de la Figure 4-6 représente la dynamique attendue pour un avantage sélectif de 0,013 par générations.

Les deux modèles décrivent la dynamique de population de manière équivalente jusqu'à 180 générations. Cependant, seule l'hypothèse d'une transition phénotypique peut expliquer une émergence aussi rapide du phénotype « ancestral » dans les 30 premières générations. En observant la dynamique jusqu'à 300 générations on pourrait évaluer si les deux mécanismes contribuent à la dynamique comme nous l'avons fait pour *ag43*.

L'exposition d'une population à l'ampicilline induit une augmentation de sa résistance à cet antibiotique. Cette adaptation s'accompagne d'une diversification phénotypique. Le phénotype émergent le plus représenté atteint une intensité de fluorescence finale deux fois supérieure à celle du phénotype ancestral. Sa dynamique d'envahissement semble indiquer qu'il était présent dans la population avant le traitement antibiotique. Il représenterait une fraction de l'ordre de  $10^{-4}$  dans la population de départ. L'étude de la stabilité de ce phénotype, apparu sous antibiotique, quand on relâche la pression de sélection, c'est-à-dire en absence d'antibiotique, indique que ce phénotype est conservé dans une population pendant plus de 180 générations, 6 jours. Cette stabilité est favorable à l'« effet cliquet » suggéré pour l'adaptation progressive à des concentrations d'antibiotique croissantes. On observe également la diversification avec une probabilité de retour vers le phénotype ancestral de  $10^{-3}$  par génération. Parmi les mécanismes de diversification évoqués au premier chapitre, les probabilités de transition correspondraient à une variation de phase, comme celle d'*ag43*, à un « point chaud », ou encore à une amplification de gène.

Les niveaux de saturations de la fluorescence sur les courbes de croissances sont deux fois supérieurs pour le principal phénotype émergent sous antibiotique, et même trois fois supérieurs pour un phénotype minoritaire (classe rouge sur les figures). Cela évoque une duplication/amplification de gènes (Andersson et Hughes 2009). On peut envisager une amplification conjointe du gène de résistance et du gène de fluorescence qui sont voisins. Les fréquences évaluées pour la duplication du gène ou la délétion d'une copie de la région dupliquée sont également en accord avec les valeurs de la littérature (Sandegren et Andersson 2009). Pour tester cette hypothèse, nous allons explorer les propriétés des classes phénotypiques identifiables après l'exposition à l'antibiotique. Nous évalueront également les avantages sélectifs respectifs en présence d'ampicilline.

#### 4.4 Analyse des phénotypes.

En affinant la caractérisation des phénotypes qui composent la population adaptée à la faible concentration à l'ampicilline, nous avons précisé l'origine de deux observations.

Nous avons constaté que l'exposition à l'ampicilline conduisait effectivement à une diversification des phénotypes présents dans la population. L'apparition du phénotype émergent principal pourrait être liée à une amplification d'un fragment du chromosome comprenant le gène de fluorescence *yfp* et le gène de résistance à l'ampicilline.

La dynamique de population a également montré que l'avantage sélectif de ce nouveau phénotype diminuait après 50 générations d'exposition, ou lorsqu'il représente 10% de la population. Cette limite à son envahissement pourrait s'expliquer par un mécanisme de résistance altruiste, ou par l'augmentation de la résistance à l'antibiotique de la classe phénotypique dont la signature dans notre espace d'observation n'avait pas changée. La mesure de la résistance à l'ampicilline sur des individus uniques peut également aider à préciser la situation.

##### 4.4.1 Analyse de la fluorescence du phénotype isolé

L'augmentation du signal de fluorescence constatée pour le phénotype principal apparu pendant l'exposition à l'ampicilline peut être due à une biomasse plus importante ou à une augmentation de la fluorescence par bactérie. Pour trancher sur l'origine de l'augmentation du signal mesuré en millifluidique nous avons mesuré la fluorescence par bactérie en cytométrie, pour le phénotype isolé (4.3.3 p.111) et pour la population de départ (Figure 4-7).

La fluorescence par bactérie est plus élevée pour le nouveau phénotype que nous avons isolé. La biomasse produite dans le milieu LB n'a donc pas changé, c'est notre rapporteur qui a été modifié. L'augmentation d'un facteur deux du signal final observée dans les gouttes pour ce phénotype est quantitativement expliquée par la variation de la fluorescence moyenne par bactérie que l'on mesure en cytométrie (Figure 4-7). Les distributions de fluorescence obtenues en cytométrie pour les deux phénotypes sont larges. Ce bruit, cette variabilité sur l'expression rend difficile la distinction des phénotypes dans une population mélangée avec un cytomètre. En effet les distributions se chevauchent (Figure 4-7). L'analyse phénotypique en millifluidique est plus aisée car nous bénéficions de l'amplification et de la moyenne obtenue en mesurant sur plusieurs milliers de descendants. Ainsi les deux phénotypes apparaissent avec notre instrument de phénotypage comme deux classes parfaitement séparés (Figure 4-5 p.112).

L'amplification du gène *yfp*, expliquerait très bien cette augmentation du signal de fluorescence par bactéries. La présence de deux copies du gène, ou plus, implique une synthèse accrue de la protéine YFP dans chaque bactérie qui est donc plus fluorescente.

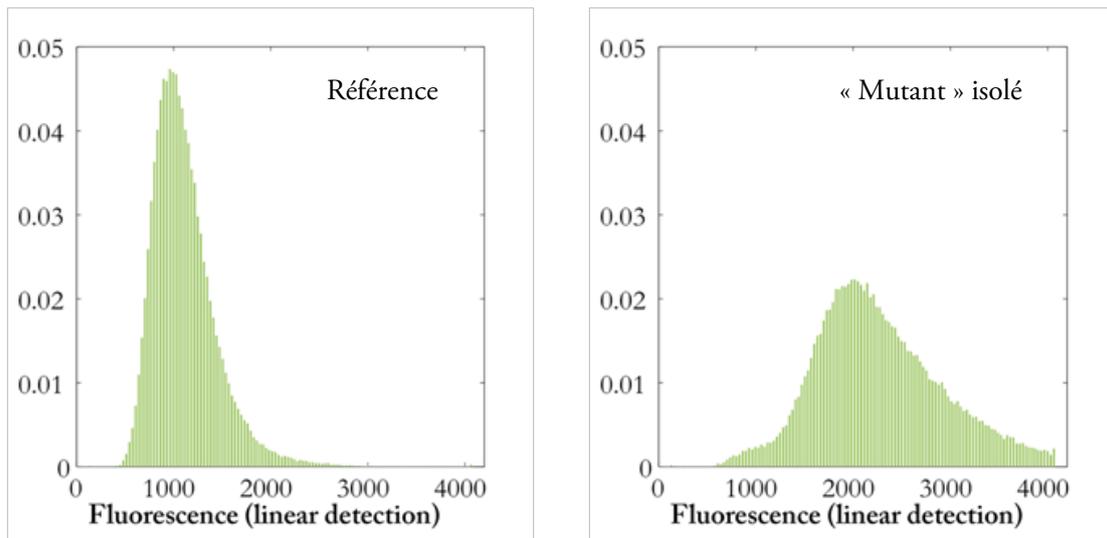


Figure 4-7

Comparaison des distributions de fluorescence par bactérie mesurée en cytométrie pour la population de référence (gauche) et pour le nouveau phénotype extrait après adaptation à l'ampicilline (droite). Ce dernier a bien une fluorescence par bactérie supérieure que le phénotype de référence.

---

#### 4.4.2 Résistance à l'ampicilline des classes phénotypiques

Si l'amplification du gène de résistance explique l'apparition du phénotype plus fluorescent, il doit être plus résistant. Comme nous l'avons isolé, nous pouvons mesurer sa sensibilité à l'ampicilline par une mesure standard en plaque 96 puits. Il croît en présence de 0,6 mg/mL d'ampicilline (Figure 4-8 gauche triangles rouges). Il présente donc une résistance à l'ampicilline égale à celle de la population exposée 80 générations à 0,1 mg/mL d'ampicilline, d'où nous l'avons extrait.

La résistance de ce phénotype peut expliquer celle observée pour la population suivant deux mécanismes : l'un strictement égoïste et l'autre au moins partiellement coopératif. La souche d'*E. coli* utilisée possède un gène de résistance à l'ampicilline. Celui-ci code pour une enzyme, la bêta-lactamase, qui dégrade l'ampicilline. Bien que l'enzyme soit liée au corps cellulaire, l'activité de dégradation pourrait profiter à toute la population dans l'environnement. Ce mécanisme de résistance est donc « coopératif », l'ensemble de la population en bénéficie. On peut envisager que la résistance observée pour la population diversifiée soit due à l'activité de la sous-population plus fluorescente qui permet aussi le maintien de phénotypes non résistants (Yurtsev et al. 2013). Cela constitue également une première explication possible à la limitation de l'envahissement de la population par ce phénotype résistant, car lorsqu'il atteint une fraction suffisante son activité protège le reste de la population et son avantage est gommé.

De manière « égoïste », il peut être le seul à survivre aux concentrations d'antibiotique les plus élevées. Il est le seul à bénéficier localement de l'activité du surplus de bêta-lactamases qu'il synthétise. Lors de la mesure de CMI, la croissance mesurée pour la population diversifiée serait alors due à la survie et à la croissance de ce phénotype plus fluorescent uniquement. Cette explication semble en accord avec l'augmentation du signal de fluorescence aux concentrations en amplicilline limites lors de la mesure de la CMI. Même si la variabilité rend le résultat moins évident (barre d'erreur), la fluorescence finale à 0,6 mg/mL d'ampicilline est supérieure à celle mesurée en

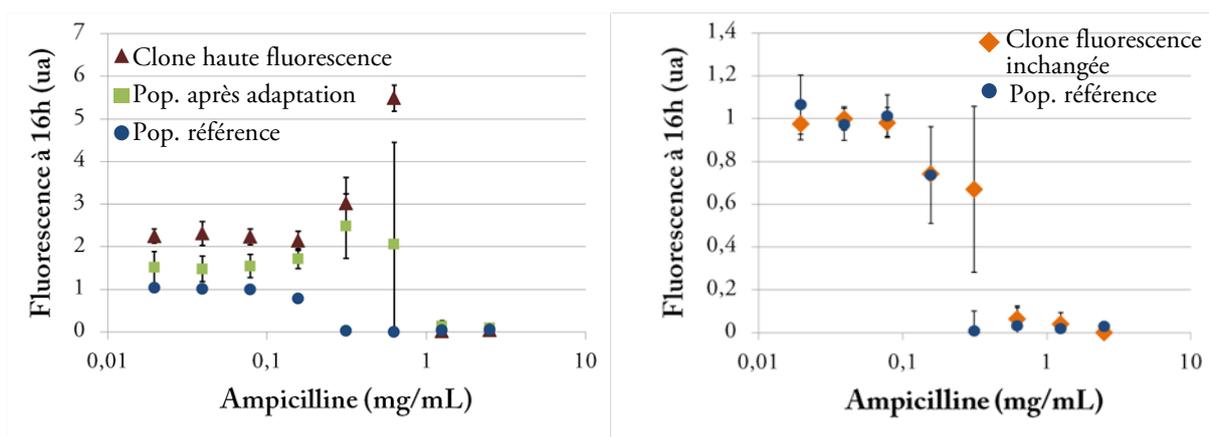


Figure 4-8

Comparaison des mesures de CMI pour la population exposée à 0,1 mg/mL d'ampicilline (carré vert, gauche), la population de référence (ronds bleus, gauche et droite), un clone exposé et dont la fluorescence est élevée (triangle rouge, gauche), et un clone exposé mais dont la fluorescence est inchangée (diamant orange, droite). La CMI de l'ampicilline pour la population de référence est de 0,3 mg/mL. Le phénotype nouveau plus fluorescent, et la population exposée, ont une CMI de 1,2 mg/mL. Enfin, la CMI du phénotype issu de la population exposée, dont la fluorescence n'a pas changée, est de 0,6mg/mL.

absence d'antibiotique (Figure 4-8 gauche carrés verts). Cette augmentation serait due à un taux de survie plus élevé pour la sous-population dont le gène *yfp* et le gène de résistance sont amplifiés. Le même phénomène est observé pour la population à fluorescence élevée. Celle-ci comporterait une sous-population encore plus fluorescente et encore plus résistante, c'est-à-dire une amplification plus importante. C'est probable car l'amplification est décrite comme plus « facile » après l'étape de duplication qui est limitante (Andersson et Hughes 2009). Ce phénomène serait également cohérent avec le phénotype observé en millifluidique dont la fluorescence est encore plus élevée (Figure 4-5 B, classe rouge).

Pourtant, dans le cas d'une résistance égoïste, il est plus difficile d'expliquer une réduction de l'avantage sélectif qui limiterait à 10% la fraction de bactéries dont la région du gène de résistance est amplifiée (Figure 4-4 p. 109). Elle implique que la classe phénotypique que nous assimilons au phénotype ancestral acquiert elle aussi, au cours du temps, une résistance accrue à l'ampicilline. Cette augmentation généralisée de la résistance diminuerait bien l'avantage sélectif de l'amplification de gène dans la population adaptée.

Pour évaluer la résistance de la classe phénotypique dont la courbe de croissance n'a pas changée, nous avons isolé un clone de la population exposée 80 générations à l'ampicilline sur boîte de Petri. Nous avons vérifié que sa fluorescence par bactérie correspond effectivement au phénotype ancestral en cytométrie (Figure 4-7 p. 116). Puis nous avons évalué sa CMI par la méthode standard en plaque 96 puits (Figure 4-8 droite diamants oranges). On constate une légère augmentation de la CMI pour l'ampicilline de 0,3 à 0,6 mg/mL. Le résultat n'est pas fort et nous n'avons testé qu'un clone de la classe qui nous intéresse. Il y a ici une difficulté pour trier les phénotypes en fonction de leur niveau de fluorescence et ensuite tester leur résistance, pour avoir une image représentative des résistances à l'ampicilline dans la classe dont la fluorescence n'a pas changée.

Nous voulons tester la résistance à l'ampicilline d'un grand nombre d'individus uniques en parallèle. Nous avons donc exploité l'instrument millifluidique pour préciser les résistances à l'ampicilline au sein des deux classes phénotypiques définies d'après le niveau de fluorescence. En utilisant la technique présentée page 51, nous avons préparé une collection de gouttes avec une concentration d'ampicilline croissante de 0 à 200 µg/mL (Figure 4-9 A). Cette gamme de concentration est choisie pour évaluer la sensibilité à l'antibiotique proche de la concentration utilisée pour l'adaptation 0,1 mg/mL. Les gouttes sont inoculées avec la population diversifiée après 80 générations d'exposition. La moyenne est de 1,6 bactérie par gouttes, ce qui correspond à 20% de gouttes inoccupées. Ce taux d'encapsulation est constant sur l'ensemble des gouttes. Lorsque la concentration en ampicilline dans les gouttes augmente, la fraction de gouttes pour lesquelles on mesure une croissance de bactéries diminue. En effet, au-dessus d'un certain seuil, les bactéries encapsulées ne survivent pas toutes ou n'ont pas toutes de descendances mesurables (Figure 4-9 A). La fraction de gouttes occupées diminue progressivement lorsque la concentration est supérieure à 100µg/mL (Figure 4-9 C carrés verts).

Dans chaque goutte occupée, nous avons testé la résistance à l'antibiotique d'une ou deux bactéries prises au hasard dans la population. Elles appartiennent à l'une ou l'autre des deux classes qui nous intéressent (Figure 4-9 B). Pour simplifier, on considère d'un côté les gouttes contenant au moins une bactérie à haute fluorescence, et de l'autre les gouttes qui contiennent exclusivement le phénotype qui a la fluorescence ancestrale.

Si la saturation du pourcentage de mutants ayant amplifiés la région du gène de résistance, est due à un mécanisme coopératif, alors la classe phénotypique de type ancestral n'a pas acquis une résistance équivalente. Nous devrions observer que la résistance des bactéries à basse fluorescence est moindre que celles des bactéries porteuses de l'amplification. Autrement dit, la fraction des gouttes contenant exclusivement le phénotype ancestral qui révèlent une croissance bactérienne devrait diminuer plus vite que celle des gouttes contenant le phénotype à haute fluorescence. Si le ralentissement de l'envahissement par les mutants à haute fluorescence est associé à un mécanisme de résistance égoïste, les fractions devraient varier de la même manière avec la concentration en antibiotique.

Le résultat est obtenu en déterminant aux différentes concentrations d'antibiotique, et parmi les gouttes comportant une croissance détectable, la fraction de gouttes à fluorescence élevée (Figure 4-9 C triangles jaunes) et la fraction de goutte à fluorescence ancestrale (Figure 4-9 C ronds bleus). Les fractions de chaque classe phénotypique est constante quel que soit la concentration en ampicilline. Ce résultat indique, qu'exposées individuellement à l'antibiotique les bactéries des différents phénotypes ont la même sensibilité. Une partie des résistants dont la fluorescence n'a pas changée, correspondent probablement à une amplification du gène *ampR* seul.

La résistance globale de la population s'accompagne donc d'une diversification phénotypique au sein de laquelle plusieurs modifications différentes apparaissent et confèrent une résistance individuelle. La résistance est principalement égoïste. La part coopérative n'est en tout cas pas suffisante pour maintenir une sous-population détectable n'ayant pas une résistance accrue en propre. Notre instrument nous a permis de révéler dans un premier temps la diversité phénotypique. Puis, nous avons aussi mis en évidence une diversité dans les modifications conférant une résistance accrue.

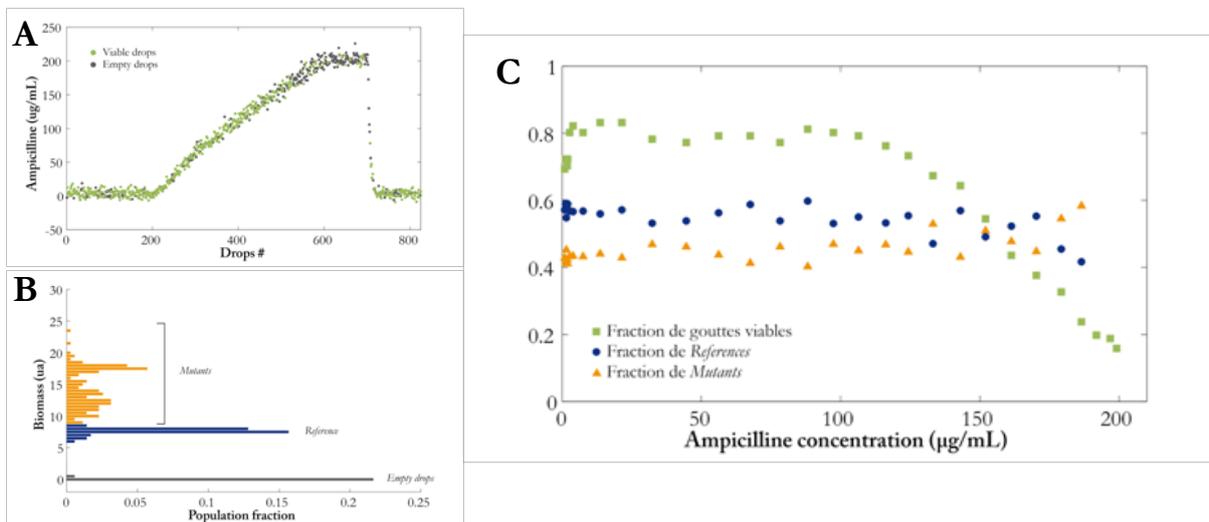


Figure 4-9

Un gradient linéaire d'antibiotique est préparé en microfluidique selon le profil représenté en A. On analyse la fraction de gouttes dans lesquelles on détecte une croissance de bactéries, en fonction de la concentration en antibiotique (Graphe C, carrés verts). Comme illustré sur le graphe B, on détermine parmi ces gouttes où l'on observe une croissance, la fraction de phénotypes plus fluorescents (jaune) et la fraction du phénotype de référence (bleu). Le graphe C montre que ces fractions, ronds bleus pour le phénotype de référence et triangles jaunes pour le phénotype plus fluorescent, varient peu avec la concentration, signe que les deux classes phénotypiques ont des sensibilités à l'ampicilline équivalentes.

## 4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'effet d'une concentration d'ampicilline inférieure à la Concentration Minimum d'Inhibition sur une population d'*E. coli*. Nous avons utilisé l'instrument de phénotypage en millifluidique pour réaliser une lecture des phénotypes présents au sein de cette population.

Les populations soumises à l'ampicilline sont devenues plus résistantes en 80 générations. Ce résultat, déjà observé dans la littérature (Gullberg et al. 2011), confirme que l'exposition des bactéries à des traces d'antibiotiques dans l'environnement favorise l'émergence de résistance.

La mesure des courbes de croissance dans les gouttes de 100nL de milieu LB pour un échantillon de bactéries uniques de la population a révélé que cette résistance accrue s'accompagne d'une diversification phénotypique. Avec notre instrument, nous captions une image de la diversité qui est constituée de la collection de courbes de croissance acquises. Il est possible de lire les conséquences de modifications adaptatives sur ces courbes. La mesure sur la descendance de chaque individu amplifie les différences et filtre les fluctuations qui ne sont pas héréditaires.

La diversité apparaît sous forme de classes discrètes dans notre espace d'observation. Ce résultat découle des contraintes sur la probabilité d'apparition et la force de l'avantage sélectif d'une modification pour qu'elle soit observable (Hegreness 2006). Seul un nombre restreint a suffisamment de chances de se produire, et acquiert un avantage assez fort, pour augmenter sa représentation au-dessus de notre seuil de détection (1%) en moins de 80 générations.

Nous avons décrit en détail l'émergence d'un phénotype qui semble être lié à une amplification de la région du gène de résistance. Ce mécanisme d'augmentation de la résistance a déjà été décrit. Bien qu'il semble très particulier, parce qu'il implique un gène de résistance déjà présent dans le génome de la bactérie, ce processus est probablement très général pour l'adaptation à de petits paliers adaptatifs. En effet, lorsque l'ajustement nécessaire n'est pas trop important, il doit très souvent exister une fonction dont la modulation est suffisante pour l'adaptation. L'amplification est pour cela très efficace et se produit avec une probabilité bien plus élevée que les des substitutions spécifiques de nucléotides.

L'utilisation de l'instrument millifluidique a également permis de montrer que l'augmentation de résistance était générale dans la population. Elle ne concernait pas uniquement les mutants porteurs de l'amplification de gènes. Plusieurs modifications différentes confèrent une résistance accrue et elles apparaissent simultanément dans la population.

La dynamique d'apparition puis le maintien des modifications qui permettent une petite augmentation de la résistance à l'antibiotique sont très favorables à un scénario d'adaptation progressive à des concentrations croissantes d'antibiotique. Chaque petit pas est acquis pour de nombreuses générations, ce qui constitue une forme d'« effet cliquet ». L'accumulation de modifications peut contribuer à une grande résistance. Chacun des petits changements a une probabilité d'apparition élevée par rapport à d'autres mutations beaucoup plus spécifiques. Ce chemin d'adaptation par petits pas aurait donc plus de chance d'être emprunté lors de transitions environnementales progressives. L'apparition d'une ou quelques mutations très spécifiques aurait

plus de chance d'être sélectionné lors d'une transition brutale sur une très grande population. Ces mutations spécifiques peuvent aussi intervenir à long terme comme une assimilation ou consolidation d'un phénotype acquis grâce la somme de petites modifications (Waddington 1953).

Pour évaluer plus précisément la portée et la généralité de ce type de mécanismes, il serait très instructif de répéter l'expérience avec différents antibiotiques et en augmentant progressivement la concentration.



## Chapitre 5

---

# Dynamique de population pendant la phase stationnaire

---



## 5 Dynamique de population pendant la phase stationnaire

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié l'évolution de la diversité phénotypique dans un environnement homogène sous l'effet d'un antibiotique pendant moins de cent générations. Dans ce dernier chapitre, nous nous intéressons à la diversité au sein de populations qui s'adaptent pendant un mois à un environnement épuisé et hétérogène.

### 5.1 La phase « stationnaire »

La croissance des bactéries dans un environnement nutritif favorable est couramment décrite par trois phases distinctes. Ces périodes ont été définies car elles sont observées lorsqu'on mesure la croissance des bactéries en laboratoire (Monod 1949). Dans la première phase, appelée phase de latence, les bactéries ne se multiplient pas. Elles s'adaptent physiologiquement à l'apparition de conditions favorables à leur croissance. Cette phase n'existe pas si l'environnement ne change pas significativement. Le temps de latence est plus ou moins long suivant les espèces et la transition environnementale. Après cette période d'acclimatation, la population augmente. La multiplication des bactéries est très souvent exponentielle dans des milieux nutritifs riches. À chaque génération, une bactérie se divise pour former deux bactéries. Cette phase de croissance est appelée phase exponentielle. Les bactéries finissent par épuiser leur environnement. Un nutriment indispensable à leur développement peut manquer ou l'accumulation de déchets ou d'une molécule excrétée interrompt la croissance. Le nombre de bactéries ne peut plus augmenter, il atteint un maximum. Bien que les conditions soient devenues insuffisantes pour la croissance, le plus souvent elles permettent à la population de se maintenir. Le nombre est constant, c'est la phase stationnaire (Prescott, Harley, et Klein 2003).

La pertinence dans l'environnement de ces trois phases n'est pas évidente. Il est probable que les bactéries rencontrent dans la nature des conditions variées où les ressources sont parfois abondantes et parfois inexistantes (Roszak et Colwell 1987). L'eau de mer est un exemple d'habitat peuplé de bactéries qui est pauvre en nutriments. La quantité de carbone disponible est très faible (50 $\mu$ M), surtout si on la compare aux concentrations de glucose dans les milieux de culture usuels (10mM) (Finkel 2006). Les conditions de croissance au laboratoire ne sont pas celles de la nature. Les trois phases définies en laboratoire ne décrivent donc probablement pas parfaitement la croissance des micro-organismes sauvages. Elles indiquent des états physiologiquement différents (Ishihama 1997). L'étude de ces états apporte des informations complémentaires qui contribuent à notre connaissance des bactéries. Ce savoir acquis en laboratoire est utile dans les contextes écologiques ou médicaux. En considérant la compétition pour la survie, il n'est pas étonnant que les bactéries aient évoluées pour croître très vite. L'enjeu est de se développer plus vite que les concurrents, dès que les conditions le permettent. Cela correspond à la phase exponentielle. La capacité des bactéries à survivre à des conditions défavorables, pour de longues périodes, est également une nécessité. Cela correspond à la phase stationnaire.

Cette dualité entre environnement et laboratoire s'applique aussi à l'adaptation des microorganismes. Les résultats obtenus en laboratoire ne sont certes pas immédiatement transposables ou pertinents dans la nature mais ils apportent une contribution à nos connaissances. Les expériences en laboratoire ont l'avantage de pouvoir décomposer et réduire la complexité du

problème. Le cas du chapitre précédent, l'adaptation à une concentration d'antibiotique sub-inhibitrice, est un bon exemple. Le réalisme de la situation est discutable, mais ne nuit pas à l'information qu'il apporte sur des cas similaires dans l'environnement. La validité de ce genre d'approche expérimentale, est également bien montrée par un exemple présenté au Chapitre 1. La diversité génétique et phénotypique observée au sein d'une population de bactéries infectieuses a révélé des similitudes avec celle observée dans différentes expériences d'adaptation en laboratoire (Levert et al. 2010).

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à l'adaptation d'une population de bactéries en phase stationnaire prolongée. Une population de bactéries se développe dans un environnement favorable jusqu'à épuisement des ressources. Que devient-elle ensuite ? La transition environnementale a l'avantage d'être très simple car il n'y a pas de paramètres à ajuster. Mais elle comporte aussi une complexité remarquable puisque l'environnement est continuellement modifié par les bactéries qu'il contient. Nous souhaitons explorer cette phase très particulière de la vie des bactéries, car, dans ce contexte de lutte intense pour la survie, la diversification phénotypique doit jouer un rôle important. Il s'agit d'un environnement modèle original pour adresser certaines questions fondamentales liées à l'adaptation. Tout d'abord, la structuration de l'environnement peut influencer la diversification, ou la radiation adaptative. Les expériences d'adaptation en laboratoire l'ont mis en évidence chez plusieurs microorganismes y compris pour *E. coli* (Rees Kassen 2009). Cependant, l'effet de l'hétérogénéité spatiale n'a jamais été étudié en phase stationnaire. Nous verrons également quelles peuvent être les conséquences de l'adaptation à la phase stationnaire, situation de carence, sur la croissance en phase exponentielle, situation d'abondance. Ensuite, il s'agit d'une transition environnementale probablement récurrente. Existe-t-il, au-delà de la régulation, des mécanismes de diversification et d'adaptation spécifiques à la phase stationnaire qui sont systématiquement explorés ? Peuvent-ils rendre l'adaptation prédictible ?

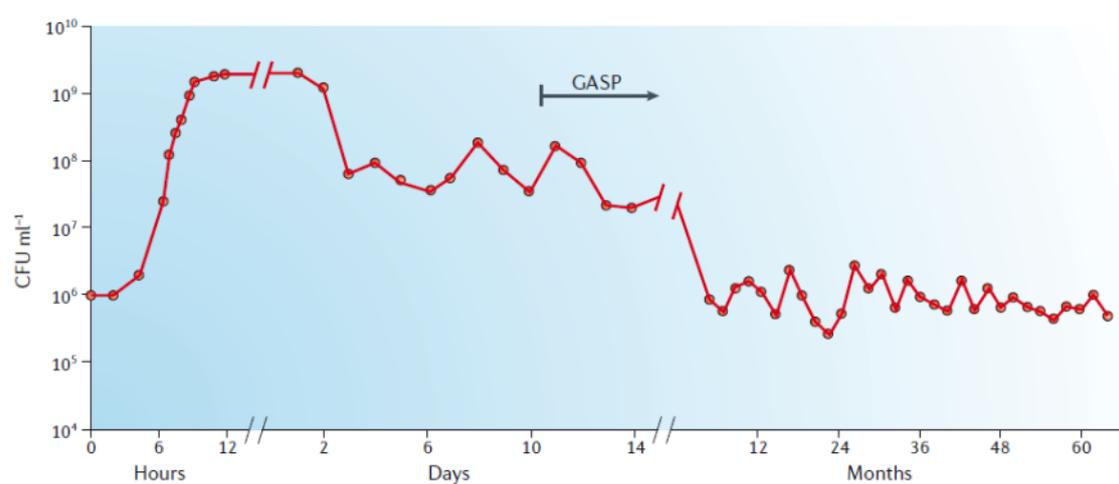


Figure 5-1

Évolution du nombre de bactéries viables en nombre de colonie formée par millilitre ( $\text{CFU.ml}^{-1}$ ) au cours du temps publiée par Finkel en 2006. La flèche indique l'apparition du phénotype ayant un avantage de croissance en phase stationnaire (GASP, voir texte), après 10 jours en phase stationnaire. (Finkel, 2006)

Au premier chapitre, en présentant les ingrédients de l'adaptabilité, nous avons souligné qu'il existe une forme de continuité de solutions pour assurer l'adaptation. Les contributions possibles s'étalent de la régulation de l'expression des gènes à l'acquisition de nouvelles fonctions grâce à des mutations. La régulation joue évidemment un rôle majeur lors de la phase stationnaire. Lorsque les conditions environnementales se dégradent, l'expression du facteur de régulation central, RpoS, régule environ 500 gènes pour ajuster l'état physiologique de la bactérie (Battesti, Majdalani, et Gottesman 2011). D'autres mécanismes sensitifs contribuent à modifier considérablement le schéma d'expression génétique et le phénotype en conséquence. Mais si la phase stationnaire se prolonge, d'autres ingrédients de l'adaptabilité entrent inévitablement en jeu. Après une phase de mort qui fait baisser la densité de la population, les bactéries peuvent survivre plusieurs années en phase « stationnaire » (Figure 5-1). Les travaux de Zambrano dans les années 90, ont montré qu'il y avait effectivement une dynamique d'adaptation au sein d'une population laissée en phase stationnaire. En effet, une population restée dix jours en phase stationnaire acquiert un avantage sélectif vis-à-vis de la population d'origine. Si elle est mise en compétition en phase stationnaire avec la population ancestrale qui n'a pas exploré la phase stationnaire, elle l'emporte rapidement en nombre (Zambrano et Kolter 1996). Ce phénotype a été appelé GASP, pour Growth Advantage in Stationary Phase, avantage de croissance en phase stationnaire. Certaines mutations responsables de ces phénotypes GASP ont été identifiées. Elles semblent impliquer certains régulateurs importants, dont RpoS. Elles permettent aux GASP de croître pendant la phase stationnaire en utilisant plus efficacement les déchets exploitables qui sont présents dans le milieu. Le phénotype GASP apparaît après 8 à 10 jours de phase stationnaire. Les résultats indiquent que la composition phénotypique est ensuite en constante évolution. Les mutants victorieux semblent se succéder dans la population (Finkel 2006). À notre connaissance, l'adaptation à la phase stationnaire prolongée pour *E. coli* n'a pas fait l'objet d'autres investigations, depuis la caractérisation génétique et moléculaire des phénotypes GASP.

L'expérience est très simple, car il y a peu de paramètres à ajuster. Une population de bactéries croît jusqu'à épuiser son environnement. Elle s'adapte ensuite pendant plusieurs jours dans ce milieu fermé détérioré qui est constamment modifié par les bactéries elles-mêmes. Le seul facteur que nous faisons varier est l'agitation des milieux. Nous créons d'une part des environnements qui sont maintenus homogènes par l'agitation, et, d'autre part, des environnements qui se structurent. En effet, dans les milieux qui sont laissés statiques, la composition et la densité de bactéries peuvent devenir très hétérogènes.

Nous souhaitons analyser la composition phénotypique des différentes cultures après différentes durées de phase stationnaire. Nous cherchons à lire les phénotypes distincts qui coexistent dans la population. Cette démarche est tout à fait analogue à celle du chapitre 4. L'observation exacte et complète de cette diversité impliquerait d'enregistrer une description totale pour tous les individus de la population. Cela signifie déterminer pour  $10^6$  à  $10^{10}$  bactéries le génome et la composition chimique exacte. C'est évidemment impossible. Il faut donc trouver une solution raisonnable pour capter une image de la diversité restreinte en termes d'échantillonnage et de quantité d'information. Notre méthode consiste à mesurer dans les gouttes les courbes de croissance des descendances

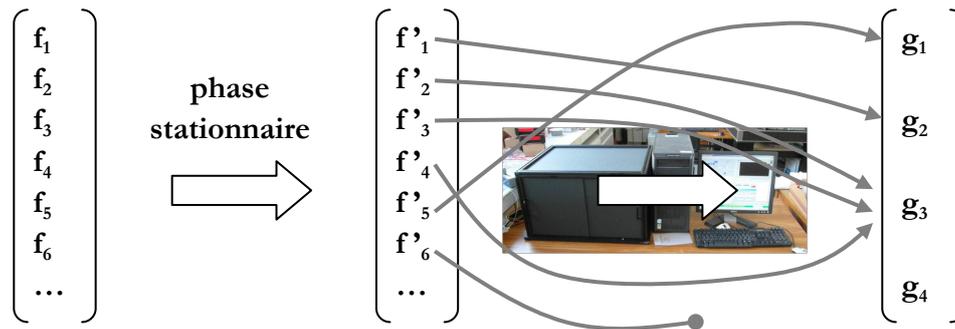


Figure 5-2

Soit  $(f_i)$  une composition phénotypique réelle, elle est modifiée par la phase stationnaire en  $(f'_i)$ . L'observation de cette diversité avec l'instrument de mesure donne une image  $(g_j)$ . Il s'agit d'une application de l'espace des compositions phénotypiques réelles  $F$ , vers l'espace d'observation de l'appareil  $G$ .

immédiates de 100 à 1000 individus isolés. Cette collection de courbes constitue notre image de la diversité. Cette image est partielle. Étant donné notre échantillon, nous ne pouvons pas détecter sur cette image un phénotype qui représenterait moins de 1% de la population. Certains phénotypes ne seront pas discernables s'ils ont la même signature dans notre espace d'observation (Figure 5-2). La mesure sur la descendance permet d'amplifier le phénotype de l'individu unique encapsulé dans la goutte. Il s'agit d'une moyenne sur cette descendance. Seules les modifications héréditaires sur la valeur moyenne d'un caractère sont observables.

La lecture de diversité phénotypique que nous réalisons est décorrélée de l'adaptation à la phase stationnaire. Nous supposons qu'au moins une partie des modifications phénotypiques apparues pendant la phase stationnaire aura un effet sur la croissance dans le milieu LB que nous mesurons. Les possibilités d'avoir de tels effets sont nombreuses. Les mécanismes d'internalisation et d'utilisation des ressources pourraient être modifiés pour mieux profiter du peu de ressources disponible en phase stationnaire. Il est alors probable que la phase de croissance en situation d'abondance s'en trouve changée, car ces fonctions sont également importantes dans cette phase. La survie en phase stationnaire pourrait nécessiter la production d'une substance en grande quantité. Une telle activité devient inutile si elle est maintenue en situation d'abondance, et elle peut ralentir la vitesse de division ou diminuer le rendement. Le fait que les premières conséquences de l'adaptation soient habituellement observées sur des systèmes de régulation majeurs, augmente également nos chances de voir des effets sur notre mesure. Enfin nous devrions observer les conséquences que Thomas Ferenci a décrit, de manière très générale, comme la « Self Protection And Nutritional Competence (SPANC) balance », l'équilibre entre protection et efficacité nutritionnelle (2005). En effet, notre phénotypage mesure à la fois la vitesse de croissance et le rendement, il cible donc l'efficacité nutritionnelle, tandis que les conditions de la phase stationnaire exigent avant tout la survie dans des conditions hostiles.

## 5.2 Présentation de l'expérience

Afin d'observer la dynamique d'adaptation en phase stationnaire nous avons laissé des populations en phase stationnaire entre 24 heures et 1 mois.

### 5.2.1 Cultures en phase stationnaire

Pour étudier l'adaptation phénotypique lors d'une phase stationnaire prolongée, nous avons suivie quatre expériences en parallèle (Figure 5-3) lancées à partir de trois clones.

#### *Préparation des populations initiales*

Nous avons isolé trois colonies sur un gel LB-agar inoculé avec notre stock de référence de la souche MC4100 fluorescente (YFP). Ces clones sont appelés A, B et C. Chaque colonie a été dispersée dans du milieu LB. Après la croissance à 37°C jusqu'à la phase stationnaire, nous congelons à -80°C 1mL de bouillon avec 20% de glycérol pour les clones A, B et C.

Le jour 0, nous lançons en culture 5µL de nos clones congelés A, B et C dans 100mL de LB dans des bouteilles plates, incubées à plat sous agitation, jusqu'à une densité optique à 600nm de 0,1.

#### *Début de l'expérience*

Les cultures sont alors fragmentées en échantillons de 5mL dans des tubes à fonds coniques de 50mL avec bouchon vissé. Les tubes seront incubés à 37°C, soit sous agitation (environnement homogène), soit statiques (environnement structuré).

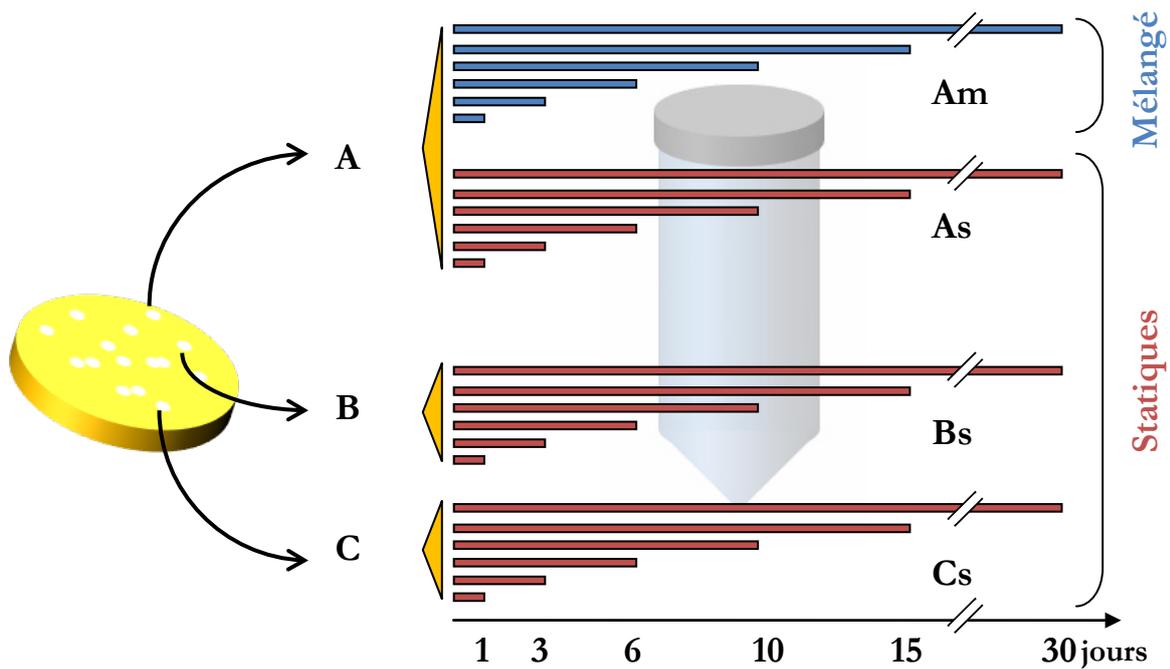
On prépare autant de tube que d'observations souhaitées. En effet, chaque prélèvement d'échantillon est destructif. Il nécessite l'ouverture et l'agitation du milieu, ce qui brise l'éventuelle structuration pour les tubes statiques.

Les analyses ont lieu après 1, 3, 6, 10, 15 et 30 jours, ce qui nécessite 6 tubes par expérience. Le clone A est utilisé pour une série de tubes maintenus sous agitation, notée « Am », et une série laissée statique, « As ». Les séries de tubes contenant les clones B et C, sont laissées statiques et notées « Bs » et « Cs ».

Enfin, tous les tubes sont incubés à 37°C. Après le nombre de jours choisis, un tube de chacune des quatre lignées est prélevé. Après agitation au vortex, un prélèvement d'un millilitre est congelé à -80°C avec 20% de glycérol.

Enfin, pour les tubes prélevés après 6, 8 et 30 jours, on extrait le milieu. Après une étape de centrifugation, le surnageant est filtré à 0,2µm. Le jus ainsi collecté pour les quatre lignées est stocké à -20°C.

Le protocole expérimental général est schématisé sur la Figure 5-3.



**Figure 5-3**

Schéma du protocole.

Trois clones A, B et C, sont prélevés sur un gel LB-agar inoculé avec notre souche MC4100 fluorescente. Ils sont cultivés dans trois bouteilles contenant 100mL de milieu LB (triangles jaunes). En début de phase stationnaire, on prélève dans les cultures des volumes de 5mL qu'on met à incuber dans des tubes à fond conique de 50mL : 6 tubes sont incubés statiques à 37°C pour chaque clone, et 6 tubes en plus pour la clone A sont incubés sous agitation. Pour chaque expérience, Am, As, Bs et Cs, on réalise un prélèvement destructif sur un des 6 tubes après 1 ,3 ,6 ,10, 15 et 30 jours. Le prélèvement est congelé à -80°C avec 20% de glycérol.

### 5.2.2 Dynamique globale de population

Avant de présenter les résultats sur la diversification phénotypique des populations, nous allons commenter la dynamique globale des populations. Comme le montre la Figure 5-1 la phase stationnaire prolongée n'est pas exactement stationnaire. Le nombre de bactéries viables décroît fortement après deux ou trois jours. Il est important de connaître cette dynamique car elle est importante pour interpréter l'émergence d'un phénotype nouveau et la nature de son avantage sélectif. Par exemple, lorsque la population décroît à cause d'une forte mortalité cellulaire, un phénotype, qui aurait un meilleur taux de survie, peut augmenter considérablement sa représentation dans la population sans se diviser.

Lors de l'analyse des phénotypes en millifluidique, il est possible d'estimer le nombre de bactéries viables dans l'échantillon. La méthode est totalement analogue au comptage de colonies sur boîte de Petri. Pour préparer les gouttes, nous effectuons une dilution de l'échantillon congelé dans du milieu LB frais. Le facteur de dilution est connu. En constatant la fraction de gouttes qui présentent une croissance bactérienne, nous pouvons estimer la densité de bactéries viables dans le prélèvement. En effet, les gouttes pour lesquelles on ne mesure aucun signal, étaient inoccupées ou contenaient une bactérie non viable. Nous estimons le paramètre  $\lambda$  de l'encapsulation de bactéries viables, c'est-à-dire la densité de bactéries viables dans le volume utilisé pour préparer les gouttes. Avec le facteur de dilution appliqué au départ on obtient la densité de bactérie viable dans l'échantillon. Nous supposons l'équivalence entre la méthode sur gel LB-agar et notre méthode en goutte. Les expériences n'ont jamais montré de discordance entre les deux méthodes. On réalise donc une évaluation de la « colony forming unit » dans des conditions de cultures exclusivement liquides.

La densité de bactéries cultivables ainsi mesurée diminue d'un facteur 100 en quinze jours pour la culture sous agitation (Am). Les cultures statiques présentent une diminution de viabilité d'un facteur dix dans les dix premiers jours (Figure 5-4). Cette diminution de la population viable est en accord avec la dynamique mesurée par Finkel (Figure 5-1). Le nombre de bactéries viables que peut

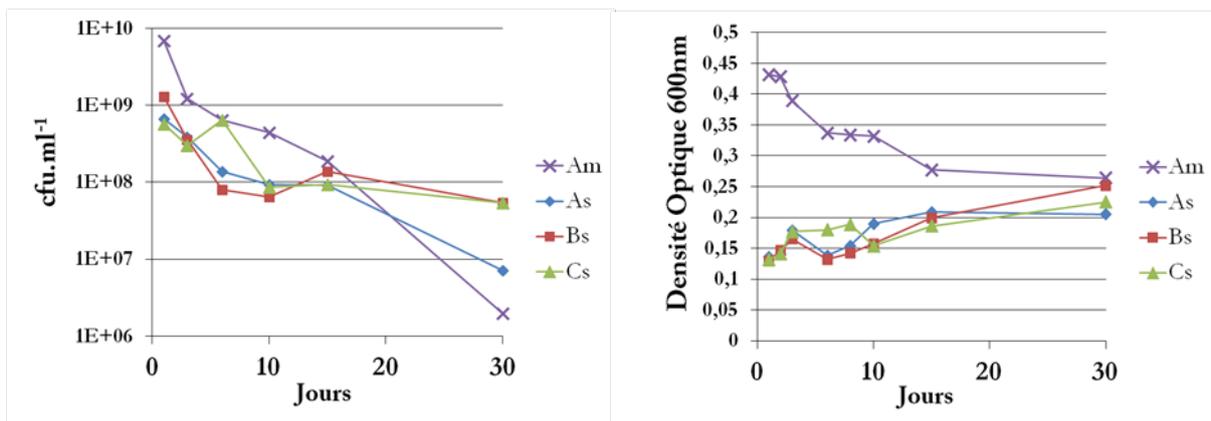


Figure 5-4

Dynamique globale des populations dans la phase stationnaire.

À gauche, évolution de la densité de cellules cultivables pendant la phase stationnaire prolongée de 1 à 30 jours. Le nombre est exprimé en unités de colonies formées par millilitre, il n'est pas déterminé par comptage sur boîte de Petri mais de manière tout à fait équivalente d'après le nombre de croissances observées dans les gouttes en millifluidique.

À droite, la densité optique à 600 nm des cultures au cours de l'expérience. La différence de dynamique observée entre les deux mesures indique la présence de nombreuses bactéries mortes ou non-cultivables dans les environnements.

supporter l'environnement diminue, ce qui indique que les bactéries ont épuisé le milieu au point que les conditions ne permettent plus de maintenir l'ensemble de la population. Néanmoins, une fraction survit. Ces bactéries doivent résister à des conditions hostiles et trouver les ressources pour leur maintenance. La Figure 5-4 présente également l'évolution de la densité optique. La dynamique est très différente de celle du nombre de bactéries viables. En considérant que la densité optique mesure l'ensemble des bactéries, viables ou mortes, on comprend que l'environnement comporte un très grand nombre de cellules mortes. Ces dernières constituent une réserve de nutriments. Il est très difficile de connaître la dynamique de population dans la phase stationnaire. On ignore le taux de renouvellement de la population. Certaines bactéries peuvent être viables, mais elles mettent beaucoup plus de temps que les autres à repartir en croissance, de sorte que nous ne les détectons pas comme viables.

### 5.2.3 Modification de l'environnement

Le milieu change beaucoup pendant la phase stationnaire prolongée. Le milieu devient basique et la pression osmotique augmente de manière significative. Le pH d'un milieu LB fraîchement préparé, est de 6,8. Son osmolarité est mesurée à de 0,309 osmol.L<sup>-1</sup>. Après 6 jours en phase stationnaire, le pH est proche de 8 (8-8,3) et l'osmolarité est comprise entre 0,4 et 0,45 osmol.L<sup>-1</sup>. À 30 jours, l'osmolarité est comprise entre 0,45 et 0,5 osmol.L<sup>-1</sup> et le pH atteint 8,6 (8,4-8,7). L'osmolarité constatée ne constitue pas un stress osmotique (Record Jr et al. 1998). En revanche, l'environnement devenu basique constitue une pression de sélection forte puisque la limite tolérée par *E. coli* est à pH=9.

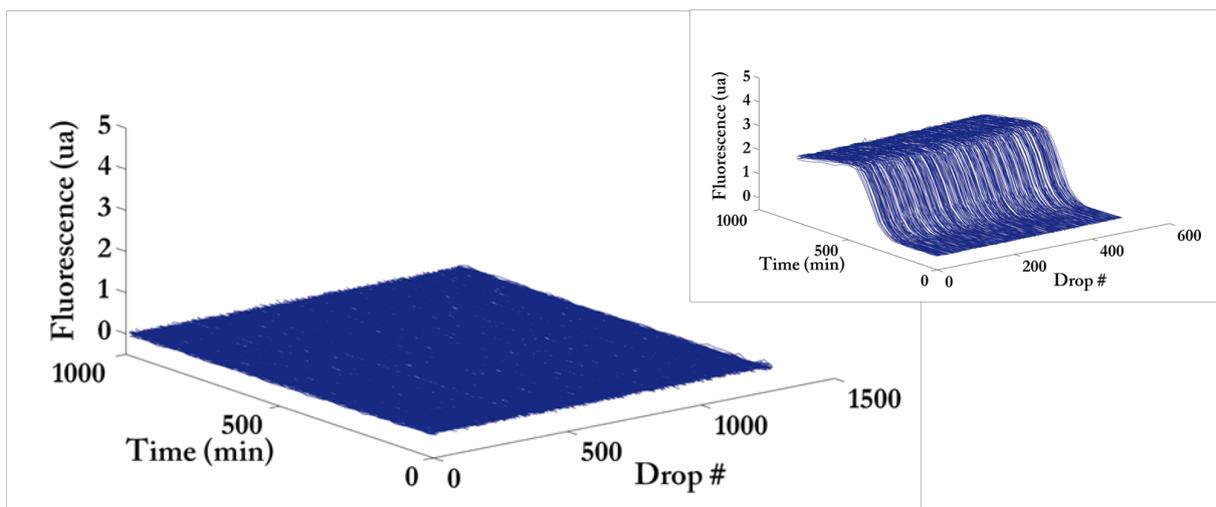
L'environnement maintenu sous agitation ne présente aucune différence significative par rapport à l'environnement statique sur les mesures de pH et d'osmolarité. Pour autant, les conditions environnementales sont radicalement différentes. Les tubes incubés sur un agitateur orbital reste homogènes pendant toute la durée de l'expérience. Il n'y a qu'une seule niche, donc les conditions sont identiques pour toutes les bactéries. La compétition est globale. Au contraire, pour les expériences statiques, l'environnement est très hétérogène dès 24 heures. Une partie des bactéries sédimente, s'accumule au fond du tube et forme un tapis dense. Ce culot est cependant facilement dispersé lors de l'agitation avant le prélèvement. Par ailleurs, on peut s'attendre à des gradients de composition : d'une part, à cause de l'hétérogénéité de la densité de bactéries et d'autre part, car le transport des molécules par diffusion sans convection est lent. Le coefficient de diffusion du dioxygène dans l'eau à 20°C est de 2.10<sup>-9</sup>m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>. Il faudrait 55 heures pour une diffusion sur les 2cm qui séparent l'interface air-liquide et le fond du tube. De même, une bactérie, même en suspension, explore un volume très restreint de l'environnement, d'autant que notre souche n'a pas de flagelle et donc pas la motilité. Ainsi, les conditions ressenties par les individus de la population peuvent être très différentes. L'adaptation dans les environnements statiques structurés est guidée par la colonisation des meilleures niches possibles et une compétition locale.

### 5.2.4 Croissance dans l'environnement modifié

L'analyse de la diversité phénotypique en millifluidique est réalisée dans du milieu LB frais. La possibilité de mesurer directement les performances des cellules uniques dans l'environnement de la phase stationnaire serait évidemment très intéressante. Elle permettrait de décrypter l'avantage sélectif qui conduit à leur émergence significative au sein de la population.

Nous avons réalisé des cultures de bactéries avec le dispositif millifluidique en utilisant les filtrats obtenus après les prélèvements d'échantillons. La filtration à  $0,2 \mu\text{m}$  permet d'éliminer tous les corps cellulaires viable ou non. On inocule ce jus avec l'échantillon congelé, la concentration est ajustée d'après la viabilité, déterminée comme décrit dans le paragraphe précédent, pour obtenir un taux d'occupation des gouttes de 25%. Nous n'observons aucune croissance dans les gouttes en millifluidique (Figure 5-5). Les conditions ne permettent pas une croissance détectable à partir d'une bactérie unique. Il est probable que l'environnement soit trop appauvri pour permettre une production de biomasse détectable. En effet, le seuil de détection en concentration se situe entre  $10^7$  et  $10^8$  cellules par millilitre, et la densité de bactéries viables pendant la phase stationnaire est inférieure à ce seuil. Nous avons aussi éliminé la biomasse du milieu lors de la filtration, or, celle-ci constitue peut être la principale réserve de nutriments pour les bactéries vivantes lors de la phase stationnaire.

Cette observation justifie également l'analyse de la diversité dans du milieu LB que nous allons mettre en œuvre.



**Figure 5-5**

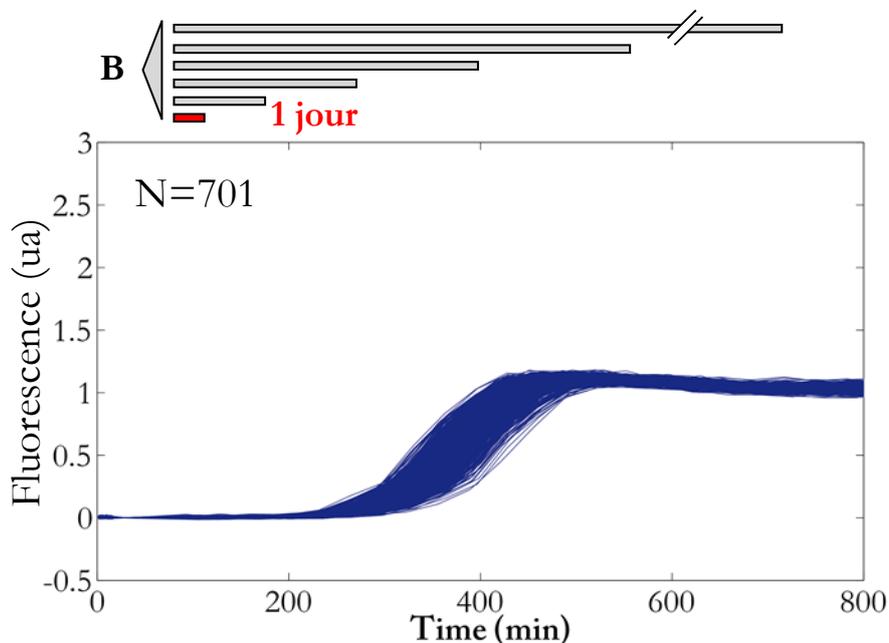
Signal mesuré pour 1300 gouttes préparées avec le filtrat de la culture Bs après 30 jours en phase stationnaire. Le filtrat a été inoculé avec la population correspondante, Bs 30 jours, pour un taux d'occupation espéré de 25%. Aucune croissance n'est observée pendant les 17 heures d'expérience. Pour comparaison, à droite, le signal de croissance acquis pour des gouttes préparées avec du milieu LB frais inoculé avec le stock du clone B.

### 5.3 Résultats de l'analyse phénotypique

#### 5.3.1 Phénotype initial et identification de la diversité

Les populations initiales A, B et C sont issues d'une bactérie unique et ont été cultivées pendant environ 50 générations avant le début de la phase stationnaire. Ces populations de départ comme au chapitre précédent sont donc très homogènes.

Pour identifier une diversification deux phénomènes sont envisageables. Les valeurs du phénotype observé peuvent se disperser de manière continue autour d'une valeur moyenne. La distribution des valeurs mesurées s'élargit alors. L'autre scénario de diversification consiste en l'apparition d'une nouvelle classe de valeurs distincte de celle d'origine. Nous pouvons considérer qu'un phénotype différent est identifiable s'il est représenté par une classe de courbes similaires, et que l'allure des courbes est distincte de celle du phénotype initial. Une allure distincte se traduit par un changement significatif de la valeur moyenne sur la classe de l'un des trois paramètres présentés au chapitre 2 : temps de détection, temps de division et signal de fluorescence à saturation. Un changement significatif désigne une différence supérieure aux coefficients de variation déterminés au chapitre 2 (Tableau 2-1). La résolution phénotypique est meilleure sur le signal de fluorescence au plateau, c'est donc le paramètre privilégié. En effet, le temps de division présente une incertitude importante dans notre méthode d'estimation (Chapitre 2). Le temps de détection est, quant à lui, sensible à la taille de l'inoculum et à l'état physiologique de la cellule encapsulée ce qui interfère sur la lecture et rend difficile l'utilisation de ce paramètre pour discriminer les phénotypes.



**Figure 5-6**

Résultats de l'analyse phénotypique en millifluidique de l'échantillon prélevé pour la population issue du clone A laissée 24 heures en phase stationnaire (Am J1). Les 701 courbes ne révèlent pas de diversité. Les lignées As, Bs et Cs présentent des résultats identiques après une journée. (Courbes normalisées par la valeur de saturation de la fluorescence du phénotype ancestral)

Par ailleurs, comme discuté dans l'introduction de ce chapitre, nous n'observons que les phénotypes discernables par notre méthode de phénotypage. S'il existe des modifications sans effet sur la croissance dans le milieu LB mesurée en goutte, nous ne les détectons pas. Par conséquent, sur chaque mesure, les courbes qu'on ne peut distinguer du phénotype ancestral sont assimilées au phénotype ancestral. Elles seront représentées en bleu foncé. Ceci ne vaut que dans notre espace d'observation. Il est très probable que les bactéries à l'origine de ces courbes soient radicalement différentes mais que cette différence ne soit pas visible avec notre mesure.

Nos chances d'observer une sous-population, une classe, deviennent significatives lorsque celle-ci représente 1% de la population globale. Cette limite implique que nous n'observons que les modifications phénotypiques performantes qui, en partant d'une représentation faible ( $<10^{-4}$ ), atteignent grâce à leur avantage sélectif une fraction de la population supérieure à 1%.

### 5.3.2 Diversification dans l'environnement homogène

Le premier résultat qui nous intéresse est d'évaluer combien de temps il faut pour observer une diversification phénotypique avec notre analyse en millifluidique.

Après 24 heures, nous ne détectons aucune diversité sur les quatre lignées. La Figure 5-6 montre le résultat pour la lignée Am qui est représentatif des collections de courbes acquises pour les trois autres séries. La variabilité qu'on peut observer sur le temps de détection n'est pas significative : l'écart type est inférieur au temps de génération. La distribution de la valeur de fluorescence à la saturation est identique à celle mesurée sur les populations de référence avant le début de la phase stationnaire. Dans la limite de résolution de notre outil et dans notre espace d'observation aucune diversification n'est observée dans les premières 24 heures.

Le premier signe de diversification, dans l'expérience incubée sous agitation, est mesuré après 6 jours de phase stationnaire. Une courbe présente une allure significativement différente du phénotype ancestral. Mais le caractère significatif de cette courbe isolée est confirmé par l'observation d'une classe de courbes ayant la même allure après dix et quinze jours (Figure 5-7). Il est intéressant de constater que le temps nécessaire à l'apparition de diversité détectable avec notre dispositif, 6 jours, coïncide à peu près avec celui décrit comme nécessaire pour l'apparition de phénotype GASP. Nous n'avons pas vérifié si le phénotype qui apparaît est effectivement un phénotype GASP dans le sens défini par Zambrano. Mais si ce phénotype apparaît et représente plus de 1% de la population, c'est qu'il a « un avantage en phase stationnaire ».

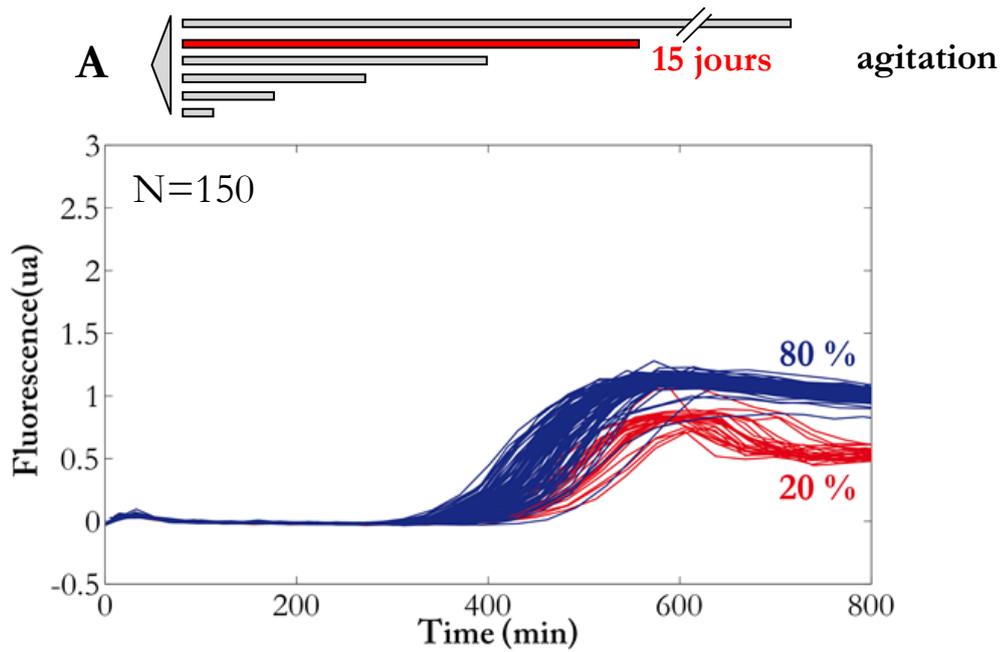


Figure 5-7

Phénotypage de la population issue du clone A incubée 15 jours en phase stationnaire sous agitation. En plus du phénotype ancestral (bleu) qui représente 80% de la population, un deuxième phénotype (rouge) représente 20% de la population. Ce nouveau phénotype a été détecté également dans l'échantillon resté seulement 10 jours en phase stationnaire sous agitation. (Courbes normalisées par la valeur de saturation de la fluorescence du phénotype ancestral)

Les courbes associées au nouveau phénotype apparu passent par un maximum. Nous n'avons pour le moment aucune indication sur la raison de cette décroissance après la phase exponentielle. Ce nouveau phénotype a sûrement acquis un caractère qui lui confère un avantage sélectif plus tard dans la phase stationnaire. Une conséquence collatérale de ce changement peut porter sur l'entrée dans la phase stationnaire, sous la forme d'une phase de mortalité précoce.

Enfin, le même phénotype a été observé après, 6, 10 et 15 jours de phases stationnaires. Or, les cultures correspondantes ont été initiées avec une fraction de la même population, mais sont ensuite contenues dans trois tubes différents dans lesquels se déroule la phase stationnaire. Les scénarios dans les trois tubes semblent cohérents. Cela suggère, soit une forte probabilité d'apparition de ce phénotype nouveau, soit sa présence dans la culture avant la distribution dans les différents tubes pour la phase stationnaire.

### 5.3.3 Diversification dans l'environnement hétérogène

En comparant la diversification dans l'environnement agité et les expériences statiques nous pouvons évaluer l'importance de la structuration de l'environnement sur l'apparition de diversité phénotypique observable. Il semble que l'environnement structuré soit plus favorable à l'émergence rapide de phénotypes nouveaux.

La diversité apparaît le troisième jour dans les trois environnements statiques. Les phénotypes émergents (tous représentés en rouge sur la Figure 5-8) constituent entre 1% et 5% de l'échantillon analysé. En revanche, l'environnement homogène ne montre aucun signe de diversification après trois jours (Figure 5-8). La structuration et l'hétérogénéité de l'environnement sont donc favorables à une émergence plus rapide de phénotypes différents observables. Ce résultat, illustré par un seul exemple dans cette expérience, a été confirmé avec au total 12 populations laissées pendant 7 jours en phase stationnaire. Les 6 populations sous agitation ne révèlent aucune diversité tandis que celles incubées statiques ont systématiquement 2 ou 3 groupes phénotypiques distincts.

La structuration de l'environnement a bien un effet majeur sur l'émergence de diversité. D'une part, dans un milieu homogène il faut plus de temps pour observer une diversification sur le phénotype que nous lisons « croissance en milieu LB ». D'autre part, les phénotypes émergents sont tout à fait différents suivant que l'environnement est homogène ou hétérogène (Figure 5-7).

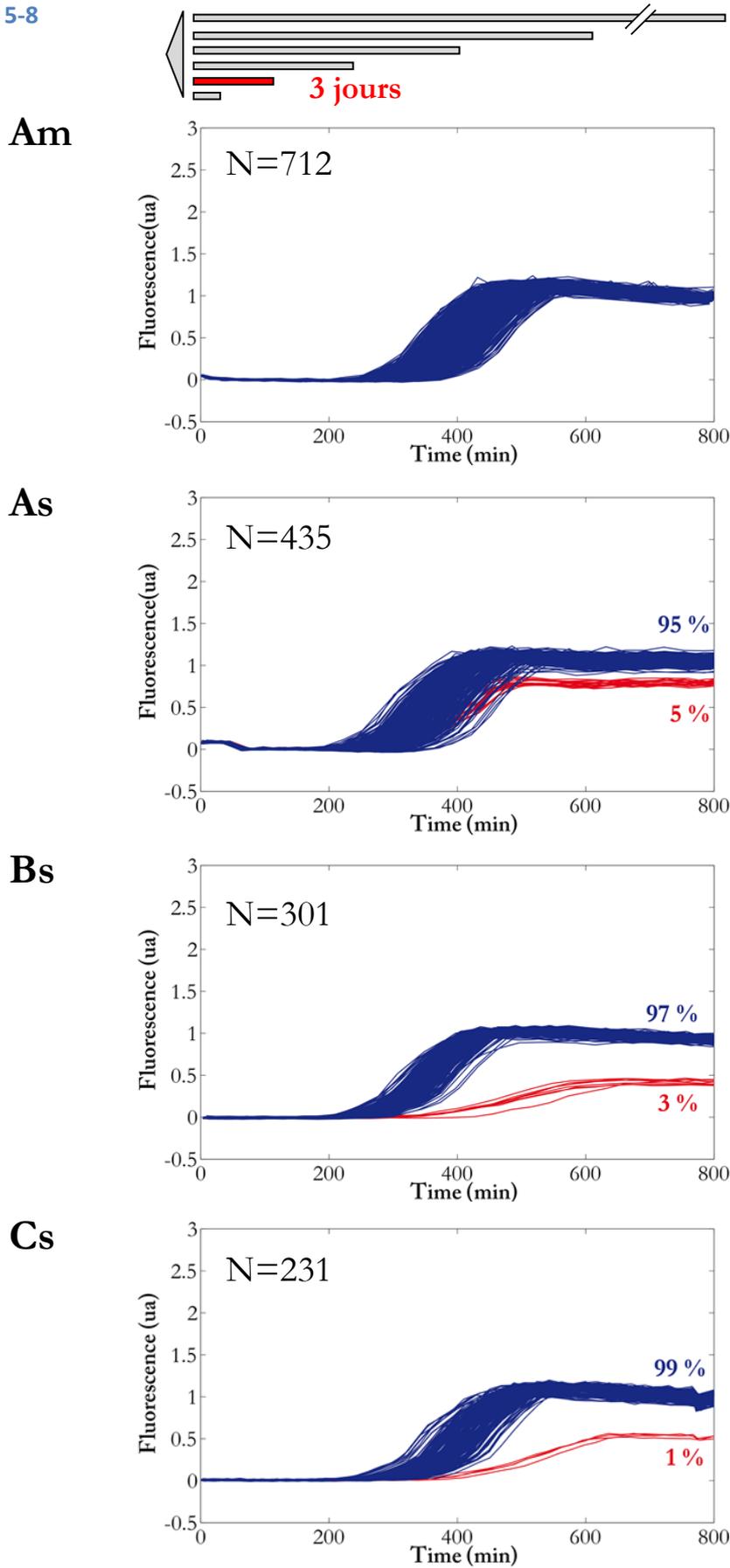
---

#### Légende Figure 5-8 page 138

Analyses phénotypiques après 3 jours de phase stationnaire pour la lignée sous agitation As, et les lignées statiques As, Bs et Cs. Le nombre N de courbes mesurées est indiqué sur chaque graphe. Le groupe identifié comme phénotype d'origine est systématiquement tracé en bleu. Sur chacune des trois lignées statiques, une sous-population exprimant une croissance en milieu LB différente est détectée et tracée en rouge. Enfin, les pourcentages que représentent les différents groupes phénotypiques sont indiqués. (Courbes normalisées par la valeur de saturation de la fluorescence du phénotype ancestral)

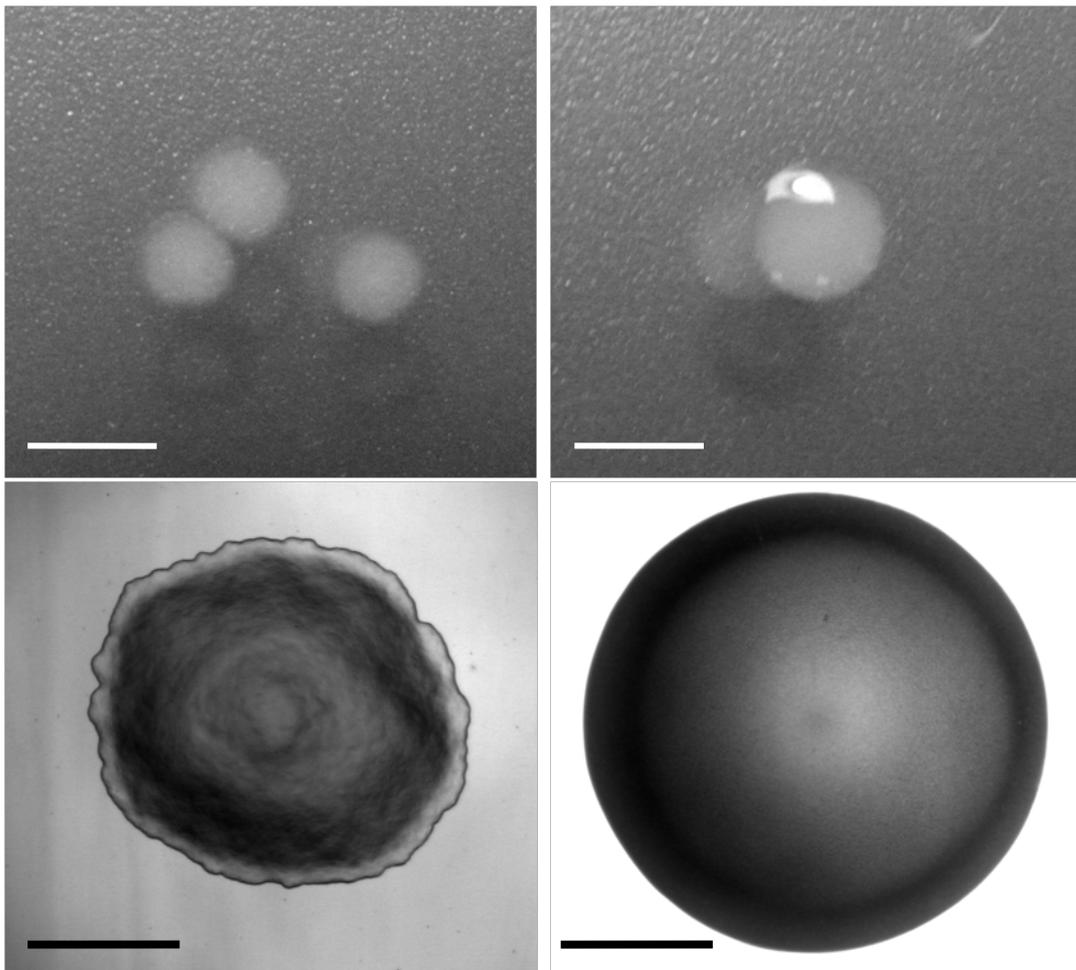
---

Figure 5-8

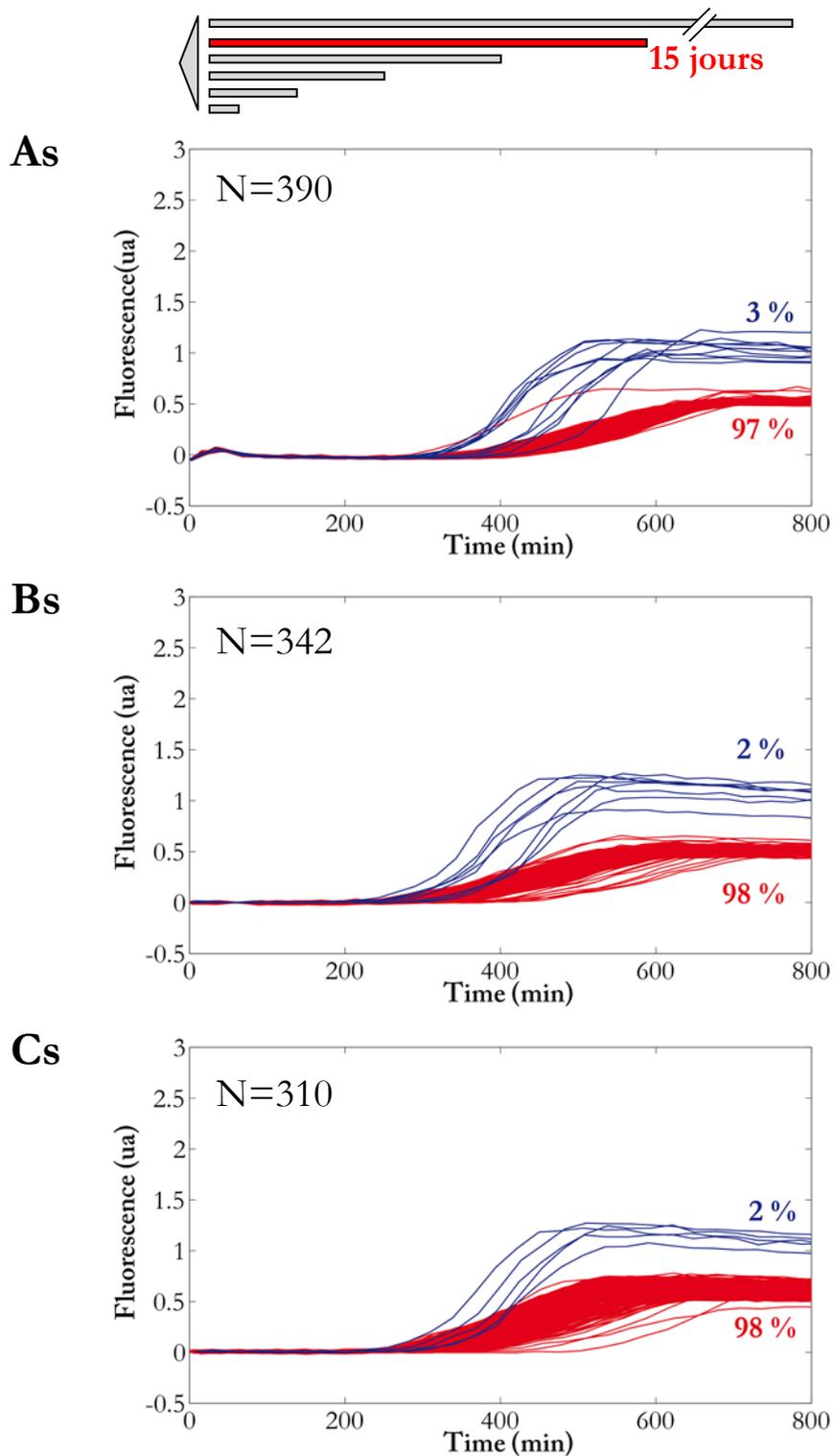


#### 5.3.4 Convergence vers un phénotype ?

Dans le cas des environnements statiques, on constate que parmi les phénotypes apparus dès 3 jours (Figure 5-8), deux sont très similaires. On observe en effet un phénotype à croissance plus lente et à saturation de fluorescence plus basse, représentant 3% et 1% dans les tubes des séries Bs et Cs, qui constituent deux expériences totalement indépendantes. Les analyses sur des populations après 7 jours de phase stationnaire statique évoquées ci-dessus confirment que ce phénotype apparaît dans plus de trois quart des cas. Nous avons observé que ce phénotype correspond à des colonies sur milieu solide brillantes et visqueuses, dites « mucoïdes » (Figure 5-9 droite). Cette morphologie de colonies indique la production d'un polymère à l'extérieures de la cellule. Lorsque cette morphologie de colonie a été prélevée et analysée avec l'instrument de phénotypage nous avons observé 100% de courbes présentant la même croissance lente et la saturation basse.



**Figure 5-9** Photographies des colonies correspondant au phénotype ancestral (gauche), et au phénotype mucoïde (droite). En haut, photographies macro (barre 3mm). En bas, images de microscopie (2x, barre 1mm). Les colonies mucoïdes sont plus brillantes (reflet en haut à droite) et beaucoup régulières (cercle parfait en bas à droite).



**Figure 5-10**

Les trois populations issues des clones A,B et C, convergent après 15 jours en phase stationnaire statique vers un phénotype (rouge) à croissance plus lente et à niveau de fluorescence finale plus faible qui représente au moins 97% de la population. Les phénotypes différents assimilables au phénotype de référence sont tracés en bleu. (Courbes normalisées par la valeur de saturation de la fluorescence du phénotype ancestral)

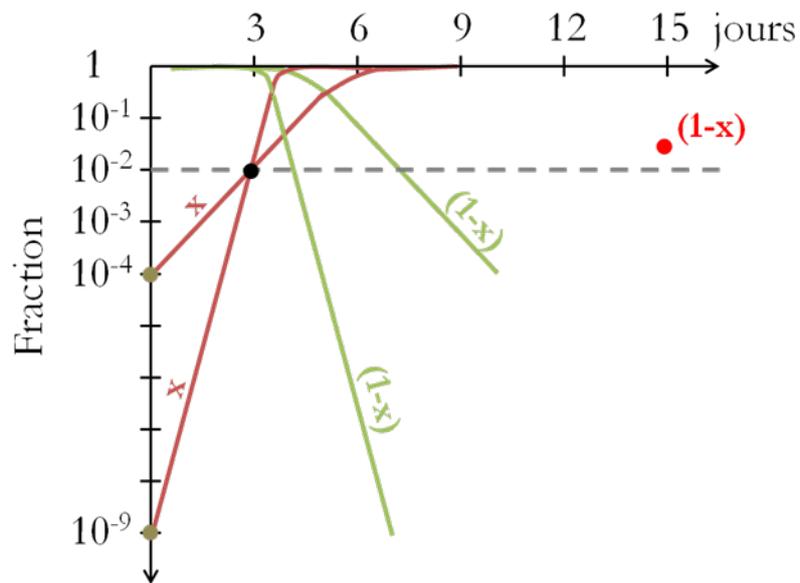
Après 15 jours de phases stationnaires, les trois expériences indépendantes en incubation statique présentent une population constituée à plus de 95% de ce phénotype identifié par les courbes de croissances plus lentes (Figure 5-10). Ces courbes correspondent toujours à la morphologie de colonie « mucoïde ». Cette convergence dans trois populations en parallèles, issues de clones différents, indique un déterminisme tout à fait inattendu. Il ne s'agit pas d'une régulation génétique. Le phénotype est conservé pendant plus de 50 générations de croissance dans un milieu riche, c'est à dire longtemps après avoir quitté les conditions dans lesquelles il est apparu. Cette « solution » semble incontournable dans la séquence environnementale envisagée. Ceci met en évidence que des processus aléatoires, ou spontanés, peuvent constituer des systèmes d'adaptation fiables car déterministes sur le nombre ou sur la durée. On retrouve une stratégie qui est comparable au « bet-hedging ». À notre connaissance, ce phénotype n'a jamais été décrit dans le contexte de la phase stationnaire prolongée. Pourtant, il est observable sur boîte de Petri avec la morphologie « mucoïde » très reconnaissable. Ceci pourrait indiquer que les conditions statiques et la structuration de l'environnement sont décisives pour son succès : il n'est jamais observé en environnement homogène.

La morphologie « mucoïde » indique que ce phénotype excrète un polymère. L'avantage sélectif associé pourrait être lié à une colonisation accrue des strates supérieures du liquide stagnant. Ionescu et al. ont montré que la production de certains exopolysaccharides chez *E. coli* était réprimé par RpoS (Ionescu et Belkin 2009). Or, les mutants *rpoS* correspondent à un type de GASP qui a été identifié. La convergence phénotypique observée pourrait être liée à une fonction silencieuse mais très bien conservée car régulièrement exploitée dans des conditions comme cette phase stationnaire dans un milieu stagnant.

Plusieurs scénarios sont possibles pour décrire cette convergence phénotypique. Concernant l'apparition du phénotype, son observation récurrente suggère un rythme d'apparition élevé. Malheureusement, nous avons travaillé avec de grandes populations initiales ( $10^9$  bactéries) donc nous ne pouvons pas préciser la fréquence d'apparition. Pour estimer l'avantage sélectif il faut évaluer à quelle vitesse le phénotype envahit la population d'origine. La taille initiale de la population est d'environ un milliard d'individus, donc la fraction minimum du phénotype émergent, un seul représentant dans la population, est  $10^{-9}$ . On pourrait aussi supposer un mécanisme de variation de phase qui maintiendrait la fraction de ce phénotype juste en dessous de notre sensibilité (1%). En considérant ces deux points de départ, si le phénotype représente 1% de la population après trois jours (Figure 5-8), on trouve que l'avantage sélectif, est compris entre 0,22 et 0,03 par heures (Figure 5-11). Dans les deux cas, un tel avantage conduit à un envahissement complet en moins de 10 jours. Or on observe encore quelques pourcents de phénotypes différents après 15 jours de phase stationnaire (Figure 5-10 et Figure 5-11). Cette situation indique que le phénotype n'a pas conservé l'avantage sélectif qui lui a permis d'augmenter sa fraction jusqu'à 1%, car, dans ce cas, il serait le seul détecté après 15 jours. Son avantage sélectif peut dépendre de la fraction qu'il représente dans la population. Il est également possible que les phénotypes encore observables aient également acquis des modifications phénotypiques qui les rendent plus compétitif et leur permettent de se maintenir au-dessus de notre seuil de détection. Le polymère synthétisé pourrait aussi bénéficier, après un certain temps, à d'autres phénotypes sans qu'ils aient à le produire.

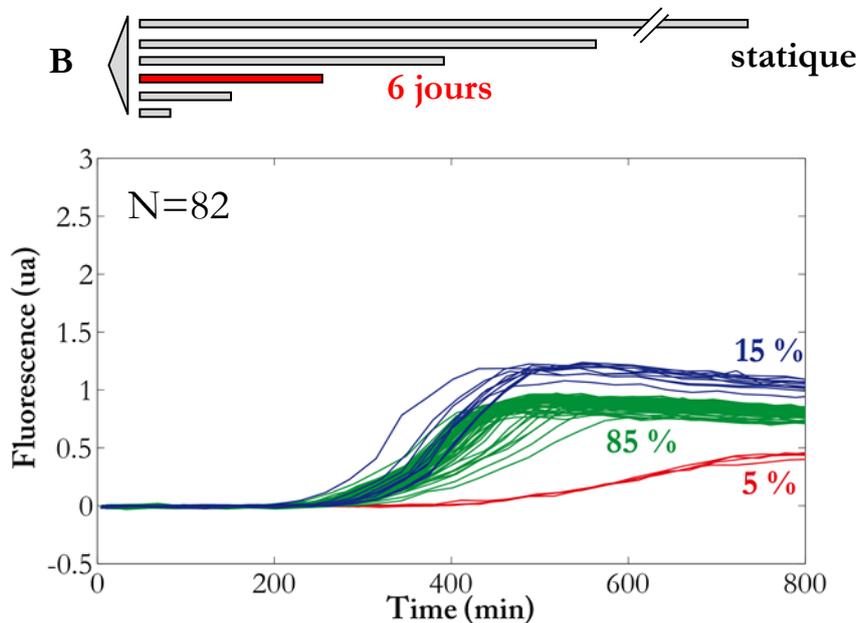
Les populations semblent converger vers un unique phénotype dans les conditions de phase stationnaire statique. Cependant, la dynamique est loin d'être répétable comme le montre les résultats des populations après 6 jours. La composition phénotypique du tube de la lignée Bs prélevé après 6 jours (Figure 5-12), révèle la présence probablement transitoire d'un autre phénotype (tracé en vert). Malgré une éventuelle convergence, la diversification se fait probablement en suivant des chemins différents dans chaque tube. Cela doit dépendre de l'émergence aléatoire de phénotypes nouveaux ou même simplement de leur localisation initiale dans l'environnement qui est hétérogène.

Alors que le « bet-hedging » est souvent présenté comme une assurance, une anticipation qui vise à se protéger d'un risque, la convergence que nous observons avec des trajectoires variées ressemble plus à une prise de risque maîtrisée. En effet, malgré de nombreux facteurs aléatoires, le phénotype finit par apparaître et par envahir la population.



**Figure 5-11**

On représente schématiquement l'évolution de la fraction,  $x$ , de phénotype « mucoïde » au cours de la phase stationnaire avec un avantage sélectif constant. On représente la fraction non-mucoïde,  $1-x$ . Deux cas sont représentés, une fraction initiale de  $10^{-4}$  et une fraction initiale de  $10^{-9}$ . L'avantage sélectif (la pente) est ajusté pour atteindre une fraction de 1% après 3 jours (point noir). Le point rouge indique l'observation à 15 jours de la fraction de phénotype non-mucoïde ( $1-x$ ) qui est de l'ordre de 2%.

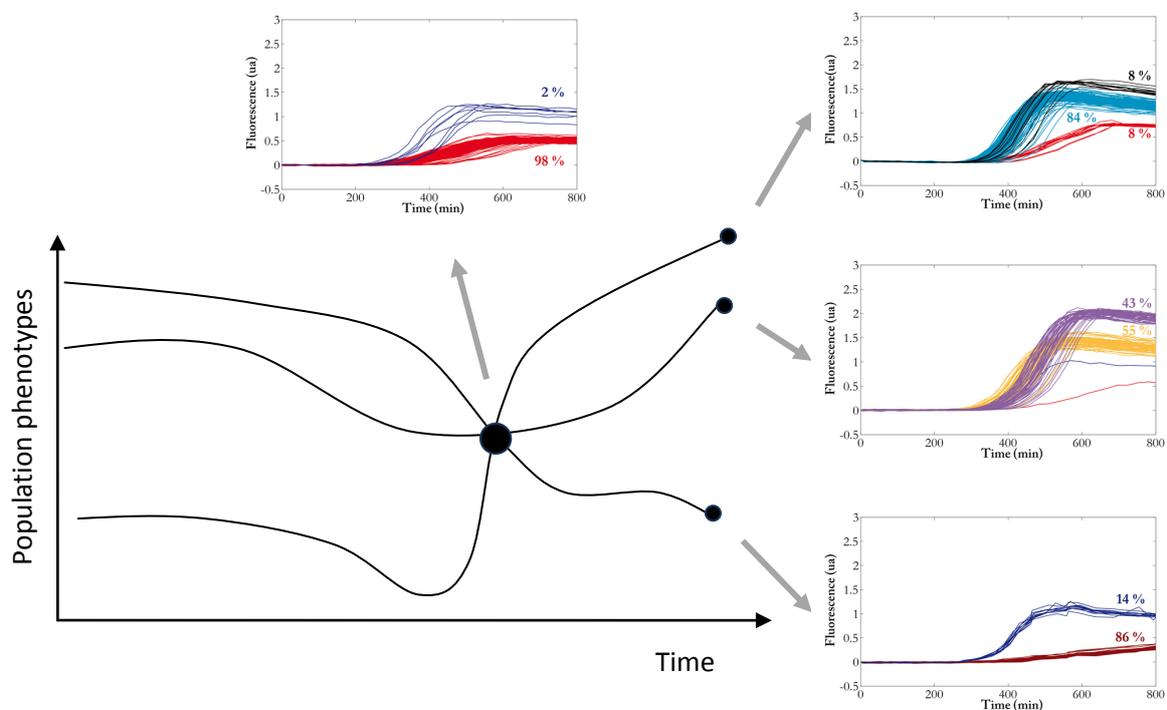


**Figure 5-12**

Phénotypage de la population issue du clone B incubée 6 jours en phase stationnaire statique. En plus du phénotype considéré comme ancestral (bleu), et du phénotype à croissance lente vers lequel les populations semblent converger (rouge), on observe un nouveau phénotype qui représente 85% de la population (vert). L'échantillon comporte 82 courbes. (Courbes normalisée par la valeur de saturation de la fluorescence du phénotype ancestral)

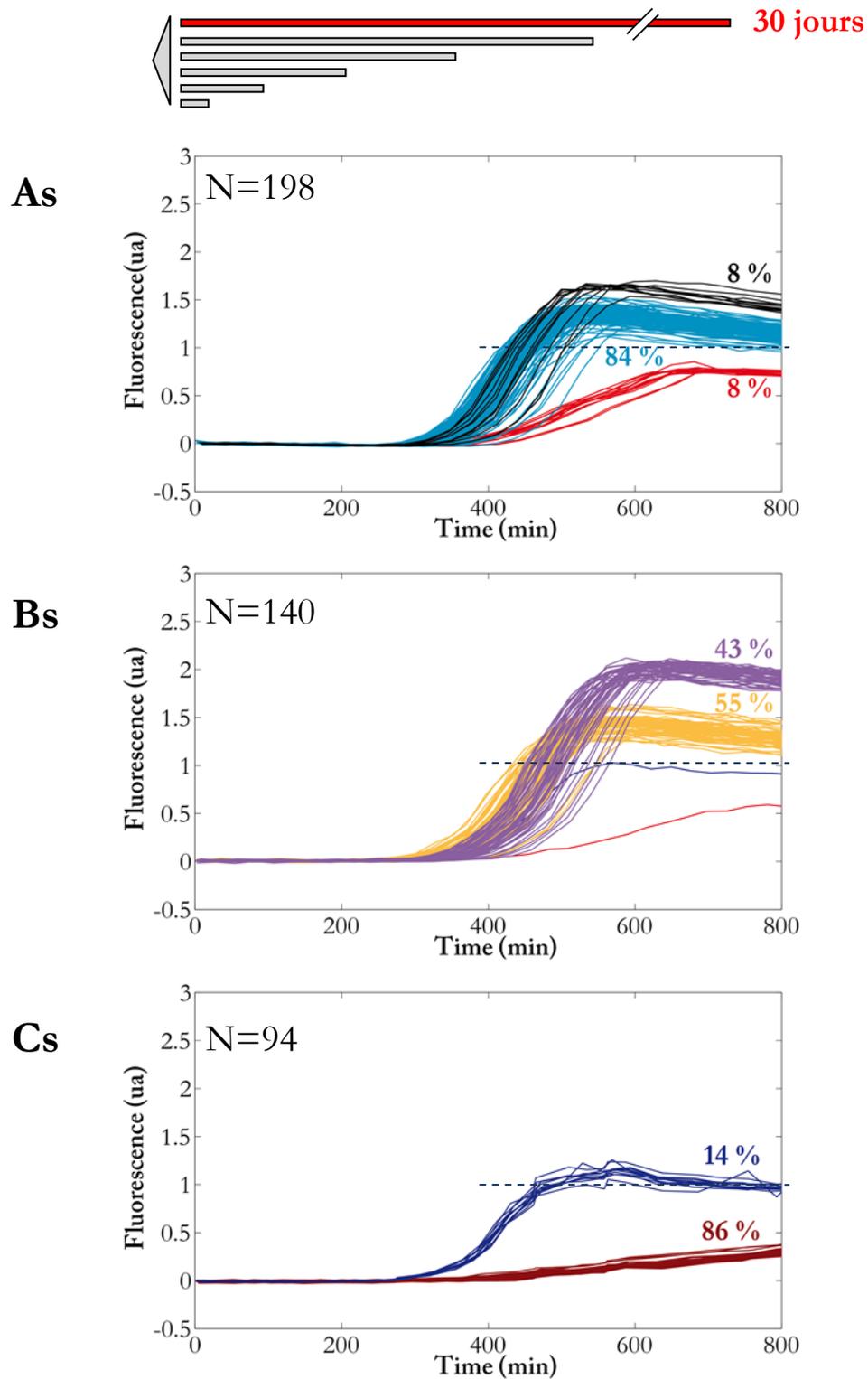
### 5.3.5 Dynamiques variables et divergence

Notre expérience se termine par l'analyse des populations après 30 jours de phase stationnaire. Les résultats suggèrent que l'adaptation ne s'arrête pas nécessairement avec la convergence vers le phénotype à croissance lente. L'environnement est modifié en continu. La population en phase stationnaire est probablement excessivement dynamique, comme suggéré par Kolter et Finkel. Ainsi sur la Figure 5-14, on observe que dans les tubes des trois lignées, As, Bs et Cs, le phénotypage donne des résultats très différents. Il y a 5 phénotypes significativement différents du phénotype initial (Phénotype initial et identification de la diversité 5.3.1). Ils sont mis en évidence avec les couleurs noir, rouge, violet, jaune et rouge foncé sur la Figure 5-14. En revanche, on observe systématiquement des classes bien distinctes dans notre espace d'observation.



**Figure 5-13**

Schéma représentant la convergence, à 15 jours, puis la divergence phénotypique observée pendant la phase stationnaire prolongée dans un environnement statique. Les graphes sont issus de la Figure 5-10 et de la Figure 5-14.



**Figure 5-14**

Les trois populations issues des clones A, B et C, analysées après 30 jours en phase stationnaire statique. Cinq phénotypes se distinguant significativement du phénotype ancestral. Le phénotype à croissance lente (mucoïde) représente encore une fraction importante dans les tubes As et Cs. (La saturation du phénotype ancestral est utilisée pour la normalisation et se situerait donc vers une valeur de fluorescence de 1, signalée par les tirets)

### 5.3.6 Relaxation en croissance exponentielle

L'adaptation à la phase stationnaire a des conséquences sur les performances de croissance des mutants dans du milieu LB frais. Ce sont ces conséquences qui rendent notre méthode d'observation de la diversité phénotypique efficace. Elles nous ont permis d'observer une partie des dynamiques de diversification qui ont lieu dans une population en phase stationnaire prolongées. Mais si la croissance en phase exponentielle est modifiée, que se passe-t-il lorsque la population sort de la phase stationnaire ?

Pour commencer à répondre à cette question nous avons relancé les populations, obtenues après trente jours, en croissance exponentielle sous agitation pendant vingt-cinq générations. La population semble converger rapidement vers un unique phénotype dominant (Figure 5-15). Les phénotypes dominants sont, comme attendu, ceux qui croissent le plus vite. Les compromis en phase stationnaire et en phase exponentielle sont différents. L'agitation homogénéise la culture et favorise la domination d'un seul phénotype. La croissance exponentielle accélère la sélection naturelle. La dynamique dans ce contexte est évidemment beaucoup plus rapide que celle de division cellulaire ou de mortalité pendant la phase stationnaire.

Le coût sélectif pour le phénotype mucoïde (rouge brun) dans la population Cs est évident. Il a totalement disparu après 25 générations. En revanche, dans le cas de la population Bs, les deux phénotypes en compétition sont plus difficiles à départager. Le phénotype dont la croissance est la plus rapide l'emporte. En effet, le phénotype majoritaire après la compétition (jaune) semble avoir un temps de détection plus court de 25 min. Cet écart peut venir du temps de latence ou d'un rythme de division plus rapide. Dans les deux cas, l'avantage sélectif qu'on peut en déduire (0,04 par génération) explique très bien le changement de composition observé en 25 générations. Le phénotype désavantagé en vitesse de croissance semble avoir un rendement plus important : saturation plus élevée. Si ce résultat est confirmé, il pourrait s'agir d'une illustration du compromis de la stratégie évolutive  $r/K$  (voir p. 24). La coexistence des deux phénotypes lors de la phase stationnaire, correspondrait à deux stratégies différentes vis-à-vis de la carence en ressources : utiliser les ressources plus vite ou les utiliser mieux.

Cette expérience sur trente jours soulève beaucoup d'interrogations et appelle de nouvelles expériences pour confirmer d'une part la convergence à moyen terme et la divergence à long terme. Isoler les phénotypes grâce au dispositif de tri de gouttes (2.2.3), et étudier comment ils « relaxent » en croissance exponentielle dans le milieu LB, devrait nous donner des informations sur la stabilité de ces phénotypes. On s'interroge notamment sur les chemins phénotypiques qui seront explorés lorsqu'on modifie la pression de sélection. Les états phénotypiques qui seront observés peuvent être très limités et correspondre à un retour vers l'état initial avant la phase stationnaire. Il est également possible, que selon ce que suggère la divergence à 30 jours, de nouvelles possibilités soient accessibles. Il ne s'agit alors plus d'un retour en arrière mais d'une nouvelle adaptation qui prolonge la divergence, ce qui constitue alors une radiation adaptative.

Le séquençage et la caractérisation moléculaire des phénotypes observés constituent également un axe très intéressant pour poursuivre ce travail.

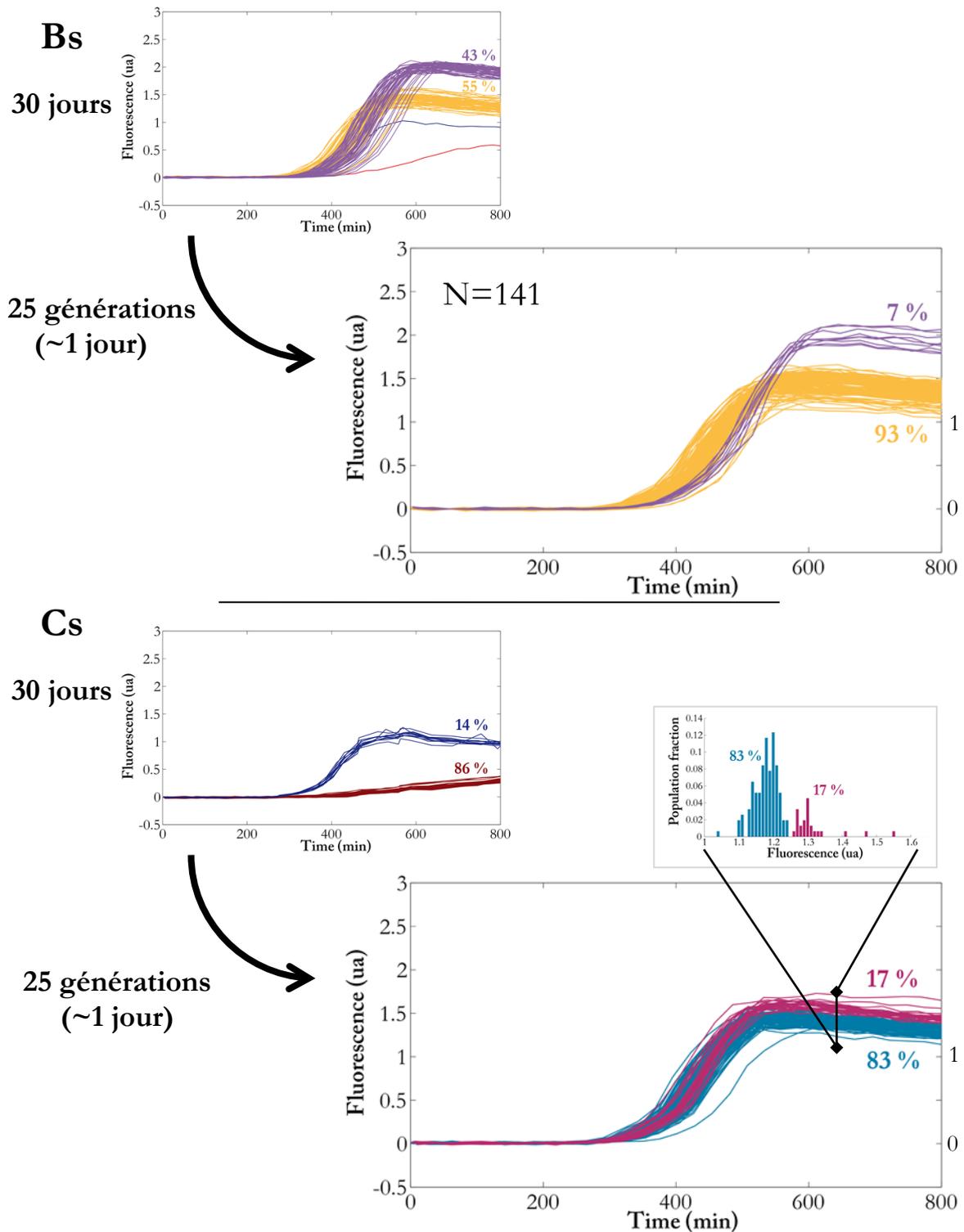


Figure 5-15

Les populations des lignées Bs (haut) et Cs (bas) sauvegardées après 30 jours de phase stationnaire statique ont été propagées pendant 25 générations dans du milieu LB frais sous agitation. Les résultats du phénotypage des populations après cette période de culture en conditions favorables sont représentés. Dans la population Bs (haut) seules les fractions des deux phénotypes en présence ont changé. Tandis que pour la population Cs, deux nouveaux phénotypes ont envahi la culture. La vignette représente l'histogramme des valeurs de fluorescence finale justifiant la distinction de deux phénotypes. (La saturation du phénotype ancestral est utilisée pour la normalisation et se situerait vers une valeur de fluorescence de 1)

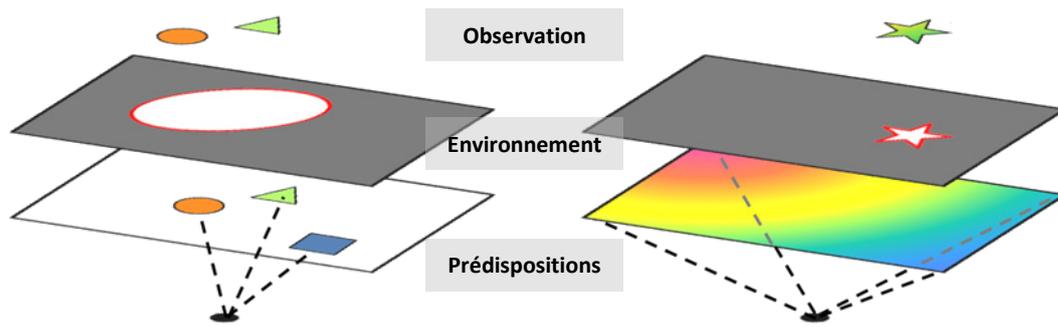
## 5.4 Conclusion

Dans ce travail exploratoire sur l'adaptation d'une population en phase stationnaire, nous avons mis en œuvre une méthode originale pour suivre la dynamique d'adaptation. Nous avons choisi de lire les conséquences de l'adaptation et la diversité phénotypique avec notre mesure simple de courbes croissances dans des gouttes.

Cette approche a permis de retrouver l'effet, connu, de la structuration de l'environnement et/ou de l'hétérogénéité des conditions, sur la diversification phénotypique.

Ensuite, l'observation systématique d'un petit nombre de classes discrètes est également un résultat significatif. Cette particularité était déjà apparue au chapitre 4 (4.3.2 p.106), mais elle semble beaucoup plus générale avec le cas de la phase stationnaire. S'agit-il d'un nombre limité de solutions accessibles en raison des contraintes intrinsèques, des prédispositions, de la population de bactéries ? Ou ces classes sont-elles plutôt la conséquence de dynamiques de sélection par l'environnement qui seraient très contraignantes ? En effet, le génome et le réseau de régulation pourraient avoir un petit nombre de modifications bénéfiques accessibles. Ou alors les contraintes environnementales, via la sélection, filtrent drastiquement le nombre de phénotypes qui peuvent émerger (Figure 5-16). Probablement les deux. Les expériences de ré-adaptation à la croissance exponentielle pourraient permettre d'évaluer la responsabilité de l'environnement et du cadre imposé par les processus de diversification.

Enfin, la dynamique observée suggère une forte convergence phénotypique lors de l'adaptation à la phase stationnaire à moyen terme. Cette convergence semble indiquer qu'une part au moins de l'adaptation est prédictible, déterministe. Peut être que cette part correspond à une mémoire dans le génome de trajectoires adaptatives déjà empruntées. L'adaptation à la phase stationnaire, c'est-à-dire l'épuisement des ressources de l'environnement, a inévitablement déjà été explorée de nombreuses fois par *E. coli*. Pour autant, les chemins empruntés vers la convergence phénotypique peuvent être très différents. Cette variabilité sur les trajectoires est probablement due aux événements aléatoires impliqués dans la diversification. Mais la convergence s'impose du fait de la force des nécessités de l'environnement et/ou des possibilités limitées permises par le bagage génétique et épigénétique. Malgré cette « focalisation » on observe ensuite une divergence (Figure 5-13). L'environnement est constamment modifié par les bactéries qu'il contient. L'adaptation n'est donc jamais au point mort.



**Figure 5-16**

Représentation de la détermination des phénotypes observables, dominée par les contraintes génétiques et épigénétiques (à gauche), ou par les contraintes environnementales (à droite).

Nous observons un petit nombre de phénotypes considérés comme adaptés. Ils sont le résultat d'une étape de création de diversité suivie d'une étape de sélection. Ces étapes sont représentées chacune par un plan. Elles sont responsables de la restriction sur la diversité finalement observée. La création de diversité a lieu grâce à l'ensemble des mécanismes de diversification présentés au chapitre 1, elle constitue un potentiel adaptatif que nous appelons « Prédispositions ». Dans le cas de gauche, cette diversité accessible est réduite à quelques états seulement et l'environnement n'a pas besoin d'être sélectif pour observer un petit nombre de phénotypes. À droite, le champ des possibilités est extrêmement vaste et continu, et c'est l'environnement et la sélection naturelle qui détermine l'observation de manière très restrictive.



# Conclusion générale

---

La mesure est un enjeu évident en science. Trouver de nouvelles manières d'enregistrer et quantifier un phénomène contribue à l'avancement de sa compréhension. Dans ces travaux de thèse, un nouveau dispositif pour l'analyse de la diversité phénotypique au sein d'une population de micro-organismes a été développé. Il permet l'acquisition d'une information simple, mais riche et quantitative, sur chaque individu d'un échantillon. Ce système de mesure a été utilisé pour suivre l'adaptation de populations d'*E. coli* sous différentes conditions de culture en laboratoire. Ces expériences ont permis de valider la pertinence de l'outil et d'étudier les dynamiques de l'adaptation.

Notre outil partage finalement de nombreuses spécificités avec la culture sur boîte de Petri. Notre outil, au prix d'un peu de technologie, offre les mêmes fonctionnalités premières : isoler et amplifier. Il permet d'isoler les bactéries et de les cultiver. La croissance constitue une étape d'amplification naturelle qui rend l'individu unique repérable et observable. On peut lire de l'information au sujet de chaque individu isolé, en observant la colonie qui en résulte. Enfin, comme sur boîte, il est possible d'extraire les colonies de son choix pour réaliser d'autres caractérisations. Mais, tout en restant simple, le dispositif millifluidique ouvre de nouvelles possibilités. Chaque colonie bien isolée peut faire l'objet de mesures quantitatives au cours du temps et dans des conditions parfaitement reproductibles. Cette caractérisation à haut-contenu et haute-résolution peut être ajustée et enrichie selon les problématiques. La composition du milieu dans les bioréacteurs peut être modifiée pour cibler certains processus, et de nombreuses techniques d'imagerie et de spectroscopie peuvent enrichir l'information acquise sur chaque réacteur. La statistique actuelle de 1000 bioréacteurs permet de détecter un phénotype qui représente 1% de la population. Mais cette limitation pourrait largement être repoussée en augmentant le nombre de réacteurs. Sans innovation majeure, il est possible de travailler avec 10 000 bioréacteurs, et on pourrait atteindre  $10^5$  en parallélisant. Plus la statistique est grande, plus il est possible de détecter des événements rares et des sous-populations plus petites.

L'instrument de mesure développé est tout à fait approprié pour l'étude de la diversité phénotypique et des processus d'adaptation. Le potentiel de l'outil pour le phénotypage a été démontré sur le cas

de la variation de phase du gène *ag43*. Nous avons montré l'identification, sans rapporteur spécifique, des deux états d'expression. L'analyse de la collection de courbes acquises sur un échantillon nous permet d'estimer avec précision la composition phénotypique. Nous avons étudié la dynamique de population de la variation de phase d'*ag43*, sur des temps longs et dans différents environnements. Nous avons ainsi mesuré, pour la première fois, l'influence de la compétition sur la composition phénotypique. L'environnement détermine les proportions des deux phénotypes, tandis que la variation de phase assure que les deux phénotypes soient toujours présents et que la fonction ne soit pas perdue.

La variation de phase du gène *ag43* semble particulière car elle implique un mécanisme moléculaire qui n'est pas le fruit du hasard. Cependant, les résultats obtenus sur la résistance à l'ampicilline et l'amplification de gène, suggère que la dynamique appliquée à *ag43* est très générale. En effet, nous avons identifié et mesuré des probabilités de duplication de gène et de délétion de copie qui assurent la présence des deux états dans la population. L'environnement et la compétition déterminent là aussi la composition de la population.

Ces dynamiques de population ne sont pas nouvelles mais nous pouvons les mesurer avec précision. Nous décrivons ainsi une phase de l'adaptation souvent négligée par rapport à l'étape de création de la diversité. Pour Ryall et Ferenci, comprendre et éventuellement prédire l'adaptation à une transition environnementale nécessite de connaître la diversité présente dans la population. Mais il faudra aussi inévitablement comprendre et mesurer l'action sélective de l'environnement sur cette diversité en amont et en aval de la transition. La vision figée et moyenne de la diversité n'est pas suffisante. Pour étendre notre gamme d'observation du spectre des mécanismes de diversification, nous pouvons augmenter le nombre de réacteurs et éventuellement adapter la lecture phénotypique. Il sera alors possible de détecter des événements plus rares ou sans effet visible sur la croissance telle que nous la mesurons.

L'exploration de la diversité phénotypique pendant l'adaptation d'une population en phase stationnaire a confirmé la nécessité de considérer l'aspect dynamique. L'hétérogénéité de l'environnement influe aussi radicalement sur la diversification. Les résultats suggèrent une forte convergence phénotypique après quinze jours, puis une divergence après trente jours. L'adaptation à la phase stationnaire est probablement beaucoup explorée par *E. coli*. La part déterministe que représente la convergence n'est donc pas totalement surprenante. Ce déterminisme peut s'expliquer soit par une extrême spécificité imposée par les conditions environnementales, soit par une fréquence d'apparition plus élevée pour le phénotype de convergence. Ce dernier cas renvoie à nouveau à la dynamique décrite pour la variation de phase et l'amplification de gène. La fin de l'expérience fait apparaître une divergence phénotypique. C'est le signe que l'on commence à sonder un régime différent. Celui-ci fait probablement intervenir des événements de diversification plus rares. Les solutions évidentes et réversibles sont épuisées, ce serait le début de l'évolution. Pour comprendre cette dynamique de population, l'analyse génétique et fonctionnelle apportera de précieuses informations. Faire varier la taille des populations et explorer l'évolution des phénotypes émergents relancés en phase exponentielle, après les avoir isolés, aidera à élucider la nature des mécanismes en jeu.

# Bibliographie

---

- Aertsen, Abram, et Chris W Michiels. 2005. « Diversify or Die: Generation of Diversity in Response to Stress ». *Critical Reviews in Microbiology* 31 (2) (janvier): 69-78. doi:10.1080/10408410590921718.
- Alon, Uri. 2007. *An introduction to systems biology: design principles of biological circuits*. Chapman & Hall/CRC mathematical and computational biology series 10. Boca Raton, FL: Chapman & Hall/CRC.
- Anderson, G. G. 2003. « Intracellular Bacterial Biofilm-Like Pods in Urinary Tract Infections ». *Science* 301 (5629) (juillet 4): 105-107. doi:10.1126/science.1084550.
- Andersson, Dan I., et Diarmaid Hughes. 2009. « Gene Amplification and Adaptive Evolution in Bacteria ». *Annual Review of Genetics* 43 (1) (décembre): 167-195. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134805.
- Andrewes, F. W. 1922. « Studies in group-agglutination I. The salmonella group and its antigenic structure ». *The Journal of Pathology and Bacteriology* 25 (4): 505-521. doi:10.1002/path.1700250411.
- Balaban, Nathalie Q., Jack Merrin, Remy Chait, Lukasz Kowalik, et Stanislas Leibler. 2004. « Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch ». *Science* 305 (5690) (octobre 9): 1622-1625. doi:10.1126/science.1099390.
- Baraban, Larysa, Fabien Bertholle, Merijn L. M. Salverda, Nicolas Bremond, Pascal Panizza, Jean Baudry, J. Arjan G. M. de Visser, et Jérôme Bibette. 2011. « Millifluidic droplet analyser for microbiology ». *Lab on a Chip* 11 (23): 4057. doi:10.1039/c1lc20545e.
- Baroud, Charles N., Francois Gallaire, et Rémi Dangla. 2010. « Dynamics of microfluidic droplets ». *Lab on a Chip* 10 (16): 2032. doi:10.1039/c001191f.
- Battesti, Aurelia, Nadim Majdalani, et Susan Gottesman. 2011. « The RpoS-Mediated General Stress Response in *Escherichia coli* \* ». *Annual Review of Microbiology* 65 (1) (octobre 13): 189-213. doi:10.1146/annurev-micro-090110-102946.
- Beaumont, Hubertus J. E., Jenna Gallie, Christian Kost, Gayle C. Ferguson, et Paul B. Rainey. 2009. « Experimental evolution of bet hedging ». *Nature* 462 (7269) (novembre 5): 90-93. doi:10.1038/nature08504.
- Becker, Holger, et Claudia Gärtner. 2000. « Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications ». *Electrophoresis* 21 (1) (janvier 1): 12-26. doi:10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<12::AID-ELPS12>3.0.CO;2-7.
- Bertholle, Fabien. 2010. « Milli-fluidique digitale pour la microbiologie ».
- Bjedov, Ivana, Olivier Tenaillon, Bénédicte Gérard, Valeria Souza, Erick Denamur, Miroslav Radman, François Taddei, et Ivan Matic. 2003. « Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria ». *Science* 300 (5624) (mai 30): 1404-1409. doi:10.1126/science.1082240.

- Blattner, F R, G Plunkett 3rd, C A Bloch, N T Perna, V Burland, M Riley, J Collado-Vides, et al. 1997. « The Complete Genome Sequence of Escherichia Coli K-12 ». *Science (New York, N.Y.)* 277 (5331) (septembre 5): 1453-1462.
- Blount, Zachary D., Christina Z. Borland, et Richard E. Lenski. 2008. « Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of Escherichia coli ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (23): 7899–7906.
- Boitard, L., D. Cottinet, C. Kleinschmitt, N. Bremond, J. Baudry, G. Yvert, et J. Bibette. 2012. « Monitoring Single-Cell Bioenergetics via the Coarsening of Emulsion Droplets ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* (avril 25). doi:10.1073/pnas.1200894109. <http://www.pnas.org/content/early/2012/04/24/1200894109>.
- Boyce, Mark S. 1984. « Restitution of r- and K-Selection as a Model of Density-Dependent Natural Selection ». *Annual Review of Ecology and Systematics* 15 (janvier 1): 427-447. doi:10.2307/2096955.
- Bud, Robert. 2007. *Penicillin: triumph and tragedy*. Oxford: Oxford University Press.
- Cao, Jialan, Dana Kürsten, Steffen Schneider, Andrea Knauer, P. Mike Günther, et J. Michael Köhler. 2012. « Uncovering toxicological complexity by multi-dimensional screenings in microsegmented flow: modulation of antibiotic interference by nanoparticles ». *Lab on a Chip* 12 (3): 474. doi:10.1039/c1lc20584f.
- Casadesus, J., et D. Low. 2006. « Epigenetic Gene Regulation in the Bacterial World ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (3) (septembre 7): 830-856. doi:10.1128/MMBR.00016-06.
- Chalfie, M, Y Tu, G Euskirchen, W. Ward, et D. Prasher. 1994. « Green fluorescent protein as a marker for gene expression ». *Science* 263 (5148) (février 11): 802-805. doi:10.1126/science.8303295.
- Chauhan, Ashwini, Chizuko Sakamoto, Jean-Marc Ghigo, et Christophe Beloin. 2013. « Did I Pick the Right Colony? Pitfalls in the Study of Regulation of the Phase Variable Antigen 43 Adhesin ». Édité par Szabolcs Semsey. *PLoS ONE* 8 (9) (septembre 5): e73568. doi:10.1371/journal.pone.0073568.
- Choi, Kihwan, Alphonsus H.C. Ng, Ryan Fobel, et Aaron R. Wheeler. 2012. « Digital Microfluidics ». *Annual Review of Analytical Chemistry* 5 (1) (juillet 19): 413-440. doi:10.1146/annurev-anchem-062011-143028.
- Chu, Qianli, Marvin S. Yu, et Dennis P. Curran. 2007. « New fluoruous/organic biphasic systems achieved by solvent tuning ». *Tetrahedron* 63 (39) (septembre): 9890-9895. doi:10.1016/j.tet.2007.06.092.
- Cooper, Vaughn S., et Richard E. Lenski. 2000. « The Population Genetics of Ecological Specialization in Evolving Escherichia Coli Populations ». *Nature* 407 (6805) (octobre 12): 736-739. doi:10.1038/35037572.
- Craig, William A., Sujata M. Bhavnani, et Paul G. Ambrose. 2004. « The inoculum effect: Fact or artifact? ». *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 50 (4) (décembre): 229-230. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2004.07.006.
- Da Re, S., B. Le Quere, J.-M. Ghigo, et C. Beloin. 2007. « Tight Modulation of Escherichia coli Bacterial Biofilm Formation through Controlled Expression of Adhesion Factors ». *Applied and Environmental Microbiology* 73 (10) (mars 23): 3391-3403. doi:10.1128/AEM.02625-06.
- Danchin, Étienne, Anne Charmantier, Frances A. Champagne, Alex Mesoudi, Benoit Pujol, et Simon Blanchet. 2011. « Beyond DNA: integrating inclusive inheritance into an extended theory of evolution ». *Nature Reviews Genetics* 12 (7) (juin 17): 475-486. doi:10.1038/nrg3028.
- David, Lior, Elad Stolovicki, Efrat Haziz, et Erez Braun. 2010. « Inherited adaptation of genome-rewired cells in response to a challenging environment ». *HFSP Journal* 4 (3-4) (juin): 131-141. doi:10.2976/1.3353782.
- Davies, J., et D. Davies. 2010. « Origins and Evolution of Antibiotic Resistance ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74 (3) (août 30): 417-433. doi:10.1128/MMBR.00016-10.

- Dawkins, Richard. 2003. *Le gène égoïste*. Paris: O. Jacob.
- De Menech, M., P. Garstecki, F. Jousse, et H. A. Stone. 2008. « Transition from squeezing to dripping in a microfluidic T-shaped junction ». *Journal of Fluid Mechanics* 595 (janvier 8). doi:10.1017/S002211200700910X. [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S002211200700910X](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S002211200700910X).
- Diderichsen, B. 1980. « flu, a metastable gene controlling surface properties of Escherichia coli. » *Journal of bacteriology* 141 (2): 858–867.
- Dubnau, David, et Richard Losick. 2006. « Bistability in bacteria ». *Molecular Microbiology* 61 (3) (août): 564-572. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05249.x.
- Elena, Santiago F., et Richard E. Lenski. 2003. « Microbial genetics: Evolution experiments with microorganisms: the dynamics and genetic bases of adaptation ». *Nature Reviews Genetics* 4 (6) (juin): 457-469. doi:10.1038/nrg1088.
- Elowitz, M. B. 2002. « Stochastic Gene Expression in a Single Cell ». *Science* 297 (5584) (août 16): 1183-1186. doi:10.1126/science.1070919.
- Elowitz, Michael B., et Stanislas Leibler. 1999. « A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators ». *J. Biol. Chem* 274: 6074–6079.
- Engl, W., M. Tachibana, P. Panizza, et R. Backov. 2007. « Millifluidic as a versatile reactor to tune size and aspect ratio of large polymerized objects ». *International Journal of Multiphase Flow* 33 (8) (août): 897-903. doi:10.1016/j.ijmultiphaseflow.2007.03.007.
- Engl, Wilfried, Matthieu Roche, Annie Colin, Pascal Panizza, et Armand Ajdari. 2005. « Droplet Traffic at a Simple Junction at Low Capillary Numbers ». *Physical Review Letters* 95 (20) (novembre). doi:10.1103/PhysRevLett.95.208304. <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.95.208304>.
- Ferenci, T., Z. Zhou, T. Betteridge, Y. Ren, Y. Liu, L. Feng, P. R. Reeves, et L. Wang. 2009. « Genomic Sequencing Reveals Regulatory Mutations and Recombinational Events in the Widely Used MC4100 Lineage of Escherichia coli K-12 ». *Journal of Bacteriology* 191 (12) (avril 17): 4025-4029. doi:10.1128/JB.00118-09.
- Ferenci, Thomas. 2005. « Maintaining a healthy SPANC balance through regulatory and mutational adaptation: Stress resistance and metabolic capability ». *Molecular Microbiology* 57 (1) (juillet): 1-8. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04649.x.
- Finkel, Steven E. 2006. « Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype ». *Nature Reviews Microbiology* 4 (2) (février): 113-120. doi:10.1038/nrmicro1340.
- Fraser, Dawn, et Mads Kaern. 2009. « A chance at survival: gene expression noise and phenotypic diversification strategies ». *Molecular Microbiology* 71 (6) (mars): 1333-1340. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06605.x.
- Funfak, Anette, Regina Hartung, Jialan Cao, Karin Martin, Karl-Heinz Wiesmüller, Otto S. Wolfbeis, et J. Michael Köhler. 2009. « Highly resolved dose–response functions for drug-modulated bacteria cultivation obtained by fluorometric and photometric flow-through sensing in microsegmented flow ». *Sensors and Actuators B: Chemical* 142 (1) (octobre): 66-72. doi:10.1016/j.snb.2009.07.017.
- Gullberg, Erik, Sha Cao, Otto G. Berg, Carolina Ilbäck, Linus Sandegren, Diarmaid Hughes, et Dan I. Andersson. 2011. « Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations ». Édité par Marc Lipsitch. *PLoS Pathogens* 7 (7) (juillet 21): e1002158. doi:10.1371/journal.ppat.1002158.
- Hall, Barry G. 2004. « Predicting the evolution of antibiotic resistance genes ». *Nat Rev Micro* 2 (5) (mai): 430-435. doi:10.1038/nrmicro888.
- Hegreness, M. 2006. « An Equivalence Principle for the Incorporation of Favorable Mutations in Asexual Populations ». *Science* 311 (5767) (mars 17): 1615-1617. doi:10.1126/science.1122469.

- Henderson, Ian R, Mary Meehan, et Peter Owen. 1997. « Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12 ». *FEMS Microbiology Letters* 149 (1) (avril): 115-120. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10317.x.
- Henderson, Ian R., Peter Owen, et James P. Nataro. 1999. « Molecular switches—the ON and OFF of bacterial phase variation ». *Molecular microbiology* 33 (5): 919–932.
- Holmes, David, et Shady Gawad. 2010. « The Application of Microfluidics in Biology ». In *Microengineering in Biotechnology*, édité par Michael P. Hughes et Kai F. Hoettges, 583:55-80. Methods in Molecular Biology. Humana Press. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-106-6\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-106-6_2).
- Holtze, C., A. C. Rowat, J. J. Agresti, J. B. Hutchison, F. E. Angilè, C. H. J. Schmitz, S. Köster, et al. 2008. « Biocompatible surfactants for water-in-fluorocarbon emulsions ». *Lab on a Chip* 8 (10): 1632. doi:10.1039/b806706f.
- Hutchison, C. A. 2007. « DNA sequencing: bench to bedside and beyond ». *Nucleic Acids Research* 35 (18) (août 28): 6227-6237. doi:10.1093/nar/gkm688.
- Ionescu, Michael, et Shimshon Belkin. 2009. « Overproduction of Exopolysaccharides by an *Escherichia coli* K-12 *rpoS* Mutant in Response to Osmotic Stress ». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (2) (janvier 15): 483-492. doi:10.1128/AEM.01616-08.
- Ishihama, Akira. 1997. « Adaptation of gene expression in stationary phase bacteria ». *Current Opinion in Genetics & Development* 7 (5) (octobre): 582-588. doi:10.1016/S0959-437X(97)80003-2.
- Jablonka, Eva. 2013. « Epigenetic inheritance and plasticity: The responsive germline ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 111 (2-3) (avril): 99-107. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2012.08.014.
- Jacob, F, et J Monod. 1961. « Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins ». *Journal of Molecular Biology* 3 (juin): 318-356.
- Kaneko, Kunihiko. 2009. « Relationship among phenotypic plasticity, phenotypic fluctuations, robustness, and evolvability; Waddington's legacy revisited under the spirit of Einstein ». *Journal of biosciences* 34 (4): 529–542.
- Kashiwagi, Akiko, Itaru Urabe, Kunihiko Kaneko, et Tetsuya Yomo. 2006. « Adaptive Response of a Gene Network to Environmental Changes by Fitness-Induced Attractor Selection ». Édité par Sui Huang. *PLoS ONE* 1 (1) (décembre 20): e49. doi:10.1371/journal.pone.0000049.
- Kassen, R. 2002. « The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity ». *Journal of Evolutionary Biology* 15 (2): 173–190.
- Kassen, Rees. 2009. « Toward a General Theory of Adaptive Radiation: Insights from Microbial Experimental Evolution ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1168 (1) (juin): 3-22. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04574.x.
- Kawecki, Tadeusz J., Richard E. Lenski, Dieter Ebert, Brian Hollis, Isabelle Olivieri, et Michael C. Whitlock. 2012. « Experimental evolution ». *Trends in Ecology & Evolution* 27 (10) (octobre): 547-560. doi:10.1016/j.tree.2012.06.001.
- Kintsès, Balint, Liisa D van Vliet, Sean RA Devenish, et Florian Hollfelder. 2010. « Microfluidic droplets: new integrated workflows for biological experiments ». *Current Opinion in Chemical Biology* 14 (5) (octobre): 548-555. doi:10.1016/j.cbpa.2010.08.013.
- Klemm, Per, Louise Hjerrild, Morten Gjermansen, et Mark A. Schembri. 2003. « Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*: Ag43 family of autotransporters from *E. coli* ». *Molecular Microbiology* 51 (1) (novembre 18): 283-296. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03833.x.
- Kovárová-Kovar, Karin, et Thomas Egli. 1998. « Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics ». *Microbiology and molecular biology reviews* 62 (3): 646–666.

- Kümmerer, K., et A. Henninger. 2003. « Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent ». *Clinical Microbiology and Infection* 9 (12): 1203–1214.
- Laureti, Luisa, Ivan Matic, et Arnaud Gutierrez. 2013. « Bacterial Responses and Genome Instability Induced by Subinhibitory Concentrations of Antibiotics ». *Antibiotics* 2 (1) (mars 14): 100-114. doi:10.3390/antibiotics2010100.
- Lenski, Richard. 2004. « Phenotypic and Genomic Evolution during a 20,000-Generation Experiment with the Bacterium *Escherichia coli* ». In *Plant Breeding Reviews Vol.-24 Part 2: Long-Term Selection : Crops, Animals, and Bacteria*. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Levert, Maxime, Oana Zamfir, Olivier Clermont, Odile Bouvet, Sylvain Lespinats, Marie Claire Hipeaux, Catherine Branger, et al. 2010. « Molecular and Evolutionary Bases of Within-Patient Genotypic and Phenotypic Diversity in *Escherichia coli* Extraintestinal Infections ». Édité par François Balloux. *PLoS Pathogens* 6 (9) (septembre 30): e1001125. doi:10.1371/journal.ppat.1001125.
- Lewis, Kim. 2006. « Persister cells, dormancy and infectious disease ». *Nature Reviews Microbiology* 5 (1) (décembre 4): 48-56. doi:10.1038/nrmicro1557.
- Lim, Han N, et Alexander van Oudenaarden. 2007. « A multistep epigenetic switch enables the stable inheritance of DNA methylation states ». *Nature Genetics* 39 (2) (janvier 14): 269-275. doi:10.1038/ng1956.
- Lombardo, Mary-Jane, Ildiko Aponyi, et Susan M. Rosenberg. 2004. « General stress response regulator RpoS in adaptive mutation and amplification in *Escherichia coli* ». *Genetics* 166 (2): 669–680.
- Luria, Salvador E., et Max Delbrück. 1943. « Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance ». *Genetics* 28 (6): 491.
- Lutz, Rolf, et Hermann Bujard. 1997. « Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements ». *Nucleic acids research* 25 (6): 1203–1210.
- Macarron, Ricardo, Martyn N. Banks, Dejan Bojanic, David J. Burns, Dragan A. Cirovic, Tina Garyantes, Darren V. S. Green, et al. 2011. « Impact of high-throughput screening in biomedical research ». *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (3) (mars 1): 188-195. doi:10.1038/nrd3368.
- Maharjan, R. 2006. « Clonal Adaptive Radiation in a Constant Environment ». *Science* 313 (5786) (juillet 28): 514-517. doi:10.1126/science.1129865.
- Martinez, J. L., et F. Baquero. 2000. « Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44 (7) (juillet 1): 1771-1777. doi:10.1128/AAC.44.7.1771-1777.2000.
- Maynard Smith, John, et Eörs Szathmáry. 1997. *The Major Transitions in Evolution*. Oxford; New York: Oxford University Press.
- Mayr, Ernst. 1983. « How to Carry Out the Adaptationist Program? » *The American Naturalist* 121 (3) (mars 1): 324-334. doi:10.2307/2461153.
- Monod, Jacques. 1949. « The growth of bacterial cultures ». *Annual Reviews in Microbiology* 3 (1): 371–394.
- Najah, Majdi, Andrew D. Griffiths, et Michael Ryckelynck. 2011. « Teaching Single-Cell Digital Analysis Using Droplet-Based Microfluidics ». *Analytical Chemistry* 84 (3) (décembre 15): 1202-1209. doi:10.1021/ac202645m.
- Ni, Ming, Antoine L. Decrulle, Fanette Fontaine, Alice Demarez, Francois Taddei, et Ariel B. Lindner. 2012. « Pre-Disposition and Epigenetics Govern Variation in Bacterial Survival upon Stress ». Édité par Diarmaid Hughes. *PLoS Genetics* 8 (12) (décembre 20): e1003148. doi:10.1371/journal.pgen.1003148.
- Novick, Aaron, et Milton Weiner. 1957. « Enzyme induction as an all-or-none phenomenon ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 43 (7): 553.

- Ohno, Ken-ichi, Kaoru Tachikawa, et Andreas Manz. 2008. « Microfluidics: applications for analytical purposes in chemistry and biochemistry ». *Electrophoresis* 29 (22): 4443–4453.
- Oliver, James D. 2009. « Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria ». *FEMS Microbiology Reviews* (décembre). doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x>.
- Owen, Peter, Mary Meehan, Helen Loughry-Doherty, et Ian Henderson. 1996. « Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli* ». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 16 (2) (décembre): 63-76. doi:10.1111/j.1574-695X.1996.tb00124.x.
- Ozbudak, Ertugrul M., Mukund Thattai, Iren Kurtser, Alan D. Grossman, et Alexander van Oudenaarden. 2002. « Regulation of noise in the expression of a single gene ». *Nature Genetics* 31 (1) (avril 22): 69-73. doi:10.1038/ng869.
- Palmer, Adam C., et Roy Kishony. 2013. « Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance ». *Nat Rev Genet* 14 (4) (avril): 243-248. doi:10.1038/nrg3351.
- Papp, Balázs, Bas Teusink, et Richard A. Notebaart. 2009. « A critical view of metabolic network adaptations ». *HFSP Journal* 3 (1) (février): 24-35. doi:10.2976/1.3020599.
- Pembrey, Marcus E. 2002. « Time to take epigenetic inheritance seriously ». *European Journal of Human Genetics* 10 (11) (octobre 29): 669-671. doi:10.1038/sj.ejhg.5200901.
- Perron, G. G., M. Zasloff, et G. Bell. 2006. « Experimental evolution of resistance to an antimicrobial peptide ». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273 (1583) (janvier 22): 251-256. doi:10.1098/rspb.2005.3301.
- Peters, J. E., T. E. Thate, et N. L. Craig. 2003. « Definition of the *Escherichia coli* MC4100 Genome by Use of a DNA Array ». *Journal of Bacteriology* 185 (6) (mars 15): 2017-2021. doi:10.1128/JB.185.6.2017-2021.2003.
- Prescott, Lansing M, John P Harley, et Donald A Klein. 2003. *Microbiologie*. Bruxelles: De Boeck.
- Rainey, Paul B., et Michael Travisano. 1998. « Adaptive Radiation in a Heterogeneous Environment ». *Nature* 394 (6688) (juillet 2): 69-72. doi:10.1038/27900.
- Raser, J. M. 2004. « Control of Stochasticity in Eukaryotic Gene Expression ». *Science* 304 (5678) (juin 18): 1811-1814. doi:10.1126/science.1098641.
- Record Jr, M.Thomas, Elizabeth S. Courtenay, D.Scott Cayley, et Harry J. Guttman. 1998. « Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water ». *Trends in Biochemical Sciences* 23 (4) (avril 1): 143-148. doi:10.1016/S0968-0004(98)01196-7.
- Rozzak, D B, et R R Colwell. 1987. « Survival strategies of bacteria in the natural environment. » *Microbiological Reviews* 51 (3) (septembre): 365-379.
- Ryall, Ben, Gustavo Eydollin, et Thomas Ferenci. 2012. « Culture history and population heterogeneity as determinants of bacterial adaptation: the adaptomics of a single environmental transition ». *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 76 (3) (septembre): 597-625. doi:10.1128/MMBR.05028-11.
- Salgado, Heladia, Alberto Santos-Zavaleta, Socorro Gama-Castro, Martín Peralta-Gil, Mónica I. Peñaloza-Spínola, Agustino Martínez-Antonio, Peter D. Karp, et Julio Collado-Vides. 2006. « The comprehensive updated regulatory network of *Escherichia coli* K-12 ». *BMC bioinformatics* 7 (1): 5.
- Salverda, Merijn L. M., Eynat Dellus, Florian A. Gorter, Alfons J. M. Debets, John van der Oost, Rolf F. Hoekstra, Dan S. Tawfik, et J. Arjan G. M. de Visser. 2011. « Initial Mutations Direct Alternative Pathways of Protein Evolution ». *PLoS Genet* 7 (3) (mars 3): e1001321. doi:10.1371/journal.pgen.1001321.
- Sandegren, Linus, et Dan I. Andersson. 2009. « Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance ». *Nature Reviews Microbiology* 7 (8) (août): 578-588. doi:10.1038/nrmicro2174.

- Seger, Jon, et H. Jane Brockmann. 1987. « What is bet-hedging ? » In *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 4:182-211. Oxford University Press.
- Shimomura, Osamu, Frank H. Johnson, et Yo Saiga. 1962. « Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, Aequorea ». *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (3) (juin): 223-239. doi:10.1002/jcp.1030590302.
- Silva-Rocha, Rafael, et Víctor de Lorenzo. 2010. « Noise and Robustness in Prokaryotic Regulatory Networks ». *Annual Review of Microbiology* 64 (1) (octobre 13): 257-275. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073229.
- Smith, John Maynard. 2001. *La construction du vivant: gènes, embryons et évolution*. Paris: Cassini.
- Tabeling, Patrick. 2003. *Introduction à la microfluidique*. Paris: Belin.
- Tang, Sindy K. Y., Zhenyu Li, Adam R. Abate, Jeremy J. Agresti, David A. Weitz, Demetri Psaltis, et George M. Whitesides. 2009. « A multi-color fast-switching microfluidic droplet dye laser ». *Lab on a Chip* 9 (19): 2767. doi:10.1039/b914066b.
- Tang, Sindy KY, et George M. Whitesides. 2009. « Basic Microfluidic and Soft Lithographic Techniques ». <http://www2.egr.uh.edu/~nvaradar/private/Refs/Litho.pdf>.
- Taniguchi, Y., P. J. Choi, G.-W. Li, H. Chen, M. Babu, J. Hearn, A. Emili, et X. S. Xie. 2010. « Quantifying E. coli Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells ». *Science* 329 (5991) (juillet 29): 533-538. doi:10.1126/science.1188308.
- Tawfik, Dan S., et Andrew D. Griffiths. 1998. « Man-made cell-like compartments for molecular evolution ». *Nature Biotechnology* 16 (7) (juillet): 652-656. doi:10.1038/nbt0798-652.
- Taylor, G. 1953. « Dispersion of Soluble Matter in Solvent Flowing Slowly through a Tube ». *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* 219 (1137) (août 25): 186-203. doi:10.1098/rspa.1953.0139.
- Teillant, Aude, et Mathilde Reynaudi. 2012. « Les bactéries résistantes aux antibiotiques ». *La note d'analyse*, novembre, n°299 édition.
- Touchon, Marie, Claire Hoede, Olivier Tenaillon, Valérie Barbe, Simon Baeriswyl, Philippe Bidet, Edouard Bingen, et al. 2009. « Organised Genome Dynamics in the Escherichia coli Species Results in Highly Diverse Adaptive Paths ». Édité par Josep Casadesús. *PLoS Genetics* 5 (1) (janvier 23): e1000344. doi:10.1371/journal.pgen.1000344.
- Tsien, Roger Y. 1998. « THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN ». *Annual Review of Biochemistry* 67 (1) (juin): 509-544. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.509.
- Ulett, G. C., J. Valle, C. Beloin, O. Sherlock, J.-M. Ghigo, et M. A. Schembri. 2007. « Functional Analysis of Antigen 43 in Uropathogenic Escherichia coli Reveals a Role in Long-Term Persistence in the Urinary Tract ». *Infection and Immunity* 75 (7) (avril 9): 3233-3244. doi:10.1128/IAI.01952-06.
- Van der Woude, Marjan W, et Ian R Henderson. 2008. « Regulation and function of Ag43 (flu) ». *Annual review of microbiology* 62: 153-169. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162938.
- Van Der Woude, Marjan W., et Andreas J. Bäumlér. 2004. « Phase and antigenic variation in bacteria ». *Clinical microbiology reviews* 17 (3): 581-611.
- Veening, Jan-Willem, Wiep Klaas Smits, et Oscar P. Kuipers. 2008. « Bistability, Epigenetics, and Bet-Hedging in Bacteria ». *Annual Review of Microbiology* 62 (1) (octobre): 193-210. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.163002.
- Waddington, C. H. 1953. « Genetic Assimilation of an Acquired Character ». *Evolution* 7 (2) (juin 1): 118-126. doi:10.2307/2405747.
- Wallecha, Anu, Jason Correnti, Vincent Munster, et Marjan van der Woude. 2003. « Phase Variation of Ag43 Is Independent of the Oxidation State of OxyR ». *Journal of Bacteriology* 185 (7) (janvier 4): 2203-2209. doi:10.1128/JB.185.7.2203-2209.2003.
- Wang, K., Y. Lu, K. Qin, G. Luo, et T. Wang. 2013. « Generating Gas-Liquid-Liquid Three-Phase Microflows in a Cross-Junction Microchannel Device ». *Chemical Engineering & Technology* 36 (6) (juin): 1047-1060. doi:10.1002/ceat.201200561.

- Whitesides, George M. 2006. « The origins and the future of microfluidics ». *Nature* 442 (7101) (juillet 27): 368-373. doi:10.1038/nature05058.
- Whitesides, George M., Emanuele Ostuni, Shuichi Takayama, Xingyu Jiang, et Donald E. Ingber. 2001. « Soft lithography in biology and biochemistry ». *Annual review of biomedical engineering* 3 (1): 335–373.
- « Wikipédia:Accueil principal ». 2013. *Wikipedia, the free encyclopedia*.  
[http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Wikip%C3%A9dia:Accueil\\_principal&oldid=89671697](http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Wikip%C3%A9dia:Accueil_principal&oldid=89671697).
- Wisniewski-Dyé, Florence, et Ludovic Vial. 2008. « Phase and antigenic variation mediated by genome modifications ». *Antonie van Leeuwenhoek* 94 (4) (juillet 29): 493-515.  
 doi:10.1007/s10482-008-9267-6.
- Wright, Gerard D. 2007. « The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity ». *Nature Reviews Microbiology* 5 (3) (mars): 175-186. doi:10.1038/nrmicro1614.
- Young, Jonathan W, James C W Locke, Alphan Altinok, Nitzan Rosenfeld, Tigran Bacarian, Peter S Swain, Eric Mjolsness, et Michael B Elowitz. 2011. « Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy ». *Nature Protocols* 7 (1) (décembre 15): 80-88. doi:10.1038/nprot.2011.432.
- Yurtsev, Eugene A, Hui Xiao Chao, Manoshi S Datta, Tatiana Artemova, et Jeff Gore. 2013. « Bacterial cheating drives the population dynamics of cooperative antibiotic resistance plasmids ». *Molecular Systems Biology* 9 (août 6). doi:10.1038/msb.2013.39.  
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/msb.2013.39>.
- Zambrano, María Mercedes, et Roberto Kolter. 1996. « GASping for life in stationary phase ». *Cell* 86 (2): 181–184.
- Zhang, Q., G. Lambert, D. Liao, H. Kim, K. Robin, C.-k. Tung, N. Pourmand, et R. H. Austin. 2011. « Acceleration of Emergence of Bacterial Antibiotic Resistance in Connected Microenvironments ». *Science* 333 (6050) (septembre 22): 1764-1767.  
 doi:10.1126/science.1208747.







## Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia coli* étudiées en millifluidique digitale

Denis COTTINET

Les bactéries jouent un rôle majeur dans notre environnement. Leur omniprésence vient de leur remarquable capacité d'adaptation. Mieux comprendre cette adaptabilité peut permettre de mieux les combattre ou mieux les utiliser. La diversité des phénotypes au sein d'une population, c'est-à-dire les différents caractères observables, et les mécanismes de diversification sont les ingrédients de l'adaptabilité des bactéries. Pour étudier l'adaptation, nous avons suivi l'évolution temporelle de la diversité au sein de populations d'*Escherichia Coli* lors de changements environnementaux. Nous obtenons une image de la diversité grâce à un outil de phénotypage en millifluidique qui permet d'acquérir les courbes de croissances de mille bactéries en parallèle. À travers trois exemples nous montrons la pertinence de cette approche pour lire les phénotypes d'une population et nous explorons les rôles de la diversification et de la sélection darwinienne sur les dynamiques d'adaptation observées. La variation de phase du gène *ag43* et l'exposition à une concentration non létale d'antibiotique illustrent une première phase de l'adaptation régie par la compétition entre les phénotypes dont les probabilités d'apparition sont les plus élevées. Enfin nous étudions pendant trente jours l'adaptation d'une population dans un environnement épuisé. Nous observons une convergence vers un phénotype à quinze jours. Ce déterminisme est commun aux trois exemples. En revanche, la suite de cette expérience est imprédictible : l'observation est différente pour chaque répétition. Une seconde phase d'adaptation se joue, elle est dominée par l'apparition rare de mutations bénéfiques.

### Phenotypic diversity and adaptation explored with digital millifluidic

Bacteria play a major role in our environment. Their ubiquity comes from their amazing ability to adapt to environmental conditions. Understand their adaptability can help to cure infections or to use bacteria for biotechnology. The diversity of phenotypes within a population - different observable characters - and the diversification mechanisms contribute to the bacterial adaptability. In order to study the adaptation of bacteria, we followed the temporal evolution of diversity within populations of *Escherichia coli* through environmental transition. We get a picture of the diversity with a phenotyping tool in millifluidic allowing parallel acquisition of one thousand the bacteria growth curves. Through three examples, we show the potential of this approach to read the phenotypes within a population and we explore the roles of diversification and Darwinian selection on the dynamics of adaptation observed. The phase variation of the *ag43* gene and the exposure to a non lethal concentration of antibiotic illustrate a first phase of adaptation governed by the competition between the phenotypes with the highest apparition probabilities. Finally we study the adaptation of a population in a depleted environment for thirty days. After fifteen days we observe a convergence towards a single phenotype. This determinism is common to all three examples. However, the end of the experiment is unpredictable: the observation is different for each repetition. It corresponds to a second phase of adaptation which is dominated by the rare appearance of beneficial mutations.