



HAL
open science

Machine d'Évolution microbienne : une technologie millifluidique pour diriger l'évolution de communautés de microorganismes

Wilfried Sire

► To cite this version:

Wilfried Sire. Machine d'Évolution microbienne : une technologie millifluidique pour diriger l'évolution de communautés de microorganismes. Chimie-Physique [physics.chem-ph]. Université Paris sciences et lettres, 2020. Français. NNT : 2020UPSLS029 . tel-03167957

HAL Id: tel-03167957

<https://pastel.hal.science/tel-03167957>

Submitted on 19 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'ESPCI – École Supérieure de Physique et de Chimie
Industrielles de Paris

**Machine d'Évolution Microbienne :
Une technologie millifluidique pour diriger l'évolution de
communautés de microorganismes**

Soutenue par

Wilfried SIRE

Le 16 décembre 2020

Ecole doctorale n° 388

**Chimie Physique et Chimie
Analytique de Paris-Centre**

Spécialité

Physico-chimie

Composition du jury :

M. Andrew GRIFFITHS Professeur, ESPCI Paris	<i>Président</i>
M. Pascal PANIZZA Professeur, Université Rennes 1	<i>Rapporteur</i>
M. Philippe POULIN Directeur de recherche, CRPP-CNRS	<i>Rapporteur</i>
M. David BENSIMON Directeur de recherche, ENS-CNRS	<i>Examineur</i>
Mme. Annie COLIN Professeur, ESPCI Paris	<i>Examineur</i>
M. Stephen QUAKE Professeur, Stanford University	<i>Examineur</i>
M. Paul RAINEY Professeur, Max Planck Institute	<i>Examineur</i>
M. Jérôme BIBETTE Professeur, ESPCI Paris	<i>Directeur de thèse</i>

Remerciements

Je suis fier du chemin parcouru et du travail que j'ai mené au cours de ces trois dernières années. Mon travail de thèse, qui consistait à développer une nouvelle technologie pour diriger l'évolution de communautés microbiennes, a été passionnant, m'a comblé, m'a fait grandir, tant personnellement que professionnellement, et participe à mon accomplissement. Cette histoire a démarré durant mon stage de fin d'étude à Elvesys™ grâce à Fabien Crespo et Fabien Bertholle qui, au vu de mon ambition, de mon profil et de mes compétences m'ont invité à rencontrer Jérôme Bibette. Cette rencontre a été pour moi décisive.

Sans me connaître, Jérôme Bibette m'a accueilli très chaleureusement et je le remercie de m'avoir proposé, par la suite, un projet à la hauteur de mes ambitions. Devenu mon directeur de thèse, la confiance qu'il m'a accordée a été pour moi un véritable moteur pour mon investissement dans cette recherche, et j'ai toujours souhaité que mon travail soit à hauteur de ses attentes. Je le remercie pour la confiance et l'autonomie qu'il m'a accordées dans la réalisation de ce projet. Il a su me mettre dans les meilleures conditions de travail pour que je puisse m'épanouir tant sur le plan professionnel que personnel.

En plus de tout ce que m'a apporté Jérôme et du sérieux de son encadrement, un grand remerciement à Jean Baudry pour son investissement soutenu dans le suivi de proximité de mes travaux, pour sa bienveillance et pour son accompagnement de qualité. De par ses nombreuses compétences, il m'a apporté de précieux conseils. Nos échanges ont toujours été très enrichissants et j'ai beaucoup appris à ses côtés.

Je remercie également Nicolas Bremond pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux et pour m'avoir fait profiter de ses compétences en hydrodynamique.

L'encadrement combiné de Jérôme, Jean et Nicolas a été à l'origine d'une émulation intellectuelle très enrichissante. Grâce à leur approche, à leurs compétences spécifiques, à leurs apports respectifs et à leur humanité, ils ont contribué à mon évolution et à ma réussite.

Je remercie également chacun des membres de mon jury, qui au-delà de ma soutenance, portent un réel intérêt au projet que nous menons. Andrew Griffiths pour m'avoir fait l'honneur de présider ma soutenance de thèse. Pascal Panizza et Philippe Poulin qui ont accepté d'être mes rapporteurs et d'évaluer mon travail de près. David Bensimon et Annie Colin qui ont porté une attention particulière à l'examen de mon travail de thèse. Paul Rainey, Stephen Quake à qui j'associe Arjan De Visser (qui regrette de ne pouvoir être membre de mon jury), avec qui j'ai eu la chance d'échanger à plusieurs reprises autour de mes travaux, sur des sujets très diversifiés, tant technologiques que microbiologiques ou liés à l'évolution. Leurs apports sur les applications possibles de la technologie développée au cours de ma thèse sont venus enrichir notre projet et mes propres connaissances. Je remercie chacun d'eux de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail.

Je remercie les membres de l'équipe millifluidique que nous avons constitué autour de ce projet, à savoir Ankur Chaurasia, Julie Brouchon et Jean-Baptiste Dupin.

Je tiens à remercier tout particulièrement Ankur, mon binôme de travail, pour son altruisme, sa générosité et sa bienveillance dès mon arrivée et durant ces trois années de travail en commun. Chacun en charge du développement de sa propre machine d'évolution, très investis, nous étions tous deux face à notre machine comme des parents attentifs à la moindre évolution de leur enfant. Nous avons travaillé l'un pour l'autre en permanence, partagé nos compétences et nos idées au quotidien pour faire évoluer notre technologie. Nous avons traversé de nombreuses émotions, avons partagé des moments de frustration, d'énerverment, de prise de tête, mais également de rire, de joie et de bonne humeur autour de nos deux machines et de leur développement. Moments de doutes et d'enthousiasme ont ainsi pulsé notre quotidien. Une réelle cohésion est née entre nous et nous a permis de former un vrai duo, une amitié, tout au long de ces trois années de thèse.

Un grand remerciement à Julie qui, venue compléter notre équipe il y a un an, a apporté beaucoup d'enthousiasme et de bonne humeur. Elle s'est, dès son arrivée, intégrée à notre équipe, et directement impliquée et intéressée au projet et à mes travaux. Nos discussions autour de la microbiologie et des expériences conduites ont été nombreuses et très enrichissantes. Sa présence a favorisé une dynamique de partage et de vie sociale au sein du laboratoire.

Enfin, je remercie Jean-Baptiste pour sa transmission de connaissances et son aide sur le projet à mon arrivée au laboratoire. Il a su par la suite se rendre serviable et disponible.

Je remercie chaleureusement Florence Condamine, notre « maman du laboratoire », qui prend soin de nous au quotidien, qui fait en sorte que nous ne manquions de rien, que nous soyons dans les meilleures conditions de travail possibles. Toujours très serviable elle participe avec brio à l'organisation et au fonctionnement de la vie du laboratoire.

Je remercie Isabelle Borsenberger et Edouard Duliège, mes collègues de bureau, qui se sont toujours soucié de moi, de mon travail, et avec qui j'ai partagé de bons moments, même s'ils ne me voyaient pas beaucoup du fait de ma présence constante au laboratoire. A Edouard j'associerai Antoine Drevelle, co-fondateurs de la start-up Kapsera, qui a manifesté de l'intérêt pour mon travail. Je remercie également Isabelle, ainsi qu'Hélène Dodier, pour leur disponibilité et toute l'aide qu'elles nous apportent pour les démarches administratives.

Je remercie également toutes les personnes que j'ai eu l'occasion de rencontrer et avec qui j'ai partagé des instants de vie au sein du laboratoire. Je pense à Abdulwahed, Alexandre, Arthur, Aurore, Bettina, Claire, Danial, Daniela, Eren, Erwan, Guilhem C., Guilhem D., Jérôme, Jessica, Klaus, Kristina, Léo, Magda, Mathieu, Maxime, Mira, Nathan, Pablo, Paul, Sariyeh, Sylvie, Wafa. Chacun d'eux a contribué à enrichir cette expérience scientifique et humaine dans mon parcours de vie. Un grand remerciement à Guilhem Doucier pour l'intérêt particulier qu'il porte à notre projet, pour sa collaboration et son aide précieuse au développement d'un logiciel très utile à l'analyse de nos résultats. Merci à Arthur, doctorant de la même année que moi. Nous avons pu nous entraider à de nombreuses reprises. Une mention spéciale à Aurore, Léo et Jessica pour leur empathie et leur aide précieuse sur la fin de ma thèse.

Un remerciement particulier à Sariyeh, Danial et Abdulwahed avec qui je me suis très vite entendu autour de valeurs communes. J'ai beaucoup apprécié nos moments de partage, de joie, leur générosité et leur extrême gentillesse. Plus que des collègues, ils sont devenus des amis. Ensemble nous avons contribué à faire vivre et animer la vie du laboratoire. Merci à tous.

Un grand merci à tous mes amis d'enfance, à mes amis de Toulouse, de Bordeaux, de Grenoble, de Paris, du Canada et du Maroc, et à mon cousin Valentin. De près ou de loin ils m'ont toujours soutenu, encouragé et ont manifesté de l'intérêt pour mon parcours personnel et mon cheminement professionnel.

Merci à l'ensemble de ma famille et tout particulièrement à mes parents pour leur éducation et les valeurs qu'ils m'ont inculquées. Mon père a stimulé ma curiosité intellectuelle et ce depuis toujours, ma mère a fait preuve de beaucoup d'attention et d'empathie tout au long de mon parcours. Merci à tous deux pour toute l'aide et le soutien qu'ils m'ont octroyé tout au long de mes études. Merci à eux ainsi qu'à mes sœurs, ma grand-mère pour leur soutien sans faille, leur accompagnement, et l'amour qu'ils me portent au quotidien. Quant à mes deux petites nièces, leur jeune âge et leurs sollicitations m'ont permis, pendant quelques instants, d'oublier l'intensité de mon travail de thèse, et de partager des moments d'amour purs et sincères.

Mon grand-père et mon parrain, qui ne sont plus de ce monde, auraient été fiers de mon parcours, eux qui m'ont initié au bricolage, à la dextérité manuelle et qui ont encouragé mon inventivité dès mon plus jeune âge.

C'est avec émotion que j'écris ces dernières lignes, et j'espère les rendre tous fiers à jamais.

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	5
Introduction	9
I. Microorganismes et Évolution	15
I.1. Histoire de la théorie de l'évolution et découverte des microorganismes	15
I.1.A. La naissance de la pensée évolutionniste	15
I.1.B. Lamarck et la naissance du transformisme.....	18
I.1.C. L'évolution selon Darwin : variation et sélection naturelle.....	19
I.1.D. Théorie synthétique de l'évolution : la génétique au cœur des variations et de l'hérédité.....	22
I.1.E. Vers un enrichissement de la théorie synthétique	24
I.2. Les microorganismes et leurs bénéfices	24
I.2.A. Les microorganismes et le monde du vivant.....	25
I.2.B. Les bactéries, modèle de laboratoire	28
I.2.B.1. Structure cellulaire bactérienne.....	28
I.2.B.2. Cycle cellulaire bactérien.....	30
I.2.B.3. Pseudomona fluorescens	31
I.2.B.4. Escherichia coli	32
I.2.C. Adaptabilité et diversification des bactéries face à un stress	33
I.2.C.1. Les sources des variations et de la diversification intra-population.....	33
I.2.C.1.1. Variations non-génétiques	33
I.2.C.1.2. Variations génétiques.....	34
I.2.C.2. Une pression de sélection : le stress antibiotique.....	36
I.2.C.2.1. Modes d'action des antibiotiques.....	36
I.2.C.2.2. Quantification de l'efficacité d'un antibiotique	37
I.3. Études expérimentales d'évolution microbienne	38
I.3.A. Évolution expérimentale dirigée	39
I.3.A.1. Méthodes de culture en continue, un contrôle des conditions de croissance	39
I.3.A.2. Adaptation et optimisation face a un stress spécifique	41
I.3.A.3. La biologie synthétique au service de l'évolution dirigée.....	42
I.3.B. Évolution expérimentale pour l'exploration	43
I.3.B.1. La compartimentation au service de l'exploration évolutive.....	43
I.3.B.2. La parallélisation favorise la diversification et l'exploration.....	46
I.3.C. Conclusion.....	49
II. Millifluidique en gouttes : un outil adapté pour la culture, la manipulation et l'analyse de communautés de microorganismes	55
II.1. Un modèle expérimental d'évolution dirigée de communautés	55
II.1.A. Mise en évidence des clef de l'évolution de communautés.....	55
II.1.A.1. Les communautés vues comme des entités Darwiniennes	55
II.1.A.2. Gestion de la diversité intra-populations : deux niveaux de sélection.....	56
II.1.A.2.1. Pression de sélection aléatoire.....	57
II.1.A.2.2. Pression de sélection naturelle	58
II.1.A.2.3. Gestion de la double pression de sélection.....	59
II.1.A.3. Un double niveau d'échelle source d'une double diversité	61
II.1.B. Gestion de la diversité inter-populations : une question de sélection.....	62
II.1.B.1. Le transfert en série et ses limites.....	62
II.1.B.2. La sélection artificielle au cœur l'évolution dirigée	63
II.1.C. Vers une méthode appliquée : les clef de l'évolution à appliquer	66
II.2. La millifluidique et la puissance des gouttes millimétriques	67
II.2.A. Introduction à la millifluidique digitale	67
II.2.A.1. Les gouttes en microfluidique	68
II.2.A.2. Les gouttes en millifluidique	69

II.2.B. Les gouttes : bioréacteur pour la culture de microorganismes	70
II.2.C. Les gouttes : bioréacteur pour la manipulation de communautés microbiennes	72
II.2.C.1. Dynamique des fluides : Identification et indépendance des bioréacteurs	73
II.2.C.1.1. Mouillage	73
II.2.C.1.2. Mélange au sein des réacteurs	77
II.2.C.1.3. Coalescence et structuration d'un train de gouttes	78
II.2.C.2. Génération d'un train	80
II.2.D. Les gouttes : bioréacteur pour l'analyse de communautés de microorganismes	83
II.2.D.1. Mesure de fluorescence	84
II.2.D.2. Acquisition du signal de fluorescence et détection des gouttes	85
II.2.D.3. Analyse des données	87
II.2.E. Récupération et tri des bioréacteurs	88
II.3. Millifluidique en gouttes : vers une technologie pour l'évolution dirigée de communautés ...	90
II.3.A. Vers un mécanisme de propagation des échantillons	90
II.3.B. Conclusion	91
III. Machine d'évolution microbienne : une technologie pour diriger	
l'évolution de communautés de manière automatisée.....	95
III.1. Mécanisme de sélection et de propagation d'échantillons.....	95
III.1.A. La parallélisation des tubes au service des cycles d'évolution	95
III.1.B. Module de transfert.....	97
III.1.B.1. Une vanne microfluidique à interfaçage millifluidique	98
III.1.B.2. Détection et manipulation lors d'un transfert entre deux gouttes	100
III.1.B.2.1. Détection	100
III.1.B.2.2. Manipulation et positionnement des gouttes.....	104
III.1.B.3. Un module au design spécifique.....	107
III.1.C. Conclusion.....	109
III.2. Automatisation des cycles d'évolution.....	109
III.2.A. Réalisation de cycles d'évolution : une vue d'ensemble sur la technologie	110
III.2.A.1. Fonctionnement général de la machine d'évolution.....	110
III.2.A.2. Sécurités pour l'automatisation.....	112
III.2.A.2.1. Modules de détection de gouttes	112
III.2.A.2.2. Mesure du niveau d'huile et nivellement	114
III.2.B. Génération automatisée d'un train de gouttes	114
III.2.B.1. Jonction en T.....	115
III.2.B.2. Jonction en croix.....	116
III.2.B.3. Double jonction en T en parallèle.....	118
III.2.B.4. Aiguillage des trains	119
III.2.B.5. Modes de génération : train de nettoyage et train de culture	120
III.2.B.6. Conclusion	121
III.2.C. Incubation d'un train de goutte et acquisition des données	121
III.2.C.1. Acquisition du signal de fluorescence et détection des gouttes.....	122
III.2.C.2. Réinjection d'air : une solution pour maintenir le volume d'air constant	123
III.2.C.3. Enrichissement de l'analyse.....	125
III.3. Conclusion.....	128
IV. Caractéristiques de la machine d'évolution.....	133
IV.1. Caractérisation du module de transfert.....	133
IV.1.A. Volume minimal transférable	134
IV.1.B. Fluctuations du volume transféré	136
IV.1.C. Conclusion.....	139
IV.2. Étude des contaminations	139
IV.2.A. Méthode expérimentale d'évaluation des contaminations	140
IV.2.B. Évaluation des contaminations lors des étapes de génération, d'incubation et de récupération d'un train de gouttes	143
IV.2.B.1. Contaminations lors de la création du premier train.....	144
IV.2.B.1.1. Préparation de la plaque à puits	144
IV.2.B.1.2. Génération du train à l'aide du sipper.....	145
IV.2.B.1.3. Chargement du train de gouttes : traversée d'une jonction	146
IV.2.B.2. Contaminations lors de l'incubation d'un train.....	147
IV.2.B.3. Contaminations lors de la récupération et du tri du train.....	149

IV.2.B.4. Conclusion	150
IV.2.C. Contaminations dues au transfert d'échantillons.....	150
IV.2.C.1. Contaminations liées aux discontinuités	150
IV.2.C.2. Contaminations liées au transfert des échantillons.....	151
IV.2.C.3. Contaminations liées à l'arrêt des gouttes	153
IV.2.D. Conclusion.....	153
IV.3. Conclusion.....	154
V. Preuve de concept : évolution dirigée de populations bactériennes face à un stress antibiotique.....	159
V.1. Croissance de populations bactériennes face à un stress antibiotique et mesure d'adaptabilité.	159
V.1.A. Modèle expérimental : l'antibiorésistance	160
V.1.B. Croissance bactérienne en présence d'antibiotique	161
V.1.B.1. Croissance bactérienne en gouttes	161
V.1.B.2. Analyse phénotypique et mesure d'adaptabilité	163
V.1.B.3. Reproductibilité de l'expérience et de l'analyse	167
V.1.C. Conclusion.....	168
V.2. Propagation par transfert en série et sélection naturelle de mutants	169
V.2.A. Impact d'une première étape de stress sur l'adaptation face à une concentration sup-MIC.....	169
V.2.B. Une technologie permettant l'appartition et la sélection de mutants	173
V.2.C. La sélection naturelle motrice de l'évolution.....	178
V.2.C.1. Valeur adaptative et sélection naturelle	178
V.2.C.2. Adaptabilité en présence d'une pression de sélection naturelle constante.....	182
V.2.D. Conclusion.....	182
V.3. Sélection artificielle et évolution dirigée	183
V.3.A. La sélection artificielle au service de l'évolution dirigée	183
V.3.B. La sélection artificielle au service de l'exploration	186
V.3.B.1. Adaptabilité en présence d'une pression de sélection naturelle constante.....	186
V.3.B.2. Impact de l'histoire évolutive sur l'adaptabilité.....	187
V.3.C. Gestion des pressions de sélection	189
V.3.D. Conclusion.....	191
V.4. Conclusion et perspectives.....	192
Conclusion.....	195
Annexes	197
Bibliographie	207

Introduction

Les microorganismes sont au cœur de l'écologie Terrestre. Acteurs majeurs de l'évolution de la vie sur Terre, de par leur nombre, leur taille et leur capacité d'adaptation, ils présentent une grande diversité, nid de richesse chimique et biologique. Au cours du temps, l'Homme est parvenu à exploiter leurs bénéfices pour développer des solutions dans de nombreux domaines : l'agroalimentaire (ex : produits fermentés), la santé (ex : antibiotiques), l'industrie chimique (ex : biopolymères, protéines...) ou encore l'énergie (ex : biocarburants). Mais leur potentiel ne s'arrête pas là.

Présents dans la plupart des habitats naturels de la planète, dans le sol, l'air, l'eau et jusque dans les profondeurs de la Terre, ils s'assemblent sous forme de communautés complexes où des interactions bénéfiques surgissent. Ces communautés sont grandement impliquées dans les cycles biogéochimiques (cycle du carbone, de l'azote, de l'oxygène...), la bioremédiation naturelle des environnements pollués, la croissance et la protection des plantes, et sont mêmes indispensables à notre santé et à notre survie (microbiote intestinal, cutané...). Comprendre les interactions et l'évolution de telles communautés de microorganismes, dans le but de les reproduire, et d'en exploiter leurs synergies, représente un enjeu capital de notre temps, avec des répercussions écologiques, sanitaires et industrielles.

Bien que de grandes avancées soient faites en microbiologie (notamment grâce au développement de nouvelles technologies) ces communautés et leur évolution restent aujourd'hui peu étudiées et mal comprises. En majeure partie les études d'évolution portent sur des individus, des souches uniques, et de manière isolée. Conduites sur des populations, elles favorisent l'émergence d'opportunistes biologiques (« fast-growers »). Une des solutions pour maintenir la diversité présente au sein de ces communautés, et ainsi d'en exploiter les bénéfices, serait de diriger leur évolution par sélection artificielle.

Cette thèse propose une nouvelle technologie, dite « Machine d'Évolution Microbienne » (MEM), permettant d'appliquer les lois de l'évolution Darwinienne à des cocktails de microorganismes naturels, afin de faire émerger, par évolution dirigée et de manière naturelle, des interactions capables d'établir des cohabitations stables et durables. Ce travail de thèse a permis sa conception, son développement, sa caractérisation et la démonstration de son potentiel d'application, que nous détaillerons dans les différents chapitres de cette thèse.

Ce travail de thèse gravitant autour de l'évolution et des microorganismes, c'est tout naturellement que notre premier chapitre abordera ces deux notions. Il permettra d'introduire les grands concepts de l'évolution, de promouvoir le rôle des microorganismes dans l'écologie Terrestre et de montrer qu'évolution et microorganismes sont étroitement liés. Nous justifierons ainsi notre intérêt pour l'écologie microbienne, et présenterons les différentes méthodes permettant d'étudier l'évolution microbienne expérimentalement en laboratoire. Nous en verrons les avantages et inconvénients qui ont justifié notre envie de développer une nouvelle technologie.

A partir des clefs de l'évolution identifiées au premier chapitre (compartimentation, parallélisation, contrôle dynamique des conditions de culture et des pressions de sélections) nous proposerons, au second chapitre, un modèle expérimental permettant de diriger l'évolution de

communautés microbiennes. Nous introduirons alors la science permettant la mise en œuvre de ce modèle : la millifluidique digitale ; science de la manipulation de gouttes millimétriques. Nous verrons comment les recherches menées au sein du laboratoire ces quinze dernières années autour de cette science ont mené au développement (en 2015) d'un premier instrument d'analyse millifluidique (le MDA). Cet instrument permet la culture, la manipulation et l'analyse de centaines de communautés microbiennes en parallèle, mais présente certaines limitations pour diriger l'évolution de façon viable et automatisée.

La poursuite du travail de recherche au sein du laboratoire a conduit à l'invention d'une innovation de rupture qui a permis de changer la dimension de la technologie millifluidique existante. Cette solution disruptive, appelée « module de transfert », permet la sélection et la propagation des communautés, et apporte le niveau de manipulation requis pour diriger leur évolution. Cependant, l'utilisation unique d'un tel module n'est pas suffisante pour réaliser des cycles d'évolution de manière automatisée. Le troisième chapitre s'attachera à présenter ce module, son fonctionnement, ainsi que l'ensemble des modules annexes, développés au cours de cette thèse, et permettant le fonctionnement global de la machine d'évolution de manière automatisée et sur le long terme.

Cette nouvelle technologie, développée au cours de ma thèse, permet la réalisation de cycles pour diriger l'évolution tout en respectant les prérequis du modèle expérimental : compartimentation, parallélisation, maximisation des diversités, gestion des pressions de sélections. Cependant, et avant d'envisager de conduire des expériences d'évolution avec des microorganismes, il est important de caractériser la machine pour savoir dans quelles limites nous travaillons. Un travail de caractérisation autour du module de transfert a donc été réalisé au cours de cette thèse, et le quatrième chapitre s'attachera à en présenter les résultats. Il sera ainsi démontré que cette technologie, bien que présentant de grandes perspectives d'évolution, possède déjà des capacités suffisantes pour réaliser des cycles d'évolution dirigée.

Enfin, le cinquième et dernier chapitre apportera une validation biologique concrète à notre approche. Cette validation, tant fonctionnelle que conceptuelle, sera apportée par la réalisation d'une première expérience d'évolution, une preuve de concept, appliquée à un cas réel : l'acquisition d'une antibiorésistance chez des populations bactériennes d'*Escherichia coli*. La sélection artificielle sera mise à profit pour diriger l'évolution de centaines de populations bactériennes en parallèle, et ainsi démontrer la capacité de notre technologie à diriger l'évolution tout en explorant un maximum de chemins évolutifs possibles.

Chapitre I : Microorganismes et Évolution

I. Microorganismes et Évolution

Comme évoqué dans l'introduction, les microorganismes sont au cœur de l'évolution de la vie sur terre. Très diversifiés ils jouent un rôle primordial dans la dynamique écologique de la biosphère.

Nous portons un intérêt tout particulier à l'évolution des microorganismes, et ce premier chapitre vise à le justifier. Il semble difficile de s'intéresser à l'évolution des microorganismes sans préalablement évoquer la théorie de l'évolution. Une première partie sera donc consacrée à l'histoire de la théorie de l'évolution, de son apparition à son état actuel. Elle montrera aussi comment la découverte des microorganismes a accompagné le développement de la pensée évolutionniste. Une seconde partie sera dédiée à la microbiologie, et aux microorganismes. Elle s'attachera à montrer leurs bénéfices ainsi que ceux des synergies présentées par les communautés dans la nature, et justifiera notre envie d'étudier leur évolution. Enfin, elle permettra de présenter plus en détails les bactéries, modèle biologique majoritairement utilisé en biologie de l'évolution, et leurs différents mécanismes de diversification, impliqués dans leur adaptabilité. Une dernière partie nous permettra de montrer que l'intérêt que nous portons à l'évolution des microorganismes est également partagé par la communauté scientifique. Les différentes méthodes permettant d'étudier l'évolution microbienne expérimentalement en laboratoire seront présentées. Nous en verrons les avantages, mais aussi les limitations, qui ont justifié notre envie de développer une nouvelle technologie, adaptée pour l'évolution de communautés microbiennes.

I.1. Histoire de la théorie de l'évolution et découverte des microorganismes

De tout temps, les hommes se sont posés les mêmes questions : D'où venons-nous ? Où allons-nous ? D'où viennent les plantes et les animaux qui nous entourent ? Quelle est l'origine de la vie ? Comment expliquer la diversité du vivant ?

L'origine de la vie, son évolution et sa destinée, ont toujours été au cœur des mystères de la vie. Bien que ces grandes questions restent toujours non résolues, le voile de l'incompréhension a été partiellement levé. Nous en savons bien plus aujourd'hui qu'à l'aube de l'humanité, mais la route reste longue, et nul ne sait si nous pourrions un jour résoudre le mystère, ce mystère qui fascine l'Homme.

I.1.A. La naissance de la pensée évolutionniste

Dès l'Antiquité, ces questions ont commencé à être abordées par les philosophes grecs, chinois et romains. C'est en Grèce antique, il y a plus de deux millénaires, que les premières théories « évolutionnistes » émergent. Ces théories émettent l'idée que l'Homme serait lié à l'animal et descendrait de créatures aquatiques, sous-entendant qu'il pourrait exister un ancêtre commun aux êtres vivants. Par manque de preuve, ces théories vont rester spéculatives. Ce sont alors les théories de l'essentialisme, proposant au contraire une vision figée, fixiste, où les espèces diffèrent entre elles par essence et sont « immuables et éternelles », qui vont prédominer. Initiées par Platon (Vème siècle av. J-C), soutenues par Aristote (IVème siècle av. J-C) et appuyées par le naturaliste latin Pline l'Ancien (Ier siècle ap. J-C), elles vont fonder durant 15 siècles les bases de la zoologie, où vont se côtoyer à la fois observations précises et croyances mythologiques ou religieuses. Les chercheurs puisent leurs

connaissances dans les écrits plus que dans l'observation directe, ce qui amène la croyance en des animaux légendaires tels que les licornes, les cyclopes ou encore les dragons. Au Moyen-Âge, la religion reprend ce « fixisme » et intègre à ce modèle de pensée une origine divine. Dans cette théorie, nommée « créationnisme », les espèces seraient donc des entités créées de toutes pièces à partir d'un « moule divin », en attribuant le sommet de l'échelle à Dieu. La Genèse biblique donne ainsi une réponse sur l'origine de la vie, là où le fixisme n'en donne pas. Les espèces, telles que nous les connaissons aujourd'hui, auraient ainsi été créées par la main de Dieu, suivant une finalité qui lui est propre. Pour expliquer les phénomènes courants d'apparition d'êtres vivants à partir de matière inanimée (moisissures et asticots sur les aliments, mites dans la laine), Aristote synthétisa le concept de génération spontanée.

L'essentialisme, la génération spontanée et le créationnisme donneront des réponses aux grandes questions sur l'origine de la vie jusqu'au XVIIème siècle. Ces croyances limiteront les recherches et représenteront l'obstacle majeur à l'acceptation et à la compréhension de la théorie de l'évolution.

Ce n'est qu'en 1668, que Francesco Redi (1626-1697), biologiste italien étudiant tout particulièrement les insectes, fournit les premières preuves contre la théorie de la génération spontanée (Figure I-1). Il démontre dans son ouvrage *Esperienze intorno alla generazione degl'insetti* (« Expériences sur la génération des insectes ») que l'apparition d'asticots dans la viande avariée provenait seulement de la naissance d'œufs pondus par des mouches, et non pas de la génération spontanée. A cette époque, cette expérience était d'une importance considérable, car ce fut l'une des premières expériences contrôlées dans l'histoire. Elle permit par la suite à plusieurs savants de se poser des questions sur l'origine de la vie.

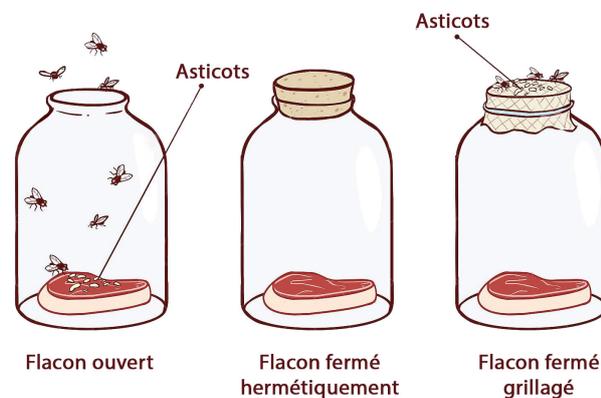


Figure I-1 : Expérience de F. Redi.

De la viande fraîche fût placée dans trois flacons respectivement ouvert, hermétiquement fermé, et fermé avec de la gaze. Après un certain temps, comme prévu, des asticots apparurent sur la viande du premier flacon. Cependant, pour le flacon hermétiquement fermé aucun asticot n'apparût sur la viande. Le dernier flacon, permit de prouver que ce n'était pas le manque d'air qui empêchait la génération spontanée, mais que c'était bien les mouches qui produisaient des asticots (devenant des mouches à leur tour), réfutant la théorie de la génération spontanée. (image modifiée depuis [1]).

Au XVIIème siècle, avec l'amélioration du microscope, Antoine van Leeuwenhoek (1632-1723) met pour la première fois en évidence l'existence des microorganismes. Grâce à ses observations, il ouvre la voie à l'étude des microorganismes, la microbiologie, et vient amener de nouvelles preuves en défaveur de la génération spontanée. Mais, à l'époque, cette découverte fera plutôt effet de controverse. Beaucoup défendront l'idée que même si les asticots ou autres organismes de taille comparable ne sont pas issus de la génération spontanée, les microorganismes en sont le fruit.

A partir du XVIIIème siècle, avec le développement des fouilles archéologiques et la découverte de créatures fossilisées inconnues de l'Homme, la paléontologie émerge. Le passé de la vie sur Terre commence à trouver de nouvelles explications. Un débat scientifique s'instaure, et la vision « statique » de la nature commence alors à être remise en question.

Petit à petit, des scientifiques s'étonnent de constater des ressemblances morphologiques entre les espèces. Bien que fixiste, le premier à généraliser la classification des espèces par ordre/genres/espèces selon leur proximité anatomique fût le naturaliste et médecin suédois Carl von Linné (1707-1778), père de la taxinomie et de la nomenclature binominale. Selon lui, la chaîne des êtres vivants est hiérarchisée «selon l'ordre divin» de manière décroissante, en partant de l'Homme jusqu'aux êtres «inférieurs», sans établir de lien de parenté entre espèces. Il classe alors pour la première fois en 1758 l'Homme et le singe dans le même ordre : celui des Primates.

Un peu plus tard, le savant français Georges Cuvier (1769-1832), fondateur de l'anatomie comparée et père de la paléontologie, reprendra les idées développées par Linné, pour donner naissance en 1817 à la classification moderne du règne animal. Fixiste et créationniste, il soutient que l'évolution n'existe pas et que chaque espèce a été créée par la main divine. Ses travaux paléontologiques, démontrèrent cependant que des espèces entières peuvent s'éteindre. Afin d'expliquer la présence des animaux et plantes fossiles, il soutient la théorie du catastrophisme. Théorie selon laquelle des cataclysmes planétaires auraient provoqué la disparition d'organismes, ultérieurement devenus fossiles. De nouvelles espèces immuables auraient ensuite été créées par la main de Dieu pour repeupler la Terre. Liée au créationnisme, cette théorie concordait donc parfaitement avec l'épisode biblique du Déluge, dernier cataclysme en date. Cuvier s'opposa aux idées évolutionnistes naissantes.

Toutes les découvertes faites par ces savants, bien que fixistes convaincus, fournirent des éléments essentiels à l'élaboration d'un nouveau courant : le transformisme.

Selon le transformisme, théorie opposée au fixisme, toutes les espèces se transforment au cours du temps. Le naturaliste français Georges-Louis Leclerc, comte de Buffon (1707-1788), sera le précurseur de ce courant. Il remet en cause la théorie du fixisme, en proposant une histoire de la Terre et de la vie ne s'accordant pas avec la Genèse et les croyances religieuses. A cette époque, la religion avait un droit de veto sur la pensée scientifique. Alors que l'on pensait la planète vieille de quelques milliers d'années seulement selon les écrits religieux, il estima l'âge de la Terre à 10 millions d'années. En se basant sur les dépôts chronologiques des sédiments et les reconstructions fossiles, il en déduit une évolution de la surface terrestre, traversée par la séparation des continents et par une succession de flores et de faunes antérieures aux nôtres. La nouvelle estimation de l'âge de la Terre fût une réelle révolution pour l'époque et rendit possible la première théorie de la transformation des êtres vivants. Elle lui permit, en 1766, d'élaborer sa théorie d'évolution «dégénérative» des espèces. Ses travaux seront publiés à partir de 1749 et jusqu'en 1789, dans les 36 tomes de son encyclopédie *Histoire Naturelle*. Ses ouvrages révèlent des ressemblances morphologiques entre l'Homme et le singe, aussi identifiées par son contemporain Linné. À la différence de ce dernier, et critiquant le caractère trop systématique de sa classification, Buffon s'intéresse essentiellement aux animaux ayant une proximité avec l'Homme (cheval, chien, singe, oiseaux). Sa théorie de la dégénération des espèces propose que l'Homme et les animaux se soient transformés, au cours du temps, par dégénération à partir d'une forme initiale parfaite, et sous l'influence de facteurs environnementaux : milieu, nourriture, domestication. Pour Buffon, ce processus était réversible, et si ces espèces retrouvaient un environnement aux conditions originelles, elles pouvaient retrouver leur forme initiale, parfaite. Il postula que les espèces actuelles descendraient d'un «lot» originel de 38 espèces, donnant ainsi une origine commune aux singes et Hommes, mais aussi aux ânes et chevaux, aux chats/lions/tigres et autres félins. Malgré la ressemblance physionomique entre Hommes et animaux, il place l'Homme au-

dessus de ces derniers, car disposant de la pensée. Naturaliste des plus influents de son époque, il va jusqu'à affirmer que malgré la diversité des Hommes, il n'y a qu'une seule espèce humaine. Bien que proposant des idées évolutionnistes selon lesquelles les espèces se transforment au cours du temps, sa vision de l'évolution reste limitée. Ne connaissant pas l'origine première des espèces, il s'en remet aux miracles ou à quelques procédés de « génération à partir de molécules organiques » pour expliquer leur création. Buffon avait ainsi identifié des concepts clés de la biologie et semblait sur la voie de formuler une théorie de l'évolution. Condamné par la faculté de théologie de la Sorbonne, et menacé d'être pendu, il se rétracta, n'exposa pas totalement sa pensée et ne poussa pas sa théorie à son terme. Il légua ainsi à ses successeurs, notamment les naturalistes Jean-Baptiste de Lamarck (1744-1829) et Charles Darwin (1809-1882), des pistes pour développer une théorie de l'évolution plus complète.

I.1.B. Lamarck et la naissance du transformisme

Le naturaliste français Jean-Baptiste de Lamarck (1744-1829), considéré par beaucoup, comme le premier véritable évolutionniste, fût le premier, en 1809, dans sa *Philosophie zoologique*, à développer et étayer une théorie transformiste cohérente, donnant des réponses scientifiques sur l'évolution du vivant. C'est en cherchant à comprendre en quoi le vivant se distinguait de la matière inanimée, qu'il aboutit à sa théorie de l'évolution. Il fonda ainsi la biologie, science à part entière de l'étude de la vie. Avec les nouvelles découvertes géologiques prouvant que la Terre avait évolué durant des millénaires, l'idée d'une création parfaite et d'une fixité des espèces ne pouvait perdurer. Pour survivre et rester en équilibre avec un environnement changeant au fil du temps, les espèces devaient s'adapter.

Bien qu'évolutionniste, il ne trouve pas d'explication à l'origine de la vie. Dans sa vision des choses, la génération spontanée permet l'apparition des organismes (dits « corps organisés ») les plus simples, de manière fréquente. Pour expliquer la grande diversité du vivant, sa théorie propose ensuite que ces organismes primitifs se complexifient au cours du temps, en vue de perfectionnement, et s'adaptent sous l'influence de l'environnement. Il pense que les extinctions n'existent pas, et soutient le fait que les espèces fossilisées ne sont pas éteintes, mais qu'elles ont changé dans de telles proportions qu'on ne les reconnaît plus. Il imagine ainsi, en 1809, que plusieurs lignées évolueraient parallèlement à partir d'organismes primitifs différents, mais qu'il n'y aurait aucune filiation entre les différentes lignées, qui seraient donc indépendantes (vision linéaire de l'évolution). Quelques années plus tard, en 1815, il remettra en question cette vision parallèle pour être le premier à imaginer un arbre phylogénique buissonnant.

Il fondera ainsi sa théorie du transformisme sur ces deux principes :

1. La complexification est une propriété inhérente aux êtres vivants. Ils tendent naturellement et graduellement à se complexifier, selon leur métabolisme propre (ex : développement de nouveaux organes).
2. L'adaptation des êtres vivants à leur milieu explique la diversification en espèces. Ce second principe repose sur la loi « d'usage et de non-usage », selon laquelle « la fonction crée l'organe » : un organe se développe à mesure qu'on l'utilise ou se réduit s'il ne sert pas. Il soutient l'idée que l'adaptation des êtres vivants passe par la transmission des caractères acquis (aux cours d'une vie) à la descendance, sans en proposer de théorie explicative.

Lamarck, contrairement à Buffon, ne pense pas que ce sont les conditions du milieu environnant qui agissent directement sur les êtres vivants. Au contraire, il imagine que pour s'adapter à ces conditions, les individus sont obligés de fournir des actions, des efforts, créant ainsi des habitudes. Ces habitudes seraient à l'origine des variations chez les individus, et conduiraient à la transformation des espèces.

Pour illustrer et soutenir sa théorie de l'évolution, Lamarck reprit souvent l'exemple, resté célèbre, du cou de la girafe. Il explique alors que les girafes, suite à un effort permanent pour se nourrir des hauts feuillages, effort devenu une habitude, agrandissent leur cou au cours de leur vie. En considérant que les caractères acquis sont héréditaires, et donc transmis à la descendance, il explique donc pourquoi les girafes ont un long cou (Figure I-2).

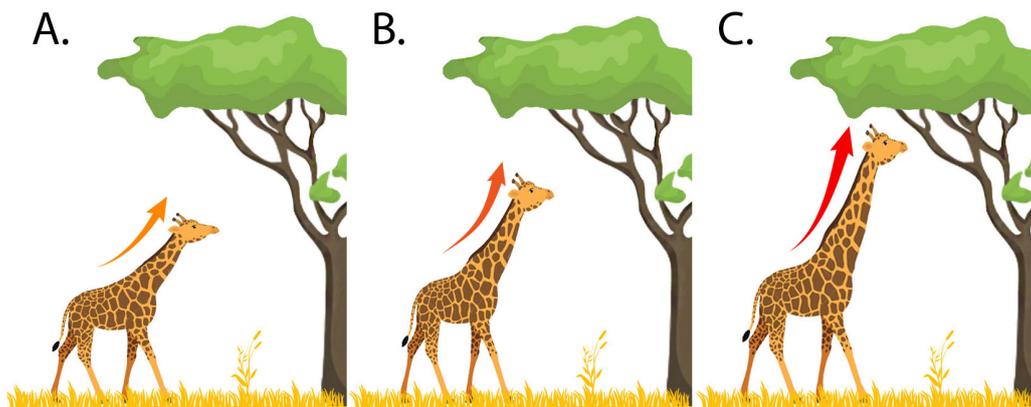


Figure I-2 : Lamarckisme.

Pour illustrer sa théorie transformiste, Lamarck utilisa l'exemple du cou de la girafe. Le cou de la girafe aurait été initialement court. À force de l'étirer (flèches) pour atteindre les hauts feuillages et se nourrir, ce dernier se serait légèrement allongé (A). Ce caractère, acquis au cours d'une vie, aurait été transmis à la descendance, qui serait née avec un cou un peu plus long : transmission des caractères acquis (B). Ce processus se serait répété au fil des générations, poussant ainsi les girafes à acquérir un long cou (C), leur permettant de s'adapter à leur milieu.

Sa théorie, en expliquant l'adaptation des organes des animaux à l'usage qu'ils en font dans leur environnement, séduira beaucoup de scientifiques de l'époque. Lamarck jouera ainsi un vrai rôle dans le changement de conception sur la notion de transformation et d'évolution du vivant, qui inspirera notamment Darwin cinquante ans plus tard. Entre temps, son grand-père Erasmus Darwin (1731-1802) exposera ses idées évolutionnistes dans ces ouvrages *Zoonomia* et *The Temple of Nature*, et il affirmera que tous les êtres vivants descendent d'un ancêtre commun « très simple ».

I.1.C. L'évolution selon Darwin : variation et sélection naturelle

Alors qu'en 1809 Lamarck dévoilait sa théorie de l'évolution, Charles Darwin (1809-1882), voyait le jour. Cinquante ans plus tard, c'était au tour du naturaliste anglais d'exposer, dans son ouvrage *L'Origine des espèces*, sa théorie de l'évolution, révolutionnant ainsi les sciences naturelles, et les modes de pensées.

Sa théorie se construit au fil des ans, en accumulant de nombreuses preuves sur l'évolution des espèces. Il enrichit sa connaissance par ses multiples observations : biogéographiques, géologiques, morphologiques, embryologiques... et par son intérêt porté sur l'élevage animal (sélection artificielle des

animaux domestiques). C'est notamment suite à son voyage en Amérique du Sud et dans le Pacifique à bord du Beagle (1831-1836) que Darwin élabore sa théorie sur les variations et la sélection naturelle.

En 1858, il apprend que le biologiste Alfred Russel Wallace (1823-1913) travaille sur les mêmes idées de variation et de sélection naturelle. Ils décident alors de présenter conjointement leurs travaux. Par la suite, le nom de Darwin sera essentiellement retenu, notamment grâce à *L'Origine des espèces*, publiée en 1859.

La théorie émise par Lamarck selon laquelle toutes les espèces vivantes évoluent au cours du temps et descendent d'ancêtres communs le séduira mais ne le convaincra pas totalement. Il remettra notamment en question l'origine de la vie ainsi que les modalités de l'évolution émises par Lamarck, concernant les mécanismes des transformations évolutives et la transmission des modifications à la descendance.

Refusant l'idée de la complexification immanente au vivant et le fait que les conditions extérieures soient la cause des variations, Darwin cherche à comprendre quel est le mécanisme dirigeant cette évolution adaptative.

C'est la lecture en 1838 de *l'Essai sur le Principe de Population* de T.R. Malthus (1766-1834), économiste britannique, et la découverte de son concept de « lutte pour l'existence », qui fera naître dans l'esprit de Darwin l'idée de sélection naturelle. Selon le concept de Malthus, la croissance exponentielle des populations dans un environnement aux ressources limitées ne peut conduire qu'à un déséquilibre. Darwin partira du constat de l'économiste et l'adaptera au monde du vivant. Il introduira ainsi la sélection naturelle en tant que « frein continu » régulant la croissance démographique des espèces : seuls les individus les plus adaptés à leur environnement survivent.

Grâce à toutes ses observations et la documentation considérable qu'il établit durant des années, Darwin ajoute à sa théorie un élément manquant dans celle de Lamarck, et dans toutes les précédentes. Cet élément manquant, qui sera au cœur de l'évolution, est le hasard. Selon Darwin, le hasard est responsable des variations, accidentelles et héréditaires, observables chez chaque individu. Ces variations sont totalement indépendantes des conditions environnementales. C'est ensuite la nature qui va sélectionner les individus les plus aptes à vivre dans leur environnement (sélection naturelle). Les variations étant héréditaires, transmissibles à la descendance via la reproduction, elles donnent lieu, en s'accumulant, à de nouvelles espèces, tandis que les espèces les moins adaptées s'éteignent.

Nous pouvons ainsi voir les variations comme le « matériau » de base des transformations, et la sélection naturelle comme la « force motrice » de l'évolution.

"I am convinced that natural selection has been the main but not exclusive means of modification.",¹

C. Darwin, The Origin of Species, 1859

Reprenons l'exemple de la girafe pour illustrer sa conception, et la comparer à celle de Lamarck. Darwin et Lamarck s'accordent sur le fait qu'à l'origine, les girafes avaient un cou tout à fait ordinaire. Cependant, là où Lamarck soutenait que le cou s'allongeait sous l'effort permanent effectué par l'animal pour se nourrir, Darwin l'explique par le hasard (causant les variations) et la sélection naturelle. Selon lui, les girafes naissant avec un plus long cou, pourront plus facilement se nourrir, et donc mieux

¹ En français : « Je suis convaincu, enfin, que la sélection naturelle a joué le rôle principal dans la modification des espèces, bien que d'autres agents y aient aussi participé »

survivre, et se reproduire. Cette variation, étant héréditaire, sera transmise à la descendance. Ainsi, après des milliers de générations, l'espèce finira dotée d'un long cou (Figure I-3).

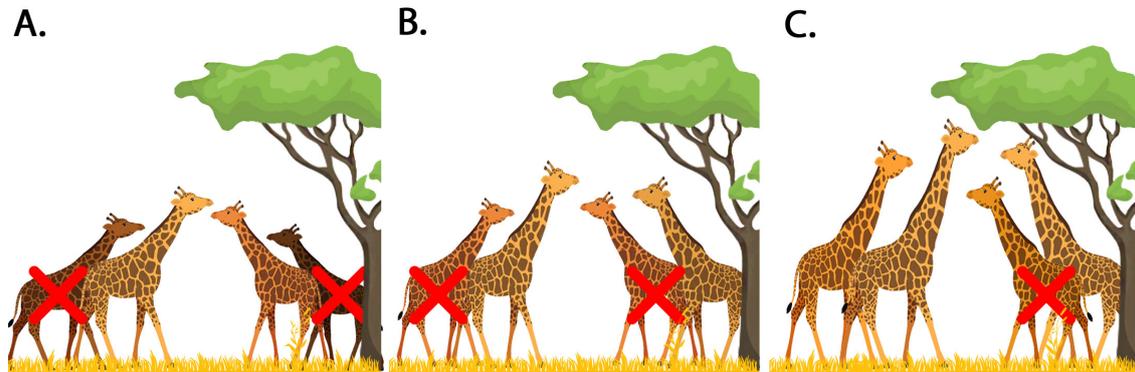


Figure I-3 : Darwinisme.

Le cou de la girafe aurait été initialement court, mais avec des variations de taille d'un individu à un autre, créant une certaine diversité (A). La hauteur des feuillages de l'environnement de la girafe va ensuite agir comme « critère de sélection » de la nature. Ainsi, par le processus de sélection naturelle, les girafes ayant un plus long cou se reproduiront plus efficacement, car mieux nourries. Les autres ne survivront pas (croix rouge). La variation de longueur du cou de la girafe, étant héréditaire, sera transmise à la descendance (B), donnant ainsi une future population de girafe ayant des cous globalement plus longs que leurs ascendants, bien que des variations persistent. Ce processus se répétant au fil des générations, il pousse ainsi les girafes à acquérir un long cou (C), et en font une espèce adaptée à leur milieu.

Les théories Lamarckienne et Darwinienne trouvent aussi des différences dans la filiation des espèces. Alors que Lamarck place la génération spontanée permanente à l'origine de la vie, Darwin soutiendra l'existence d'un unique ancêtre commun à toute forme de vie et réfutera la génération spontanée. Il n'évoquera pas l'origine de son apparition dans *L'Origine des espèces*, mais seulement dans des correspondances privées. Il défendra la thèse que la vie n'ait pu apparaître que par des processus très lents, dans un monde encore abiotique.

“It is often said that all the conditions for the first production of a living organism are now present, which could ever have been present. But if (and oh! what a big if!) we could conceive in some warm little pond, with all sorts of ammonia and phosphoric salts, light, heat, electricity, &c., present, that a protein compound was chemically formed ready to undergo still more complex changes, at the present day such matter would be instantly devoured or absorbed, which would not have been the case before living creatures were formed.”, ² lettre à J. D. Hooker par C. Darwin, 1^{er} février 1871

Darwin fit de l'évolution, à partir d'une ascendance commune, l'explication scientifique dominante de la diversification des espèces naturelles. Cette théorie reste encore vraie aujourd'hui et la science moderne cherche à comprendre et à expliquer l'apparition de cette première forme de vie, dénommée LUCA (« Last Universal Common Ancestor », en français « Dernier ancêtre commun universel »). Bien que cet ancêtre commun ne soit pas identifié, nous savons que les microorganismes sont au cœur de l'évolution, car ils représentent les premières formes de vies à être apparues sur Terre.

² En français : « On dit souvent que toutes les conditions pour la première production d'un organisme vivant qui sont maintenant réunies, pourraient ne l'avoir jamais été. Mais si (et oh, quel grand si) nous pouvions concevoir, dans quelque petite mare chaude, en présence de toutes sortes de sels d'ammoniac et d'acide phosphorique, de lumière, de chaleur, d'électricité, etc., qu'un composé de protéine fût chimiquement formé, prêt à subir des changements encore plus complexes, actuellement une telle matière serait instantanément dévorée ou absorbée, ce qui n'aurait pas été le cas avant l'apparition des créatures vivantes »

Alors que Darwin réfutait la génération spontanée, il était un peu en avance sur son temps et n'avait pas encore de preuves irréfutables à cet égard. Ces preuves seront fournies peu après la publication de sa théorie, en 1861-1862, par Louis Pasteur (1822-1895), scientifique français et pionnier de la microbiologie, avec son expérience effectuée en flacons à col de cygnes (Figure I-4). Grâce à ce genre de flacons particuliers, il prouve qu'une solution peut être gardée stérile, même au contact d'air non stérilisé (ni filtré, ni chauffé...) et démonte alors la théorie de la génération spontanée. Un coup de grâce lui sera porté par le médecin anglais John Tyndall (1820-1893) et le botaniste allemand Ferdinand Cohn (1828-1898) qui travaillèrent, indépendamment, sur les bactéries. Tyndall démontra en 1877 que la poussière portait effectivement des germes et qu'en son absence, la stérilité était conservée. Cohn, de son côté, montra que certaines bactéries étaient productrices d'endospores. En étudiant la morphologie et la physiologie des microorganismes, il différencia les bactéries, des levures, des moisissures, des infusoires ou encore des parasites. Par leurs travaux, ces premiers microbiologistes ont ainsi mis fin à la théorie de la génération spontanée. Ils ont aussi contribué à de grandes avancées en microbiologie en développant des milieux pour cultiver les bactéries (milieux de culture), des méthodes de stérilisation, et de conservation. Ces avancées permirent, par la suite, de mettre en évidence l'implication des microbes dans les maladies ainsi que dans la fermentation des aliments.

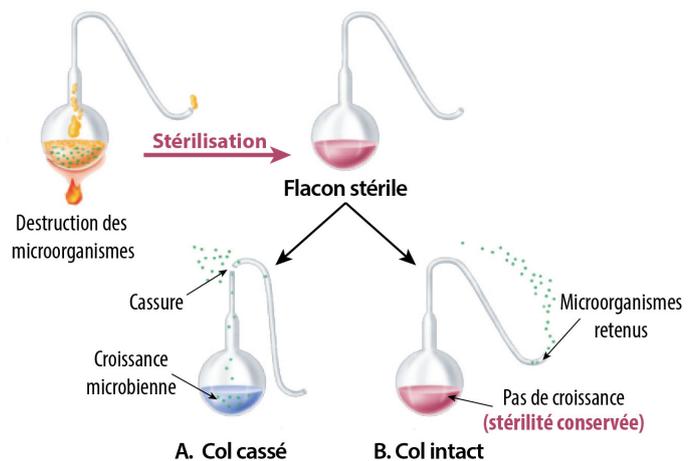


Figure I-4 : Expérience en flacons à col de cygnes de Pasteur
 Pasteur plaça des solutions nutritives dans des flacons, chauffa leurs goulots à la flamme et les étira pour former un col de cygne. Il fit ensuite bouillir chacun des flacons pour stériliser son contenu. A- Dans le cas où le col de cygne était cassé, la solution se retrouvait contaminée. B- Cependant, dans le cas où le col de cygne était maintenu intact, la stérilité de la solution était conservée. Aucune croissance n'apparut, et ce même si les flacons étaient « ouverts » à l'air ambiant via le col de cygne, car les poussières et les germes avaient été piégés sur les parois du tube. Il prouva ainsi que l'air n'était vecteur de contamination microbienne qu'en tant que transporteur de germes. (Image modifiée depuis [19])

I.1.D. Théorie synthétique de l'évolution : la génétique au cœur des variations et de l'hérédité

Concernant la source des variations aléatoires et héréditaires, Darwin parle de hasard, et sa théorie n'a pas besoin de donner d'explications pour être acceptée. Avec les outils de son époque, il était difficile de donner une quelconque explication à ce hasard ainsi qu'au caractère héréditaire des variations. Mais les progrès de la biologie et les outils amenés par le développement de la génétique au début du XXème siècle permettront rapidement à ses successeurs de montrer que sa théorie, formulée un siècle plus tôt, était bien la bonne, avec à l'origine de l'hérédité : les gènes, et des variations : les mutations génétiques.

En 1883, August Weismann (1834-1914), biologiste et médecin allemand, propose une théorie permettant d'expliquer l'hérédité : la théorie du plasma germinatif. Il distingue ainsi chez les organismes

multicellulaires, les cellules germinales (germen), contenant l'information héréditaire et responsable de leur transmission, des cellules somatiques/corporelles (soma), constituant l'organisme et étant responsables des fonctions vitales. Ce que le corps apprend, les capacités qu'il acquiert au cours d'une vie, influencent ainsi uniquement les cellules corporelles, sans affecter les cellules germinales. Il prouve que ces dernières, restant vierges de toute expérience, ne peuvent donc pas transmettre les caractères acquis à la génération suivante, au grand regret des Lamarckiens.

Alors que la théorie du plasma germinatif donnait des pistes de compréhension sur les transmissions héréditaires, elle n'expliquait pas les mécanismes de l'hérédité. Le moyen dont les informations étaient « stockées » restait inconnu, et la source des variations, ne possédait toujours pas d'explication. Une nouvelle compréhension verra le jour grâce à la génétique, née au début du XX^{ème} siècle avec la redécouverte, en 1900, des travaux de Gregor Mendel (1822-1884), moine et botaniste autrichien. Alors qu'à l'époque de Darwin il était imaginé que les caractères présents chez les parents se mélangeaient chez leur progéniture, la découverte des gènes (et des allèles) changea radicalement la compréhension des mécanismes de l'hérédité. La génétique placera ainsi les gènes au cœur de l'hérédité des caractères, bien que les mécanismes moléculaires responsables restent, à l'époque, encore inconnus.

En 1911, la découverte par Thomas Morgan (1866-1945) des mutations génétiques, erreurs génétiques responsables de « l'apparition de nouveaux caractères », donnera l'origine des variations introduites par Darwin. Les variations étaient donc intrinsèquement liées au vivant. Restait à savoir si l'apparition de ces variations était bien aléatoire et indépendante des conditions environnementales extérieures, comme le postulait Darwin. Pour le vérifier, Salvador Luria et Max Delbrück réalisèrent, en 1943, un « test de fluctuation », visant à évaluer les caractères aléatoire et indépendant des mutations génétiques. Leur expérience consistait à mettre des bactéries en présence de phages (virus des bactéries), et à mesurer le taux de mutations face à ce stress. Par leur expérience, ils montrèrent que l'apparition de mutations génétiques permettant leur résistance, était préalable à l'induction du stress [2], prouvant les caractères aléatoire et indépendant des mutations. Comme l'avait pensé Darwin, bien qu'il n'ait pas les outils pour le prouver, les variations sont de nature aléatoire et intrinsèque au vivant.

Plus tard, avec la découverte de l'ADN, support de l'information génétique, identifié pour la première fois en 1869 par le suisse Friedrich Miescher³, ces notions encore abstraites de gène et de mutation génétique trouveront tout leur sens.

Les avancées du XX^{ème} siècle permirent ainsi de compléter la théorie Darwinienne de la sélection naturelle à l'aide de la théorie de l'hérédité Mendélienne et de la génétique pour donner : « la théorie synthétique de l'évolution » (ou néodarwinisme). Cette théorie synthétique met un terme aux débats passés, en donnant explication et justification aux deux axiomes du darwinisme : la variation et l'hérédité. L'évolution s'explique donc uniquement par la sélection naturelle de variations, aléatoires et héréditaires, du génome. La théorie synthétique devient le paradigme de l'évolution à partir du XX^{ème} siècle.

³ Sa structure en double hélice n'a été mise en évidence qu'en 1953 par l'américain James Watson et l'anglais Francis Crick, prix Nobel en 1962 pour leurs travaux.

I.1.E. Vers un enrichissement de la théorie synthétique

Ces deux dernières décennies, les découvertes récentes continuent à venir enrichir nos connaissances sur les mécanismes de l'évolution.

La découverte des phénomènes dits « épigénétiques » commence à lever le voile sur de nouvelles notions, manquantes à la théorie synthétique de l'évolution du XX^{ème} siècle. Ces phénomènes modifient l'expression des gènes sans induire de modifications dans le code génétique. Ils apparaissent sous l'effet de l'environnement (généralement déclenchés par des situations de stress) de manière réversible et transmissible, et affectent donc la descendance. Ils ne reposent pas sur les variations du génome, comme l'hérédité génétique, mais sur l'utilisation qui va être faite des gènes. Ils joueraient néanmoins un rôle significatif dans l'adaptation des populations et l'évolution [3]. Etant non-génétique, cette hérédité est dite épigénétique.

L'épigénétique peut ainsi être vue comme « l'étude des influences de l'environnement sur l'expression des gènes » (Inserm)[4]. Pour faciliter la différenciation entre génétique et épigénétique, nous pouvons utiliser la métaphore : « la génétique renvoie à l'écriture des gènes, l'épigénétique à leur lecture »[5].

Nous découvrons ainsi que les mutations génétiques ne sont pas les seules responsables des variations et de la diversification du vivant. D'autres mécanismes, tels que le transfert horizontal de gènes, ou encore des phénomènes d'interaction entre espèces (symbiogenèse, symbiose, mutualisme...) viennent complexifier la compréhension que nous avons de l'évolution. La sélection naturelle ne se résume pas à une compétition entre les espèces ou les individus. L'évolution a aussi favorisé la coopération, et il s'avère qu'elle est au cœur même de l'évolution.

Nous souhaitons, dans la partie qui suit, montrer l'importance de ces synergies chez les microorganismes et dans le processus d'évolution. Ces synergies émergent au sein de communautés microbiennes et présentent de nombreux bénéfices intéressants à exploiter.

I.2. Les microorganismes et leurs bénéfices

La découverte des microorganismes et la naissance de la microbiologie jouèrent un vrai rôle dans le développement de la théorie de l'évolution. Elles permirent notamment d'en terminer avec la notion de génération spontanée, phénomène dominant pendant des siècles pour expliquer l'origine de la vie. Aujourd'hui nous savons aussi que les microorganismes furent les premiers êtres vivants à être apparus sur Terre, et que certains d'entre eux seraient très proches de l'ancêtre commun à toute forme de vie. Microorganismes, évolution et origine des espèces sont donc très liés. S'intéresser à l'évolution des microorganismes pour chercher à en savoir plus sur l'évolution et l'origine des espèces, semble aller de soi. Cependant, l'intérêt que nous portons aux microorganismes ne s'arrête pas là. Ils jouent aussi un rôle crucial dans l'équilibre et l'évolution du monde du vivant.

Les microorganismes sont souvent vus comme des pathogènes, néfastes pour la santé humaine. Le mot « microbe », communément employé, possède d'ailleurs encore aujourd'hui une connotation négative. Cependant, ces entités invisibles qui nous entourent, présentent de nombreux bénéfices avec des applications dans de nombreux domaines. Cette partie vise à vanter les nombreux avantages des microorganismes, et à montrer en quoi l'étude des communautés de microorganismes, la

compréhension et l'exploitation de leur évolution sont d'une importance capitale pour les enjeux écologiques, sanitaires et industriels de notre temps.

Nous traiterons donc dans cette partie des microorganismes, de l'importance de leur présence et de leurs interactions au cœur du monde vivant. Ensuite, nous présenterons le modèle biologique utilisé au cours de nos travaux et dans la plupart des expériences microbiologiques, à savoir les bactéries. Nous présenterons leur structure cellulaire, leur mode de reproduction et diversification leur permettant une adaptabilité constante à leur environnement. Les deux bactéries utilisées lors de nos travaux seront présentées : *Pseudomonas* et *Escherichia coli*, ainsi qu'une pression de sélection particulière, utilisée au cours de cette thèse pour faire évoluer des populations bactériennes : le stress antibiotique.

I.2.A. Les microorganismes et le monde du vivant

Selon la théorie développée par Darwin, toutes les espèces vivantes descendent, comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, d'un ancêtre commun, aujourd'hui nommé LUCA. Le monde du vivant a ensuite été découpé en trois domaines : bactéries, archées, et eucaryotes, établis par Carl Woese (1928-2012) en 1977 (Figure I-5), suite à ses travaux de comparaison sur l'ARNr (acide ribonucléique ribosomique)[6].

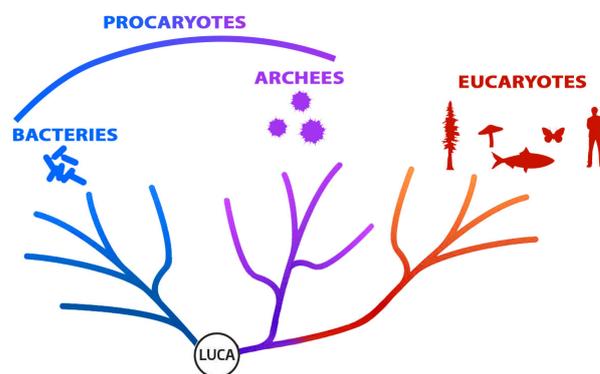


Figure I-5 : Arbre phylogénétique (établi en 1977 par Carl Woese)

Les microorganismes sont des organismes vivants, invisibles à l'œil nu à cause de leur taille microscopique. Extrêmement variés, ils représentent les organismes les plus nombreux, et les plus diversifiés de la planète. Deux des trois domaines du vivant, bactéries et archées, sont des microorganismes procaryotes, dont les cellules ne possèdent ni noyau, ni organite. Le troisième domaine, celui des eucaryotes est quant à lui composé d'organismes dont les cellules possèdent un noyau (où se trouve le matériel génétique) et des organites (Figure I-5). Ce domaine contient les organismes multicellulaires connus que sont : les plantes et les animaux, mais aussi les microorganismes, avec les protistes et les champignons.

Le monde microscopique se compose donc : des bactéries, des archées, des champignons, et des protistes, pour ce qui est des microorganismes cellulaires, auxquels sont parfois ajoutés les « microorganismes » acellulaires : virus, viroïdes et satellites. Ces derniers ne sont pas toujours considérés comme microorganismes, car ils ne peuvent pas se reproduire sans la présence d'un hôte. Il est cependant important de les mentionner, car ils font partie des principaux prédateurs de l'Homme. Ils ont notamment marqué l'histoire de l'Homme à plusieurs reprises avec différentes pandémies (la variole, les gripes espagnole et asiatique, le sida, ou encore le coronavirus), mais ne seront pas abordés dans la suite de cette thèse.

Souvent vus comme néfastes, les microorganismes sont pourtant au cœur de la machinerie de la Terre et sont indispensables au maintien de l'équilibre planétaire.

Formant les groupes d'organismes les plus abondants de la Terre, avec plus de 10^{30} procaryotes estimés [7], les microorganismes sont présents dans la plupart des habitats de la planète. Dans le sol, l'air, les eaux : douces, marines, marécageuses et océaniques, ou encore les profondeurs de la Terre, ils

ont des fonctions primordiales, notamment dans les cycles biogéochimiques avec : la fixation de l'azote, le cycle du carbone, etc. [7]–[9]. Mais les microorganismes se sont aussi adaptés aux conditions les plus extrêmes de la planète : du pôle nord au pôle sud, en passant par les déserts, les mers de sel, les sources chaudes volcaniques, les fonds océaniques... Les archées, ainsi que certaines bactéries, sont aussi présentes dans ces conditions extrêmes, mortelles pour la plupart des autres organismes.

Chez les eucaryotes, les protistes, généralement unicellulaire, pouvant être multicellulaire (sans tissus spécialisés), font partie d'un groupe très hétérogène rassemblant les eucaryotes ne faisant partie ni des champignons, ni des plantes, ni des animaux. Au sein de cette catégorie hétéroclite, les lignées évolutives peuvent donc présenter des parentés très lointaines les unes des autres, mais représenteraient pas moins de 75% de la diversité des eucaryotes. Importants par leur nombre et par leur taille, car bien plus gros que les autres microorganismes (10 à 100 fois, certaines algues multicellulaires pouvant s'assembler sur plusieurs mètres), ils le sont aussi par leurs fonctions. Dans l'eau, ils sont grandement impliqués dans les cycles biogéochimiques. Ils jouent un rôle majeur dans l'épuration de l'eau et la régulation des minéraux. Parmi les protistes, les algues unicellulaires, protistes photosynthétiques présents dans le plancton, base des chaînes alimentaires aquatique, jouent un rôle primordial dans le cycle du carbone. Acteurs majoritaires de la « pompe à carbone biologique », ils transfèrent le gaz carbonique atmosphérique vers les fonds océaniques (par sédimentation) et produisent une grande partie de l'oxygène nécessaire à la planète. Avec les cyanobactéries et certaines archées, ils sont responsables au moins de la moitié de la production de l'oxygène terrestre [8].

Dans la nature, et dans tous les habitats où ils sont présents, les microorganismes n'agissent pas individuellement. Ils s'arrangent sous forme de communautés complexes où des interactions bénéfiques surgissent.

Face aux conséquences des comportements anthropiques sur la planète, les communautés de microorganismes développent des solutions de bioremédiation. La nature a ainsi vu apparaître des communautés dégradant les hydrocarbures [10]–[13] suite aux marées noires, ou encore des communautés dégradant le plastique [14]–[17] due à la pollution humaine. En symbiose avec les plantes, les animaux, ainsi que l'être humain, ces communautés forment des microbiotes : végétal, animal ou humain.

Dans le monde végétal ces communautés sont principalement composées de bactéries et champignons. Avec en moyenne 1 milliard de microorganismes par gramme de sol, ces communautés très diverses (plusieurs dizaines de milliers d'espèces par gramme de sol) sont au cœur de l'écosystème du sol et assurent la croissance et la santé des plantes [18]. Majoritairement présents dans la rhizosphère, région du sol comprenant les trente premiers centimètres de la Terre, ces communautés microbiennes sont en interaction, et même en symbiose avec les plantes, et surtout avec leurs racines (relation mutualiste). Elles interviennent dans la décomposition de la matière organique (humification, minéralisation), recyclent les nutriments indispensables aux plantes (carbone, oxygène, azote, phosphore, potassium...) et facilitent leur absorption par les racines (Figure I-6)[19]. Une mycorhize, par exemple, est une interaction symbiotique entre champignons et racines des plantes. Champignon et plante tirent tous deux des bénéfices de cette interaction. La plante fournit au champignon des éléments qu'il ne peut pas synthétiser (sucres, provenant de la photosynthèse). En contrepartie, le champignon fournit à la plante des nutriments directement assimilables dont elle a besoin. La surface d'exploration de la plante avec ses racines et ses poils absorbants se retrouve multipliée par 1000 grâce

aux hyphes du champignon symbiote, qui colonisent le sol, et absorbent l'eau et les nutriments permettant de multiplier par 10 la croissance de la plante.

Le microbiote du sol participe aussi à la protection des plantes face à des facteurs abiotiques (manque de minéraux, de nutriments), mais également biotiques (pathogènes). Ces communautés, en perpétuelle évolution et adaptation à leur environnement, jouent aussi un rôle important dans la structuration du sol et sa dépollution. La richesse d'un sol dépend donc fortement de la biodiversité microbienne qui le compose. L'étude des communautés microbiennes du sol, et la compréhension des processus évolutifs sous-jacents, représentent donc un véritable enjeu écologique. Leurs bénéfices pourraient par exemple être utilisés en agriculture, pour un enrichissement naturel des sols, ou encore leur bioremédiation, et c'est pourquoi les scientifiques s'y intéressent de plus en plus.

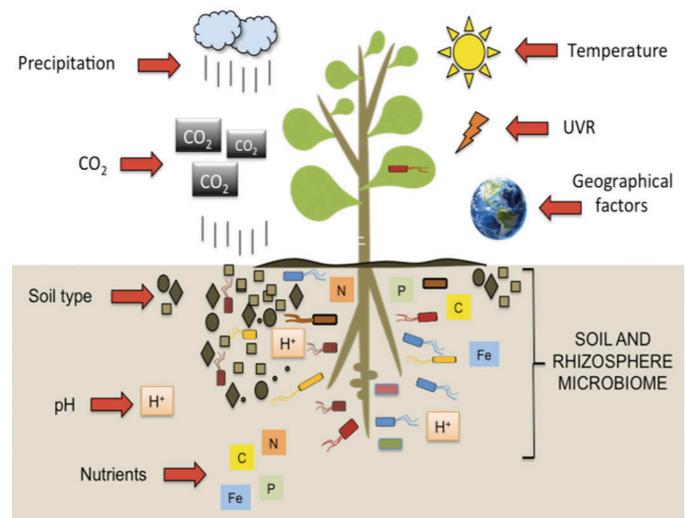


Figure I-6 : Microbiote du sol

Les microorganismes du sol, et notamment de la rhizosphère, sont grandement impliqués dans la vie du sol. Ils participent à la dégradation des matières organiques, sont impliqués dans les cycles des éléments (O, C, N, P, Fe...), aident les plantes à leur croissance et les protègent des pathogènes. [19]

Chez l'Homme, on trouve autant de cellules microbiennes dans et sur le corps humain qu'il n'y a de cellules humaines [20]. En grand nombre sur notre peau, mais surtout dans nos intestins, ces communautés présentent des synergies bénéfiques à notre santé et sont mêmes indispensables à notre survie. Par leurs activités métaboliques collectives et leurs interactions avec leur hôte, ces communautés aident à la digestion, en extrayant les nutriments et l'énergie des aliments, et produisent des vitamines. Elles sont par exemple les seules à pouvoir synthétiser la vitamine B₁₂, indispensable à la vie animale et humaine [21], car impliquée dans la synthèse de l'ADN, le métabolisme des acides gras, des acides aminés et même dans le système nerveux. Sa rareté et son importance ont poussé les scientifiques à développer des méthodes génétiques, reposant sur la biologie synthétique et l'ingénierie métabolique, pour produire cette vitamine à l'aide « d'usines chimiques microbiennes » [21], [22]. Mais les bénéfices des communautés microbiennes ne s'arrêtent pas là. Elles protègent aussi l'hôte de nombreux pathogènes, et participent au bon fonctionnement du système immunitaire [23]. Chez l'Homme, des maladies comme l'obésité, des maladies inflammatoires et les cancers du côlon, pourraient être directement liés à un déséquilibre entre microbiote intestinal et hôte. Pour comprendre comment le microbiote intestinal affecte notre santé, et choisir les bons traitements cliniques, il faut se tourner vers une approche écologique, en considérant les communautés plutôt que les individus.

Comme nous venons de le voir, les microorganismes et leurs interactions sont au cœur du monde du vivant et des processus évolutifs. Par leurs nombreux bénéfices, ils attirent l'attention des scientifiques, qui s'attachent de plus en plus à leur étude. Mais il s'avère que l'Homme tire bénéfice des microorganismes depuis des siècles déjà, en outre avec la fermentation alcoolique (bactérie ou champignons : levures), la production de pain (champignons : levures), de lait fermenté/yaourts (bactéries) ou encore la découverte des antibiotiques (bactéries, champignons).

Aujourd'hui, la microbiologie industrielle continue à exploiter les micro-organismes. De nouvelles capacités à synthétiser des composés naturels leur ont été découvertes. Leurs champs d'application se sont étendus et complexifiés, et touchent d'importants domaines : agroalimentaire, médecine, agronomie, industrie chimique, énergies et autres processus industriels. Ainsi, les microorganismes sont impliqués dans la production de produits fermentés (fromages, yaourts, vin, bière, pain), d'additifs alimentaires (acides aminés, acides organiques, nucléotides, vitamines), de produits médicaux (antibiotiques, stéroïdes, insuline, hormone de croissance), de produits agricoles (hormones végétales : gibbérellines), de produits chimiques (enzymes, protéines, biopolymères, biotensioactifs, éthanol, acétone...), ou encore de biocarburants (hydrogène, méthane, éthanol)[24].

Cependant, avec seulement 1% des microorganismes déjà découverts et étudiés [24], la nature nous propose des ressources inestimables, qui restent aujourd'hui encore inexploitées. Comprendre les interactions et l'évolution de telles communautés de microorganismes, dans le but de les reproduire, et d'en exploiter leurs bénéfices, représente donc un enjeu capital de notre temps, avec des répercussions écologiques, sanitaires et industrielles.

I.2.B. Les bactéries, modèle de laboratoire

La solution pour exploiter les interactions microbiennes présentes dans la nature repose dans le processus au cœur de la diversification du vivant : l'évolution par sélection naturelle. Mais avant de voir comment travailler expérimentalement sur leur évolution (traité en I.3), nous souhaitons présenter plus en détail le type de microorganismes le plus souvent étudié : les bactéries. Ces microorganismes modèles sont des outils essentiels en biologie. Cette sous-partie nous permettra de présenter leur structure, leur mode de reproduction, de diversification et d'adaptation face à un stress, par exemple antibiotique. Enfin nous présenterons les deux souches bactériennes utilisées lors de cette thèse, à savoir *Escherichia coli* (modèle classique de laboratoire) et *Pseudomonas Fluorescens*, ainsi que leurs implications dans leur milieu naturel.

I.2.B.1. Structure cellulaire bactérienne

Les bactéries sont des microorganismes procaryotes, généralement unicellulaires, pouvant être multicellulaires. Comme nous l'avons évoqué précédemment, elles font parties des premières formes de vies à s'être développées sur Terre et sont présentes dans la plupart des habitats de la planète. Elles sont de taille micrométrique, souvent comprises entre 0,2 μ m et 2 μ m, et de formes variées, sphériques (nommées « coques »), en bâtonnets (nommées « bacilles »), ou de forme quelconque. Les bactéries peuvent vivre individuellement en suspension dans un liquide (comportement planctonique) ou s'agréger face à certaines conditions du milieu, pour mieux survivre. Elles peuvent aussi former des colonies sur un substrat, ou encore adhérer à des surfaces, créant ainsi des biofilms. Les biofilms sont des communautés complexes, formées par une ou plusieurs espèces de bactéries (ou autres microorganismes) cohabitant, coopérant et se différenciant en vue de se protéger, par la sécrétion d'une matrice extracellulaire. Ils permettent ainsi une meilleure résistance face à de nombreux stress extérieurs: antibiotiques, changement de température, de pH, agent toxique, ou encore face à des microorganismes pathogènes.

En tant que procaryotes, les bactéries présentent une structure cellulaire plutôt simple (Figure I-7). Ne possédant pas de noyau, leur matériel génétique « flotte » directement dans le cytoplasme, délimité par la membrane cytoplasmique, puis la paroi de la cellule. Le cytoplasme ne contenant pas d'organites spécialisés, toutes les réactions permettant la production d'énergie, le maintien en vie, ou la division cellulaire, ont lieu dans le cytoplasme. Il ne contient donc que quelques éléments essentiels dont l'ADN et les ribosomes. L'ADN double-brin, généralement rassemblé sous la forme d'un chromosome unique et circulaire, est le support de l'information génétique. On appelle génotype l'ensemble de cette information (transmise à la descendance). Le phénotype, lui, désigne l'ensemble des propriétés observables d'un organisme. Il peut varier selon le temps et l'environnement. Les ribosomes, quant à eux, permettent la synthèse des protéines. A cela s'ajoutent les enzymes, protéines et ARN nécessaires au métabolisme et circulant librement dans la cellule. Parfois, on peut aussi y trouver des plasmides, petites molécules d'ADN circulaire libre non essentielles à la survie des bactéries mais pouvant présenter des fonctions intéressantes (ex : résistance antibiotique).

La paroi cytoplasmique (ou plasmique) permet des échanges contrôlés entre intérieur et extérieur de la cellule. La paroi cellulaire, quant à elle, constitue le « squelette externe » de la cellule, assure sa structure mécanique et peut être le support de certaines enzymes. Deux types de parois existent et peuvent être identifiées par une technique de coloration, « appelée coloration de Gram ». Les bactéries possédant une unique membrane épaisse de peptidoglycanes sont dites Gram positives, car réagissant positivement à la coloration. Les autres, possédant une fine membrane de peptidoglycanes à laquelle vient s'ajouter une membrane externe lipidique, sont dites Gram négatives, car réagissant négativement à la coloration.

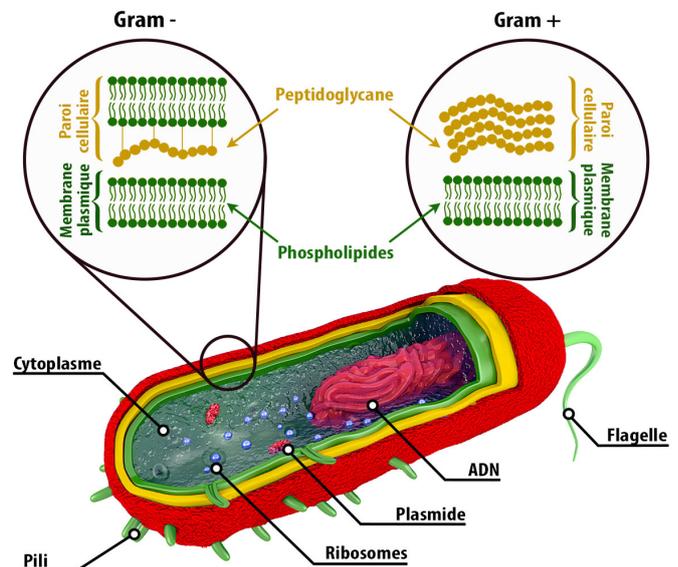


Figure I-7 : Structure cellulaire d'une bactérie

Ce schéma présente la structure cellulaire d'une bactérie et met en évidence ces principaux composants. Un grossissement sur la membrane plasmique et la paroi cellulaire permet de souligner la différence entre les cellules à Gram- et à Gram+.

Enfin, les bactéries peuvent parfois posséder des structures extracellulaires. En présence de cils et/ou flagelles, elles sont capables de se déplacer. Les pili ou fimbriae, sorte de « poils » à la surface des bactéries, interviennent quant à eux dans l'adhésion des cellules à des surfaces ou à d'autres organismes. Des pili particuliers, les pili sexuels, exprimés par des plasmides (nommés facteur F), permettent à deux bactéries de s'appareiller (conjugaison) pour s'échanger du matériel génétique sous forme de plasmides (transfert horizontal). Cette transmission, d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse, peut concerner des plasmides de résistance aux antibiotiques (facteur R), de synthèse de protéines ou encore au pouvoir pathogène.

I.2.B.2. Cycle cellulaire bactérien

Les bactéries ont la particularité de pouvoir se reproduire de manière autonome, par division cellulaire (Figure I-8 A). Dans un premier temps, la bactérie s'allonge tout en dupliquant son matériel génétique, afin d'obtenir deux répliques identiques. Ensuite, chacun d'eux migre aux deux pôles de la cellule, avant que cette dernière ne se divise en son milieu, pour donner naissance à deux cellules filles indépendantes et identiques. Les éventuels plasmides libres présents dans la cellule se répartissent alors de manière équivalente dans une des deux cellules filles. Une cellule mère donnant naissance à deux cellules filles à chaque division cellulaire, la croissance bactérienne est exponentielle.

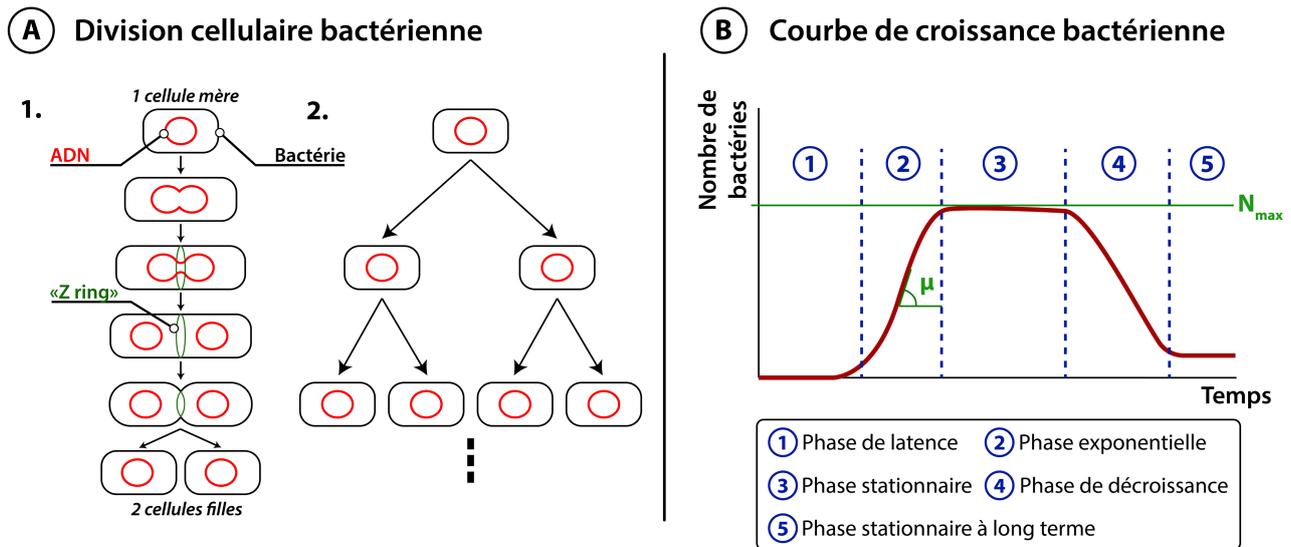


Figure I-8 : Cycle cellulaire et croissance bactérienne

(A) 1 - La division cellulaire se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps, la bactérie s'allonge tout en répliquant son chromosome. Chacun des chromosomes (copies identiques) migre vers un des pôles de la cellule en même temps que l'anneau de division (« Z ring ») se met en place en son centre. L'anneau se resserre alors pour provoquer la division. Cette constriction est accompagnée de la synthèse de la paroi cellulaire, jusqu'à individualisation complète des 2 nouvelles cellules. 2 - La division d'une cellule mère en deux cellules filles conduit à une croissance exponentielle. (B) Croissance bactérienne dans un environnement limité en ressources.

Dans des conditions de cultures classiques de laboratoire, où les ressources ne sont pas renouvelées, la croissance bactérienne sera limitée dans le temps, par manque de nutriments (Figure I-8 B).

Ainsi cinq phases se distinguent durant la croissance d'une population bactérienne (ou microbienne):

1. La phase de latence, durant laquelle les bactéries s'adaptent à leur milieu, sans se multiplier. La durée de cette phase dépend principalement des changements du milieu et des microorganismes en question.
2. La phase exponentielle, durant laquelle les bactéries se multiplient et voient leur nombre doubler à intervalles réguliers, car les ressources sont en excès. Cet intervalle de temps, durant lequel le nombre de bactéries de la population double, est appelé : temps de génération θ . Durant la phase exponentielle, on peut donc calculer le nombre d'individus N dans la population (ayant pour taille initiale N_0) par l'équation : $N = 2^n N_0 = 2^{\mu t} N_0$, où n est le nombre de générations, et μ le taux de croissance ($\mu = \frac{dn}{dt}$)

3. La phase stationnaire, durant laquelle la croissance s'arrête ou un équilibre entre division et non-division est atteint. Ces phénomènes font suite à l'épuisement d'un des nutriments essentiels à la croissance bactérienne ou à l'accumulation de déchets ou d'éléments toxiques dans le milieu. Dans cette phase, le nombre de bactérie atteint son maximum N_{max} , définissant ainsi le rendement en biomasse final.
4. La phase de décroissance, durant laquelle les bactéries ne se dupliquent plus et meurent à taux constant, ou entrent en dormance, par manque de nutriments et augmentation des déchets toxiques.
5. La phase stationnaire à long terme, durant laquelle certaines bactéries restent en dormance, et peuvent, en cas de renouvellement des conditions de culture, croître à nouveau.

En plus de leurs nombreux bénéfices, les bactéries (et autres microorganismes) présentent donc de nombreux avantages face à l'étude de leur évolution. Leur petite taille, de l'ordre du micromètre, permet la manipulation facile de larges populations dans de petits volumes, avec environ 10^9 cellules dans 1mL de solution (à saturation). Leur temps de génération, ultra-court face à l'échelle de temps humaine (de quelques dizaines de minutes à quelques heures), permet d'obtenir de nombreuses générations en peu de temps. Enfin, leurs conditions de croissance, relativement simple à mettre en œuvre en laboratoire, et la possibilité de les stocker indéfiniment par congélation en font des candidates parfaitement adaptées à l'étude de l'évolution.

Bien que nous vantions tout particulièrement les bienfaits des microorganismes et des bactéries dans cette thèse, il faut aussi évoquer leurs effets néfastes sur la santé humaine. Souvent responsables des infections (typhoïde, choléra, tuberculose, méningite, pneumonie, infection urinaire, ...), ces bactéries pathogènes peuvent ou non appartenir à la flore humaine commensale. Lorsque vivantes dans le corps humain, et bien que pathogènes, ces bactéries ne provoquent généralement pas de maladies chez les sujets sains. Mais suite à une diminution des défenses immunitaires de l'organisme ou chez les sujets aux défenses immunitaires altérées (immunodéprimés), ces bactéries opportunistes peuvent trouver un avantage sélectif et provoquer des maladies. Leur pathogénicité représente d'ailleurs une raison de plus pour laquelle il est intéressant de les étudier en laboratoire, en vue de trouver des traitements adaptés.

Nous souhaitons désormais présenter rapidement deux bactéries très répandues dans le monde scientifique et que nous avons utilisé dans ces travaux de thèse : la bactérie *Pseudomonas*, présente dans de nombreux environnements naturels (sol, eau...) et chez les mammifères, et la bactérie *Escherichia Coli*, appartenant à la flore commensale intestinale des mammifères et très présente chez l'Homme.

I.2.B.3. *Pseudomona fluorescens*

Les *Pseudomonas* sont des bacilles (bactéries en forme de bâtonnet) gram négatifs de taille comprise entre 2 et 4 μ m, aérobies (ayant besoin d'oxygène pour vivre et se développer), mobiles (à l'aide de flagelles), et largement répandues dans l'environnement. Très présentes dans les sols, elles colonisent aussi des niches écologiques dans les milieux aqueux, et font partie de la flore commensale des animaux ou des humains. Elles peuvent être pathogènes, comme la souche opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales.

Dans notre cas, nous avons travaillé avec l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (non pathogène), et plus particulièrement avec la souche *Pseudomonas fluorescens* SBW25. Cette souche fût isolée en 1989 à partir des feuilles de betteraves sucrières cultivées dans l'Oxfordshire, et des marqueurs génétiques lui furent ajoutés avant qu'elle soit réintroduite dans la nature en 1993 [25]. Les *Pseudomonas fluorescens* sont des bactéries communément trouvées dans le sol et qui sont impliquées dans le cycle des nutriments des plantes, stimulant leur croissance, améliorant leur santé et leurs défenses. Elles suppriment par exemple les maladies des plantes en protégeant les graines et les racines contre les infections fongiques. Dans cette tâche, leur croissance rapide face aux pathogènes (4h pour les *Pseudomonas* face à 24-48h pour les pathogènes) leur confère un avantage compétitif, leur permettant de coloniser rapidement la rhizosphère et d'agir avant le développement de ces derniers. Ainsi, cette bactérie rhizosphérique phytoprotectrice des racines (PGPR, de l'anglais « Plant Growth Promoting Rhizobacteria ») présente des avantages pour d'importantes applications biotechnologiques. Elle peut être utilisée à des fins écologiques, dans la bioremédiation de divers composés organiques des sols, ou encore à des fins agronomiques, avec le bio-contrôle face à des maladies ou l'amélioration de la croissance des plantes. De plus, cette souche présente de nombreux avantages pour être étudiée en laboratoire, car elle présente des conditions de croissance simples. Elle se développe très bien dans des milieux de sels minéraux complétés d'une source de carbone (ex : LB, M9 enrichi), et à des températures entre 0° et 30°C. Dans des conditions de croissance optimales (milieu riche, 28°C), leur temps de génération passe de 4h à 40min, leur conférant ainsi un avantage supplémentaire pour étudier leur évolution. De plus, cette souche produit naturellement un pigment fluorescent et soluble vert (la pyoverdine), pouvant être utilisé comme bio-marqueur naturel. Cette souche possède la capacité de solubiliser le fer et la production de fluorescence est d'autant plus grande dans des conditions de faible disponibilité en fer.

I.2.B.4. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie bacille gram négative, de taille comprise entre 0.5 et 3µm, aéro-anaérobie (utilisant l'oxygène mais pouvant s'en passer), découverte en 1885 par Theodor Escherich. Elle appartient à la flore commensale intestinale des mammifères et constitue l'espèce bactérienne dominante (80%) de la flore intestinale aérobie de l'Homme. De nombreuses souches de cette bactérie existent et sont nécessaires au bon fonctionnement du microbiote intestinal. Elles participent à la digestion et luttent, grâce à leur prolifération rapide, contre l'implantation d'autres bactéries pathogènes. Bien que la plupart d'entre elles soient inoffensives, certaines peuvent présenter un caractère pathogène opportuniste chez des sujets immunodéprimés. Elles peuvent être à l'origine d'intoxications alimentaires, de gastro-entérites, mais aussi d'infections urinaires, de méningites, voire même de septicémies. Les antibiotiques permettent généralement de traiter efficacement les infections d'origine bactérienne, et donc les maladies dues à *E. coli*. Cependant de plus en plus de bactéries développent des résistances, suite à la sur-utilisation des antibiotiques (discuté en I.2.C.2).

E. coli étant très facile à cultiver en laboratoire, et possédant un temps de division de 20 minutes dans des conditions optimales (à 37°C, dans un milieu riche), elle s'est imposée comme modèle d'étude de prédilection. Elle est aujourd'hui le microorganisme le plus étudié par les scientifiques. Les avantages qu'elle présente, font d'elle une candidate parfaite pour l'étude de l'évolution, et notamment pour l'étude de l'adaptation face à un stress antibiotique. Dans nos travaux d'antibiorésistance nous utiliserons la souche *E. coli* K-12 BW25113 [26], dérivée de la souche sauvage K-12, une des souches les plus documentées.

I.2.C. Adaptabilité et diversification des bactéries face à un stress

Dans la première partie de ce chapitre (I.1.E) nous avons introduit brièvement que les mutations n'étaient pas l'unique source de variations et que d'autres mécanismes en étaient aussi responsables (transfert horizontal, épigénétique...). Ce paragraphe vise à présenter l'ensemble des sources de variations chez les bactéries, responsables de leur diversification et donc de leur adaptabilité face à un stress. Aussi, ce paragraphe permettra de présenter un stress souvent étudié en laboratoire et dont nous traiterons régulièrement au cours de ce manuscrit : le stress antibiotique. En effet, le phénomène de résistance aux antibiotiques chez les bactéries est un problème grandissant de notre siècle. Il soulève l'attention de la communauté scientifique, qui s'attèle à acquérir une meilleure compréhension de ce phénomène et cherche des solutions pour y remédier.

I.2.C.1. Les sources des variations et de la diversification intra-population

Nous souhaitons tout d'abord mettre en évidence les différentes sources des variations, causant la diversification chez les bactéries, et au sein de populations bactériennes (diversité intra-population). Ces variabilités sont importantes car ce sont elles qui permettront à une lignée de se diversifier au cours du temps, et donc de mieux s'adapter face à un changement environnemental. Dans la première partie de ce chapitre (I.1.D) nous avons introduit que la principale source des variations était génétique, avec les mutations. Mais nous avons également évoqué d'autres mécanismes, non-génétiques (épigénétiques) pouvant être responsables de variations (I.1.E), et donc de diversification. Ainsi, deux « classes » de variations sont au cœur de la diversification : les variations non-génétiques, et les variations génétiques.

I.2.C.1.1. Variations non-génétiques

Les variations non-génétiques, peuvent être spontanées ou induites par l'environnement (épigénétique).

Dans le premier cas, elles sont dues à un phénomène appelé : bruit d'expression génétique. Ce bruit concerne le métabolisme propre de chaque bactérie, et conduit à des variations de production de protéines par cette dernière. Ce bruit vient de l'accumulation des fluctuations présentes lors des étapes menant à la production d'une protéine : variation du nombre d'ARN messagers transcrits à partir d'un gène, ainsi que du taux de traduction de l'ARNm en protéine. Le bruit d'expression génétique affecte donc l'état phénotypique des bactéries au niveau individuel, qui varie au cours du temps, mais n'est pas héritable. Cependant, grâce à l'héritage cytoplasmique (molécules et protéines présentes dans le cytoplasme) légué par une cellule mère à sa descendance lors de la division cellulaire, une cellule fille peut se retrouver présenter un avantage sélectif instantané face à un certain stress ponctuel. Prenons l'exemple d'un stress antibiotique pour illustrer ces propos. Imaginons qu'une bactérie hérite d'un nombre conséquent d'enzymes dégradant un antibiotique suite à la division cellulaire de son ascendance. Face à un stress soudain de ce même antibiotique, cette dernière sera en mesure de résister, et aura un temps de survie instantané accru. En cas de maintien du stress, cette stratégie ne lui permettra pas de survivre, mais le sursis dont elle aura bénéficié pourra lui permettre, par exemple, de développer un mécanisme de résistance pour le long terme, et d'assurer la survie de sa descendance. Le

bruit d'expression génétique, bien que n'étant pas héréditaire, peut néanmoins participer à l'adaptabilité d'une bactérie.

Dans le cas où les variations sont dites d'origine épigénétique, ce sont des changements environnementaux qui provoquent des changements dans l'expression des gènes, entraînant des changements phénotypiques. Pour reprendre la métaphore utilisée précédemment, et qui permet de différencier génétique et épigénétique : « la génétique renvoie à l'écriture des gènes, l'épigénétique à leur lecture »[5]. Deux facteurs principaux sont responsables de cette lecture : le réseau de régulation de l'expression des gènes, fournissant les facteurs de transcription, et l'état de compaction de l'ADN, déterminant l'accessibilité de l'ADN aux régulateurs transcriptionnels, influençant donc l'expression des gènes. Un grand nombre de réponses à certaines conditions sont déjà programmées dans le génome des bactéries, mais ne vont pas être activées tant qu'une des conditions en question n'est pas rencontrée. Cependant, en présence d'une situation programmée, une bactérie va pouvoir s'adapter rapidement (temps inférieur à la durée de génération) en modifiant simplement l'expression de ses gènes pour réguler positivement (activateurs), ou négativement (répresseurs) la synthèse ou l'activité de certaines protéines.

Néanmoins, le réseau de régulation de l'expression des gènes n'est pas le seul acteur de cette lecture. La lecture des gènes, et donc leur expression, est majoritairement affectée par leur accessibilité. En effet, toutes les parties codantes de l'ADN ne sont pas accessibles, et donc pas lisibles, car pour gagner de l'espace, l'ADN adopte des formes compactes. Chez les eucaryotes, il s'enroule autour de protéines, appelées histones, et forme ainsi la chromatine. Chez les procaryotes, bien que la chromatine n'existe pas, des processus similaires de compaction ne favorisant pas l'expression des gènes existent. Pour gérer l'accessibilité aux gènes, les cellules disposent donc de divers mécanismes. La méthylation de l'ADN, mécanisme par lequel un groupement méthyle vient se fixer sur un gène, diminue son accessibilité aux facteurs de transcription, et peut conduire à l'inhibition de son expression. Au contraire, l'acétylation va favoriser l'expression d'un gène en favorisant son accès aux régulateurs. Ces mécanismes sont durables, et réversibles. La probabilité de changement d'état de l'expression d'un gène étant faible au cours d'une génération (10^{-2} à 10^{-4}), il est courant que les états des cellules mères soient transmis à leurs filles, générant une certaine forme d'hérédité. Ceci peut conduire à la présence simultanée de différents états phénotypiques au sein d'une population clonale. Ce phénomène, appelé variation de phase, crée de la diversité au sein d'une population, et contribue à son adaptabilité. Plus fréquentes que les mutations, qui sont de plus aléatoires et non dirigées, la variation de phase peut permettre à des bactéries de résister ou de s'adapter à des stress rapidement. C'est une stratégie de « minimisation des risques », car chaque phénotype peut présenter un avantage face à certaines conditions. En cas de stress, elle peut permettre à des bactéries présentant un certain état phénotypique de survivre, au lieu de conduire à l'extinction de la population. Il arrive parfois, chez certains organismes (par exemple *E. coli*) que la méthylation soit irréversible, due au manque des enzymes nécessaires. Dans ce cas, seule la réplication de l'ADN pourra changer l'état d'expression de ses gènes.

I.2.C.1.2. Variations génétiques

La seconde classe de variations étant au cœur de la diversification sont les variations génétiques, affectant « l'écriture des gènes ». Ces variations, si elles sont viables, sont héréditaires car elles modifient directement le génome.

Au cœur des variations génétiques se trouvent les mutations, spontanées, aléatoires et héréditaires. Nous souhaitons revenir sur cette notion, déjà introduite, afin d'en fournir une compréhension plus approfondie. Il existe en effet des mutations neutres, créant de la diversité génétique mais pas nécessairement phénotypique, et des mutations qui joueront sur l'adaptabilité, et donc la survie et la reproduction, des bactéries (favorables, ou délétères). Ces mutations sont dues à des erreurs faites lors de la réplication de l'ADN, et apparaissent à une certaine probabilité, qu'on nomme « taux de mutation ». Chez *E. coli*, par exemple, ce taux de mutation est de 5.10^{-10} par paire de base [27]. Le génome d'*E. coli* comportant environ 5 millions de nucléotides [27], on peut estimer qu'un mutant apparaît toutes les 10 000 réplifications. Dans une population de plusieurs millions (voire milliards) de bactéries, l'apparition de mutations est donc assez courante. Néanmoins, toutes ne présentent pas d'intérêt dans l'adaptabilité, ou ne sont pas codantes (elles peuvent être synonymes). On estime à 10^{-7} la probabilité qu'une mutation apparaisse sur un gène spécifique lors de la réplication. Mais cela, sans considérer le fait que le taux de mutation n'est en fait pas constant sur l'ensemble du génome. En effet, il existe des « points chauds » au sein de l'ADN où le taux de mutation est beaucoup plus élevé (100 à 10^5 fois). Le plus souvent, ces points chauds sont liés à la régulation réversible d'un gène (activation/désactivation). Ils participent ainsi au processus de variation de phase, mais ces variations s'appliquent généralement sur des temps plus longs que celles induites par les phénomènes épigénétiques et participent à l'adaptation sur le plus long terme. Bien que les mutations soient d'origine aléatoire, et indépendantes de l'environnement, il semblerait que certaines situations de stress entraînent une augmentation du taux de mutation [28], [29].

D'autres phénomènes génétiques sont aussi source de variations chez les bactéries. Nous avons précédemment évoqué le transfert horizontal de gènes, sans en expliquer réellement le concept. Le transfert horizontal est un mécanisme par lequel un organisme va intégrer du matériel génétique provenant d'un autre organisme. Ce processus, très répandu chez les procaryotes, et donc chez les bactéries, représente l'un des facteurs principaux de leur diversification et de leur adaptabilité. Il peut s'opérer sous différentes formes. La première est la conjugaison. Elle permet à deux bactéries de s'appareiller (par pili sexuel) pour s'échanger du matériel génétique sous forme de plasmide (comme nous l'avons vu en I.2.B.1). La conjugaison joue notamment un rôle primordial dans la résistance aux antibiotiques, avec le transfert du facteur R (plasmide de résistance aux antibiotiques). La seconde forme est la transformation. Elle résulte de la prise de matériel génétique extracellulaire (provenant d'une bactérie morte...) par un autre organisme. La dernière est la transduction. Elle s'opère par l'intermédiaire d'un virus, qui va prélever un échantillon d'ADN d'une cellule « donneuse » pour le réintroduire dans une cellule « receveuse ».

Pour conclure, il est important de souligner que pour favoriser la diversification intrapopulation, il est préférable de travailler avec des populations aussi grandes que possible, et sur un nombre suffisant de générations. En effet, plus une population est grande et diverse, plus elle a de chance de s'adapter à un changement environnemental. Si nous prenons l'exemple de *E. coli* (ou des *Pseudomonas*), avec plus de 1 milliard de bactéries par millilitre à saturation, et un temps de génération inférieur à l'heure, l'avantage de travailler sur les microorganismes est manifeste. De telles conditions génèrent une grande diversité au sein d'une population, diversité qui est ensuite la clef de l'adaptabilité.

I.2.C.2. Une pression de sélection : le stress antibiotique

Maintenant que les mécanismes de diversification chez les bactéries ont été abordés, nous souhaitons présenter une pression de sélection particulière : le stress antibiotique. Nous y ferons références à plusieurs reprises au cours de ce manuscrit, et il semble donc pertinent d'en fournir une meilleure compréhension.

I.2.C.2.1. Modes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques furent découverts en 1928 par Alexander Fleming (1881-1955), médecin et biologiste britannique. Il s'aperçut que certaines des cultures bactériennes qu'il avait laissées de côté avaient été contaminées par des *Penicillium notatum*, champignons étudiés par son voisin de paille. Il observa que ces derniers inhibaient la reproduction des bactéries, et découvrit ainsi le premier antibiotique : la pénicilline. En effet, les antibiotiques sont d'origine naturelle, produits par des microorganismes pour éliminer les bactéries concurrentes et s'imposer dans leur environnement. Aujourd'hui, il en existe des versions synthétiques, dérivées des composés naturels afin de les adapter à une utilisation humaine. Deux catégories d'antibiotiques existent, les bactériostatiques inhibent la croissance bactérienne alors que les bactéricides les détruisent (bien qu'à faible dose, ils puissent agir comme des bactériostatiques). Pour parvenir à leur fin, différents modes d'action spécifiques sont employés, mais concernent toujours une étape essentielle du développement cellulaire. Le premier mode d'action concerne la membrane cellulaire, qui peut être dégradée (agents polycationiques ou polyéniques) ou dont la synthèse peut être bloquée (ex : β -lactamines, glycopeptides, ...), conduisant dans les deux cas à la lyse cellulaire. Le deuxième mode s'attaque au génome bactérien, en altérant la transcription de l'ADN (rifamycines), sa réplication (fluoroquinolones), ou encore la synthèse des bases nucléiques (sulfamides). Le dernier mode cible le ribosome bactérien et affecte la synthèse des protéines (phénicolés : inhibition des liaisons peptidiques, aminosides/tétracyclines : inhibition de l'élongation protéique, ...).

Depuis leur découverte au début du XX^{ème} siècle, les antibiotiques ont fait preuve d'efficacité pour combattre les maladies infectieuses et ont considérablement réduit le taux de mortalité associé. En dépit de nombreuses désincantations face à leur sur-utilisation, leur efficacité remarquable a motivé leur utilisation massive et répétée ces dernières années chez l'Homme (en milieu hospitalier comme en ville), comme chez les animaux (pour l'élevage) (Figure I-9). Cette sur-utilisation a conduit à la création d'une pression de sélection sur les populations bactériennes, favorisant ainsi l'apparition et le développement de résistances aux antibiotiques chez les bactéries [31]. En effet,

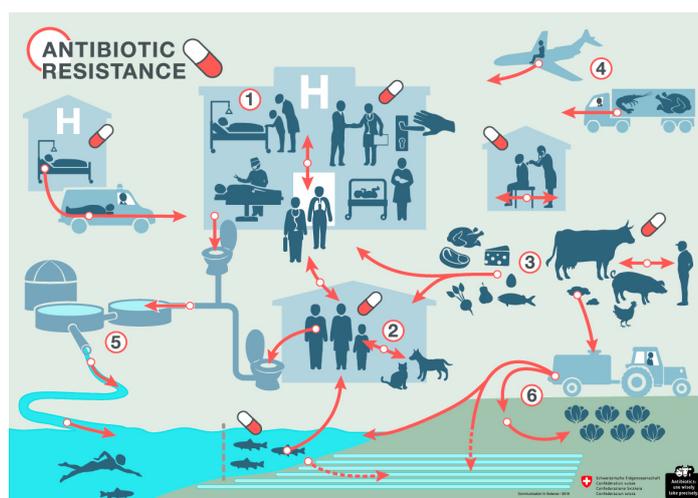


Figure I-9 : Causes de l'antibio-résistance

La sur-utilisation des antibiotiques a conduit au développement de résistances chez les bactéries. Ce phénomène est difficile à combattre car les souches résistantes se propagent dans (1) hôpitaux, (2) les foyers ainsi que par (3) les animaux, (4) les transports, (5) les eaux usées ou encore (6) l'agriculture. [30]

les bactéries (comme tout être vivant) sont en perpétuelle évolution et cherchent en permanence à s'adapter à leur environnement. Il en est de même face à un stress antibiotique. Les mécanismes responsables des variations et de la diversification intra-population aident alors à l'adaptabilité face à un tel stress, en permettant aux bactéries de développer des solutions de défense. Deux stratégies majeures sont adoptées. La première s'attaque à l'antibiotique, en tentant de l'inactiver ou de l'expulser de la cellule. La deuxième vise à protéger la cible de l'antibiotique, en la rendant inaccessible ou en produisant des cibles attirant préférentiellement l'antibiotique, mais étant neutres dans le métabolisme bactérien (sortes de « leurres »).

Au départ, ce phénomène d'antibio-résistance n'était que ponctuel, initialement apparu en milieu hospitalier où les antibiotiques étaient majoritairement utilisés. Il s'est ensuite généralisé à cause d'un usage massif et non approprié des antibiotiques (ex : stimulateur de croissance chez l'animal, posologies inadaptées chez les humains) (Figure I-9). Ce phénomène global illustre parfaitement la théorie de l'évolution par la sélection naturelle de Darwin, et place la résistance aux antibiotiques au cœur des grands problèmes sanitaires du XXIème siècle.

I.2.C.2.2. Quantification de l'efficacité d'un antibiotique

Pour mieux comprendre quels sont les mécanismes évolutifs impliqués dans le développement de résistances bactériennes aux antibiotiques, et en vue de trouver des solutions adaptées, l'étude expérimentale en laboratoire est tout à fait pertinente (nous en verrons des exemples dans la partie qui suit I.3). Lors de telles expériences, ainsi que pour une utilisation adéquate, il est nécessaire de pouvoir accéder à une mesure quantitative de l'efficacité d'un antibiotique. Pour cela, le paramètre le plus couramment utilisé est la valeur de la concentration minimale en antibiotique permettant l'inhibition de la croissance de la souche en question (MIC pour « Minimal inhibitory concentration»). Elle permet d'évaluer l'efficacité d'un antibiotique face à une souche donnée, ou la résistance d'une souche face à un antibiotique donné. Cette valeur peut être mesurée simplement, en exposant la souche bactérienne à un gradient de l'antibiotique en question (Figure I-10).

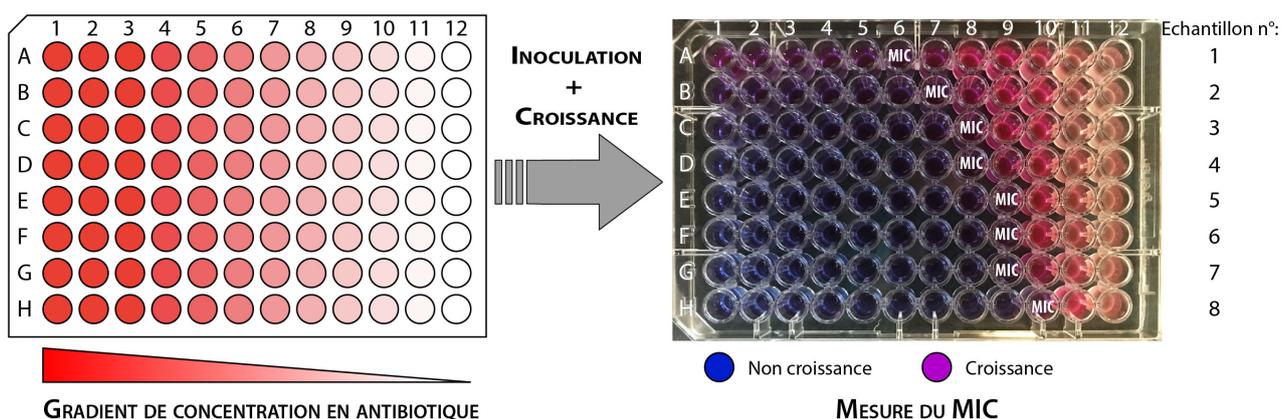


Figure I-10 : Méthode de mesure du MIC

Afin d'effectuer la mesure d'un MIC, il est nécessaire d'exposer la souche bactérienne voulue à un gradient de l'antibiotique en question. Dans notre cas, le MIC est mesuré sur plaque à puits selon la méthode de standard [32]. Un gradient d'antibiotique est réalisé dans chacune des lignes horizontales d'une plaque 96-puits. Puis, chacune de ces lignes est utilisée pour une mesure de MIC. On inocule les différents échantillons à tester (1 ligne = 1 échantillon), à une concentration en bactérie de $5 \cdot 10^4$ bactéries/puits, on ajoute un marqueur de viabilité des cellules, la résazurine (normalement bleue elle devient rose en cas de respiration), puis on laisse les bactéries croître 24h. Après incubation à 37°C , la plus faible concentration inhibant la croissance (dernier puits bleu) donne la valeur du MIC associé pour chaque échantillon.

En plus du MIC, d'autres paramètres de quantification sont utilisés, et notamment la mesure de la concentration inhibitrice nécessaire pour obtenir un certain pourcentage (ex : 50%) du taux de croissance initial des bactéries en question (IC50, pour « 50% of the Inhibitory Concentration »). Ce paramètre peut être utilisé pour mesurer n'importe quel pourcentage du taux initial, les plus souvent utilisés étant l'IC10 et l'IC50. Pour les mesurer, il est nécessaire de connaître le taux de croissance de la population bactérienne non soumise à l'antibiotique (initial), puis d'exposer la population à un gradient d'antibiotique et de mesurer l'ensemble des taux de croissances pour déterminer lequel correspond à 10 ou 50% du taux initial.

Nous verrons, dans la prochaine partie de ce chapitre (I.3), que le problème sanitaire de la résistance bactérienne aux antibiotiques est largement pris en compte au sein de la communauté scientifique. Il est crucial pour la santé publique mondiale de comprendre l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques, afin d'identifier les mécanismes sources de cette adaptabilité, et de trouver de nouvelles solutions. Aujourd'hui, deux tiers des antibiotiques sont des produits microbiens naturels [7], et comme mentionné en I.2.A, seulement 1% des microorganismes ont déjà été cultivés. L'environnement comporte des ressources inexploitées, et nous avons tout intérêt à développer des outils permettant la culture des communautés présentes dans la nature ainsi que l'étude de leur évolution.

I.3. Études expérimentales d'évolution microbienne

Comme nous venons de le montrer, la nature regorge de communautés microbiennes aux ressources indénombrables. Un intérêt croissant pour l'évolution des microorganismes, et en particulier des bactéries (candidates « parfaites »), se fait ressentir au sein de la communauté scientifique. Les enjeux en sont doubles. D'une part les scientifiques s'intéressent de plus en plus à l'étude expérimentale de leur évolution pour en tirer des bénéfices en la dirigeant dans un but précis (applications spécifiques), en cherchant à sélectionner ou améliorer une fonction particulière. D'autre part l'étude expérimentale de l'évolution est nécessaire pour explorer les chemins évolutifs possibles, identifier et comprendre les mécanismes sous-jacents. Ces deux axes peuvent être étudiés en laboratoire grâce à différents systèmes expérimentaux et à différentes échelles (Figure I-11).

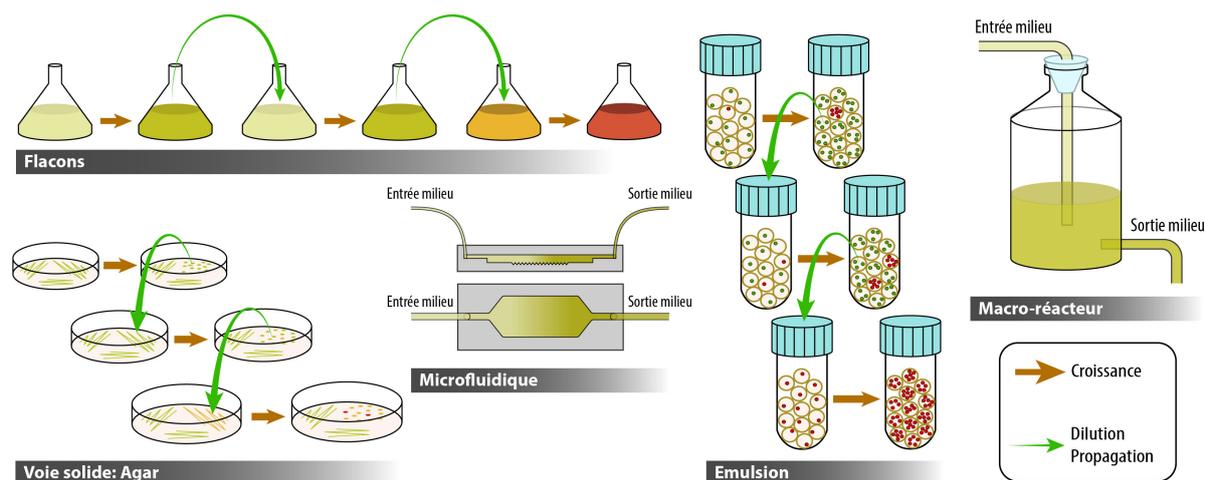


Figure I-11 : Méthodes expérimentales d'évolution en laboratoire

Une expérience d'évolution en laboratoire peut être conduite en voie solide (agar), comme en voie liquide (flacons, microfluidique, émulsion, macro-réacteur), par culture en continue ou en discontinue (transfert en série), mais consiste toujours à des cycles de dilution/propagation et de croissance.

Quel que soit le système expérimental choisi et la finalité d'une expérience d'évolution, la procédure reste, dans les grandes lignes, la même. Toute expérience d'évolution consiste à la succession de phases de croissance, permettant aux organismes de croître et se reproduire dans leur environnement, suivies de phases de dilution, nécessaires pour rafraîchir l'environnement (les conditions de cultures) et pour permettre aux organismes de continuer à croître. C'est en réalisant ce genre de cycles continuellement, qu'au fil des générations, la pression de sélection (qu'elle soit naturelle ou artificielle) poussera la population à s'adapter à son environnement.

Ce sous chapitre a pour but de dresser le panel des méthodes actuellement utilisées au travers de plusieurs expériences d'évolution, réalisées par différents chercheurs, sur des bactéries. Il permettra de mettre en évidence leurs avantages, mais aussi de montrer leurs limites, et de justifier le besoin d'une nouvelle technologie pour diriger efficacement l'évolution de communautés microbiennes tout en favorisant la diversification.

I.3.A. Évolution expérimentale dirigée

I.3.A.1. Méthodes de culture en continue, un contrôle des conditions de croissance

Dans cette première partie, nous souhaitons montrer que l'évolution expérimentale est un outil qui peut être utilisé pour faire évoluer des microorganismes pour des applications spécifiques. Le but de telles expériences, qui visent à diriger l'évolution spécifiquement, est souvent de développer une solution face à un problème donné (ex : dégradation d'une toxine), ou encore d'optimiser la production de molécules d'intérêts à des fins industrielles (ex : production de masse). Généralement, ces expériences d'évolution sont réalisées sur des volumes assez conséquents (macro-réacteurs) et à l'aide de systèmes de culture en continue. Les cultures en continue consistent à effectuer les cycles de croissance/dilution dans un même bioréacteur. Cette technique d'évolution présente plusieurs modes de travail : le chemostat (mode ancestral), le turbidostat, ou encore le morbidostat, dont nous allons présenter le fonctionnement, les avantages et les limites.

Parmi les différentes méthodes de culture en continue, le mode ancestral est le chemostat. Il consiste à cultiver des microorganismes dans un réacteur au sein duquel le milieu est renouvelé régulièrement. Du milieu de culture neuf est ajouté à débit constant, et le réacteur se voit perdre de son contenu au même débit. Ainsi, le volume reste constant et homogénéisé. Si le taux de dilution imposé est inférieur au taux de croissance des bactéries, la biomasse va augmenter jusqu'à ce que le taux de croissance se stabilise, dû au manque d'un substrat (dit limitant). Un équilibre va alors s'établir, où taux de renouvellement et taux de croissance seront égaux. Si une mutation pousse les bactéries à se reproduire plus rapidement, par exemple en utilisant mieux le substrat limitant, ceci créera un déséquilibre conduisant à une augmentation de la biomasse. Rapidement, le système tendra vers un nouvel équilibre, à plus forte biomasse, mais à temps de génération⁴ toujours constant. Ce système favorise donc la croissance des microorganismes poussant le plus rapidement appelés « fast-growers » et peut permettre d'augmenter le taux de croissance d'une population. Dans la nature, ces « fast-growers » sont considérés comme des organismes opportunistes dont la seule stratégie est de croître plus rapidement que les autres afin de coloniser une niche et de s'y établir en premier. Elle est notamment adoptée par des organismes tels que certaines bactéries (dont *Escherichia coli*), mais aussi des levures, ou encore les cellules cancéreuses [33].

Le chemostat possède donc l'avantage de maintenir des conditions de croissance fixe et peut permettre de faire s'adapter des souches microbiennes à une concentration basse en nutriments, de maintenir l'adaptabilité d'une population face à un stress, ou d'optimiser la production de molécules d'intérêts (ex : éthanol, butanol, acétone)[34]. Cette méthode de culture en continue présente néanmoins une utilisation limitée pour diriger l'évolution d'une population, car aucune rétroaction n'est imposée. La plupart du temps, on va utiliser ce système en cherchant à dynamiquement maintenir une biomasse constante, soit en jouant sur le taux de dilution (turbidostat), soit sur la concentration en toxine (morbidostat).

Le turbidostat s'apparente au chemostat car il repose sur le même système de renouvellement du milieu. Cependant, contrairement à ce dernier, le turbidostat impose un taux de dilution qui n'est pas fixe, mais qui va dépendre de la croissance bactérienne. Cette dernière est suivie par mesure de turbidité (ou densité optique, DO) et le taux de dilution est dynamiquement ajusté pour maintenir cette valeur, et donc la biomasse, constante. A l'état d'équilibre, les fonctionnements d'un chemostat et d'un turbidostat sont identiques. Cependant, là où l'apparition d'un mutant plus rapide conduisait à une augmentation de la biomasse dans un chemostat, elle conduit simplement à une augmentation du taux de croissance dans un turbidostat, synonyme d'une augmentation du taux de dilution. Ainsi, dans un turbidostat, on se place souvent en phase exponentielle, afin de maximiser le taux de croissance de notre population. Le but d'un turbidostat est de sélectionner les individus à plus fort taux de croissance, face à un stress donné.

Enfin, le mode particulier où un chemostat est utilisé pour faire évoluer des bactéries face à une toxine s'appelle le morbidostat. L'objectif est également de maintenir une biomasse constante, mais au lieu de travailler avec un substrat limitant pour contrôler la croissance, il s'agit d'utiliser un agent chimique toxique (ex : antibiotiques). Au lieu de jouer sur le taux de dilution, il joue donc sur la concentration en agent toxique. Ainsi, deux types de milieux sont utilisés, un milieu relaxant (ne contenant pas de toxine) et un milieu stressant (contenant la toxine à une certaine concentration), mais

⁴ temps pour remplacer le volume total du bioréacteur

le taux de dilution reste constant (Figure I-12). Dans un morbidostat, la finalité est bien évidemment de faire s'adapter la population à cet agent toxique.

I.3.A.2. Adaptation et optimisation face a un stress spécifique

Ces systèmes permettant de réaliser des expériences d'évolution de manière automatisée et contrôlée, des chercheurs ont décidé de tirer parti de ces opportunités pour étudier l'évolution face à des stress ou faire acquérir à une population des capacités spéciales.

Toprak et al. ont par exemple développé une « machine de sélection », un morbidostat, qu'ils ont utilisé pour étudier l'évolution de la résistance de populations d'*E. coli* face à trois stress antibiotiques (de manière séparée) [35]. Pour monitorer la croissance bactérienne, ils utilisent un milieu de culture classique comme milieu relaxant, et un milieu contenant de l'antibiotique comme milieu stressant (Figure I-12, a). La population est diluée avec la solution antibiotique lorsque la DO dépasse le seuil fixé ($DO=0,15$) et que la croissance nette sur l'ensemble du cycle est positive ($\Delta DO > 0$) (Figure I-12, b). Ce contrôle permet une évolution graduelle de la population, où la concentration en antibiotique est dynamiquement ajustée à sa résistance. Sur une période de 20 jours, ils parvinrent à augmenter drastiquement les niveaux de résistance des différentes populations, jusqu'à des valeurs d'IC50 multipliées par plus de 1000.

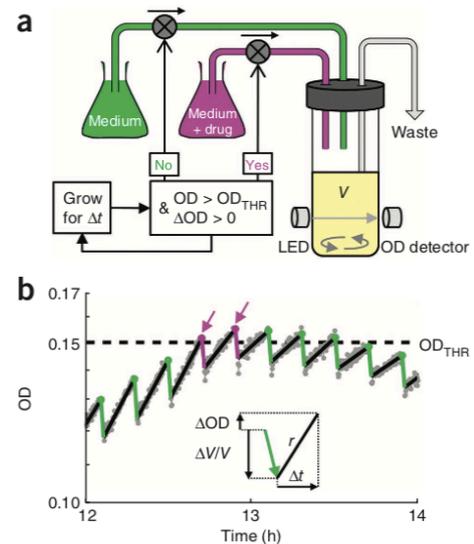


Figure I-12 : Morbidostat

a- Schéma du système utilisé pour réaliser un morbidostat. b- La croissance bactérienne est dynamiquement monitorée par mesure de la DO, calcul du taux de croissance (lignes noires), et ajout (toutes les 11min) de milieu frais (vert) ou contenant de l'antibiotique (mauve)[35].

R. Mutzel et P. Marliere ont aussi développé une « machine à évoluer », le GM3 [36], technologie de culture continue automatisée. Cet instrument a par exemple été utilisé par Belkhelfa et al. pour faire acquérir à des bactéries *Methylobacterium extorquens* une résistance accrue au méthanol [37]. La souche *M. extorquens* AM1 est déjà conçue pour pouvoir produire divers produits chimiques à partir de méthanol. Cependant, elle ne peut survivre qu'en présence d'une concentration maximale de 1% de méthanol, qui devient sinon toxique. L'évolution dirigée de cette souche par succession de turbidostat et morbidostat a permis à ces bactéries de s'adapter et de croître dans un milieu contenant 10% de méthanol, ainsi que d'augmenter leur rendement en biomasse face à 1% de méthanol.

Ces systèmes permettent donc de faire évoluer des populations bactériennes dans des conditions contrôlées et peuvent être utiles pour étudier leur adaptation face à des stress ou substances toxiques, ou encore pour optimiser leur production de produits chimiques ou industriels. Cependant, en ne permettant de sélectionner que les individus qui s'adaptent et se propagent le plus rapidement, ils présentent une utilisation limitée. Pour explorer des voies un peu plus variées, et pour tirer parti de ces expériences d'évolution, les scientifiques se sont tournés vers le levier de la biologie synthétique.

I.3.A.3. La biologie synthétique au service de l'évolution dirigée

Étant donné que ces systèmes ne permettent que de sélectionner les microorganismes à croissance rapide, les scientifiques se sont arrangés pour tirer parti de ce niveau de sélection afin de lier le critère d'intérêt au taux de croissance. En effet, les outils amenés par la biologie synthétique fournissent de nouvelles possibilités pour diriger l'évolution. Ils permettent de construire génétiquement des souches possédant le critère sur lequel on souhaite sélectionner, pour ensuite les pousser à s'en accommoder par évolution expérimentale. Ces modifications génétiques entraînent souvent un ralentissement de la croissance ou d'autres réductions de performances. Les systèmes de culture en continu, poussant les microorganismes à augmenter leur taux de croissance, sont donc parfaitement adaptés à ce genre de manipulations.

En utilisant ce levier, Marliere et al. ont conduit plusieurs expériences d'évolution dirigée grâce au GM3. Ils se sont par exemple posés la question de savoir si un organisme vivant pouvait survivre avec un acide aminé en moins. Dans la nature, on peut trouver chez certaines espèces extremophiles des niveaux anormalement bas d'acides aminés, mais jamais dépourvus d'un des vingt acides aminés. Ils se sont donc inspirés de cette observation et ont utilisé le GM3 pour éliminer complètement le tryptophane du protéome d'une population d'*E. coli* [38]. Un travail considérable de biologie synthétique fût néanmoins nécessaire pour que cette adaptation soit envisageable.

Avec leur technologie, ils sont même allés jusqu'à remplacer l'une des bases nucléiques de l'ADN génomique d'une souche d'*E. coli*, la thymine, par une base artificielle assez proche, le 5-chloro-uracile [39]. Pour y parvenir, ils ont génétiquement modifié cette souche d'*E. coli* afin qu'elle ne synthétise plus de thymine et qu'elle cherche dans son environnement un élément de substitution. Ils ont ensuite procédé à l'évolution d'une population en cultivant cette souche dans un morbidostat où le milieu relaxant contenait de la thymine, alors que le milieu stressant contenait du chloro-uracile. Tant que la turbidité (ou biomasse) était en dessous du seuil fixé, du milieu relaxant était ajouté afin de permettre à la population de croître. Mais si la biomasse dépassait le seuil, le milieu contenant le chloro-uracile était alors utilisé pour appliquer une pression de sélection. En 6 mois, soit après 2000 générations, ils parvinrent à supprimer le besoin de thymine chez la population bactérienne, qui l'avait totalement remplacée par la chloro-uracile, en en faisant donc la nouvelle base de son code génétique (Figure I-13).

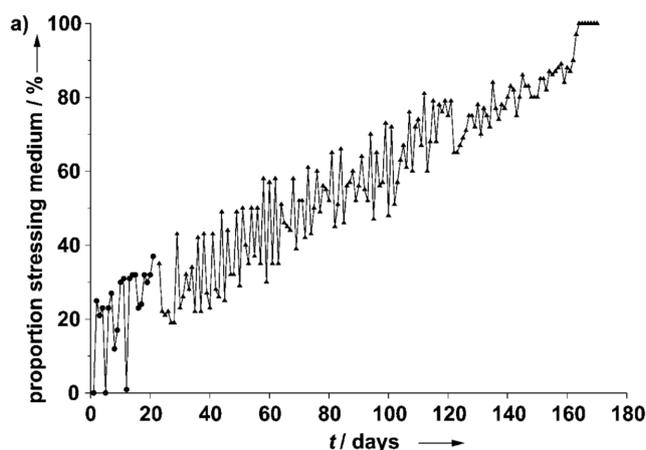


Figure I-13 : Cinétique évolutive du remplacement de la thymine par le chloro-uracile chez *E. coli*

Ce graphique présente l'évolution de la proportion de milieu stressant, contenant du chloro-uracile, en fonction du temps. Il traduit donc l'adaptation de la population au chloro-uracile. Toutes les 10min, la DO880 de la culture est mesurée et comparée au seuil fixé (DO=1, soit 10^9 cellule/mL). Si la DO>1, la culture reçoit du milieu stressant, sinon du milieu relaxant (oscillations sur le graphique). Avec des dilutions de 950mL toutes les 10min ($V_{\text{culture}} = 16\text{mL}$), et donc un temps de génération de 2h, la population ne nécessitait plus de thymine après 164 jours, soit 2000 générations. Avec un temps de génération de 4h, il fallut 166jours, soit 1000 générations [39].

Ces systèmes présentent les avantages de pouvoir contrôler précisément les conditions de cultures, de pouvoir jouer sur le temps de génération, le taux de dilution, les pressions de sélections et ainsi d'agir sur l'évolution de manière dynamique. Ces méthodes d'évolution expérimentale sont intéressantes en vue de diriger l'évolution de populations bactériennes dans un but précis. Mêlés à la biologie synthétique, elles permettent de faire évoluer des populations bactériennes vers des voies « non conventionnelles » et ainsi leur conférer des capacités spéciales ou optimiser leur rendement. Cependant, réaliser de telles expériences demande d'effectuer un important travail de biologie synthétique en amont, afin de concevoir les souches adéquates. En effet, dans chacune des expériences présentées, les gènes et les fonctions à modifier ont dû être préalablement identifiés, puis les souches ont dû être génétiquement modifiées, pour que la fonction voulue s'exprime et se propage grâce aux organismes à croissance rapide. Ces systèmes ne sont pas représentatifs de ce qu'il se passe dans la nature. La sélection naturelle ne se résume pas à sélectionner les individus se reproduisant le plus rapidement, et ceci justifie d'ailleurs la diversité du monde du vivant. Comme nous l'avons vu en I.2.A, les microorganismes sont bien plus souvent présents sous forme de communautés dans la nature, donnant naissance à des synergies aux propriétés indénombrables. Les organismes à croissance plus lente possèdent aussi leurs chances et présentent d'ailleurs bien souvent, au final, une adaptabilité accrue. Dans une autre approche, et pour essayer d'imiter des conditions de culture plus proche de ce qui peut se trouver dans la nature, des scientifiques ont travaillé avec des environnements plus « structurés », afin de favoriser l'apparition de différents chemins évolutifs.

I.3.B. Évolution expérimentale pour l'exploration

Cette seconde partie vise à montrer comment l'évolution expérimentale permet de maximiser la diversité des solutions évolutives proposées. L'exploration des voies évolutives est cruciale pour enrichir nos connaissances sur l'évolution, mais aussi pour trouver et développer de nouvelles solutions face aux différents problèmes écologiques, sanitaires et industriels de notre temps.

I.3.B.1. La compartimentation au service de l'exploration évolutive

Afin de ne pas favoriser les microorganismes à croissance ou adaptation rapide, de nombreux chercheurs ont essayé de travailler avec des environnements structurés afin de reproduire, ou du moins de se rapprocher, de ce qu'il se passait dans la nature. Que ce soit en voie solide sur plaque d'agar [29], en microfluidique [40], en émulsions [33], en plaque multi-puits [41], en macro-réacteurs [35], tous ont montré que la compartimentation d'un environnement est nécessaire pour permettre à différentes stratégies d'adaptation de surgir, et d'augmenter le nombre de chemins évolutifs possibles.

Pour Baym et al. l'un des aspects fondamentaux dans la survie des bactéries est leur capacité à pouvoir s'adapter dans un environnement structuré aux conditions changeantes. Ils sont partis de ce constat pour développer un dispositif expérimental de culture structurée : la plaque MEGA (MEGA–plate, en anglais, pour Microbial Evolution and Growth Arena)[29]. Ce dispositif permet d'étudier la résistance aux antibiotiques, problème croissant de notre temps, dans un environnement structuré, similaire à ce qu'il pourrait se passer en milieu naturel ou hospitalier [42]. Le but n'est pas de reproduire à l'identique ce qu'il peut se passer dans ces conditions, mais plutôt d'identifier des principes importants de l'évolution et de la diversification de populations bactériennes face à un stress. Nous souhaitons présenter cette expérience en détail, car elle soulève des aspects intéressants à prendre en compte lors d'une expérience d'évolution. Elle a aussi inspiré nos travaux, dont les résultats seront présentés en fin de ce manuscrit (Chapitre V). Cette plaque d'agar « géante » (de 120×60 centimètres) contient donc différentes bandes

d'antibiotiques de concentrations croissantes (sorte de « gradient en étapes »), et est recouverte d'une couche agar liquide permettant aux bactéries de se déplacer (Figure I-14). Ce dispositif fournit aux bactéries un paysage antibiotique dans lequel elles peuvent évoluer en s'adaptant spatialement à leur environnement, et permet une visualisation directe de la dynamique de l'évolution. Pour évaluer l'adaptabilité des bactéries dans un tel environnement, Baym et al. ont exposé des *E. coli* à deux antibiotiques (séparément), le triméthoprime (TMP, gradient : 0,3,30,300,3000xMIC), et la ciprofloxacine (CPR, gradient : 0,2,20,200,2000xMIC). Trois inoculums sont réalisés à différents endroits de la bande sans antibiotique, à concentration 0 (Figure I-14, B). Les bactéries consomment les nutriments de cette région puis se déplacent ensuite par chimiotaxie, à la recherche de nouveaux nutriments. Elles se retrouvent ainsi forcées à avancer pour trouver de quoi se nourrir et se confrontent, par la même occasion, aux bandes d'antibiotiques. Elles doivent ainsi proposer des solutions adaptatives pour continuer à avancer. Un front de propagation se dessine et mène l'expédition grâce aux mutants s'adaptant le plus rapidement. Sur ce front, différentes stratégies évolutives sont observées. L'analyse génotypique des mutants ayant atteint la plus forte concentration en TMP prouve que, chez ces mutants, deux stratégies majeures sont adoptées. La première (due à une mutation du gène *dnaQ*) vise à augmenter drastiquement le taux de mutation des bactéries afin de maximiser les chances de mutations codantes. Cependant, la proportion de mutations synonymes/non-synonymes est presque équivalente. La deuxième, implique des mutations plus rares mais plus spécifiques, et donc majoritairement adaptatives (et codantes). Elles visent principalement le gène cible de TMP (le *folA*), mais aussi des gènes affectant les étapes de transcription et de traduction, ou des gènes généralement impliqués dans des réponses aux stress. Bien que ces deux stratégies soient radicalement opposées, elles fournissent, au final, des taux d'adaptations phénotypiques similaires et de même vitesse.

Cependant, un aspect d'autant plus intéressant de cette expérience est qu'elle favorise la cohabitation. En effet, la propagation du front n'est pas linéaire mais est accompagnée d'un tas d'autres interactions. Des bactéries sur le front, bien qu'étant parmi les plus rapides, peuvent, à un moment

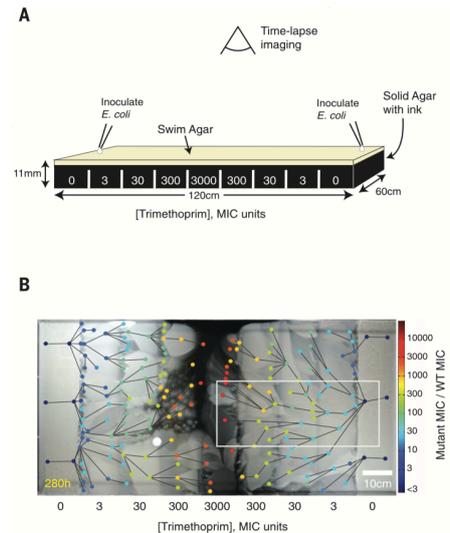


Figure I-14 : MEGA-plate

Dispositif expérimental permettant d'étudier l'évolution microbienne dans un environnement structuré. A- Schéma de la plaque MEGA avec un gradient de TMP en quatre étapes. B- Photo du dispositif après 12 jours d'incubation. Les bactéries apparaissent en blanc sur fond noir. L'évolution des différents lignées peut être suivie par visualisation directe [29].

donné, se retrouver physiquement bloquées par des lignées voisines et donc ne plus être compétitives. Mais les bactéries n'ont pas à être sur le front de propagation pour trouver leur chemin et proposer des solutions adaptatives. De nouvelles lignées peuvent aussi apparaître derrière le front, là où des espaces sont restés disponibles. Différentes stratégies évolutives émergent, et toutes ne conduisent pas aux mêmes niveaux d'adaptation. L'analyse phénotypique des échantillons ayant atteint la bande la plus concentrée en antibiotique (3000xMIC pour TMP, 2000xMIC pour CPR) montre qu'en 10 et 12 jours seulement, les bactéries ont acquis une valeur de MIC 10^4 fois plus forte pour TMP et de 10^5 fois le MIC pour CPR. Cependant, il s'avère que ce ne sont pas les bactéries les plus adaptées. En effet, des bactéries spatialement bloquées derrière le front et contraintes de rester dans l'environnement dans lequel elles sont apparues, présentent bien souvent une adaptabilité accrue (valeurs du MIC 3 à 6 fois supérieures que celles du front). Si ces mutants sont manuellement échantillonnés et ré-inoculés en aval du front, dans une concentration bien supérieure à celle dont ils proviennent, ils se propagent donc sans aucun souci. Chez ces mutants, on observe généralement un compromis effectué entre résistance et croissance, conduisant à une adaptation en deux temps (Figure I-15). Une première mutation leur permet d'acquérir une forte résistance au détriment de leur croissance, qui est ensuite compensée par une seconde mutation, permettant la croissance complète. Si elles étaient apparues sur le front, ces mutations n'auraient pas été compétitives faces à leurs voisines, plus rapides. Ceci est une preuve directe que les plus rapides ne sont pas les plus adaptées. Cet environnement structuré laisse la chance aux moins rapides de proposer des solutions et met en évidence un tas de voies évolutives différentes. Les lignées, bien que coexistantes et se développant dans le même environnement, montrent une riche diversité phénotypique et génotypique entre elles.

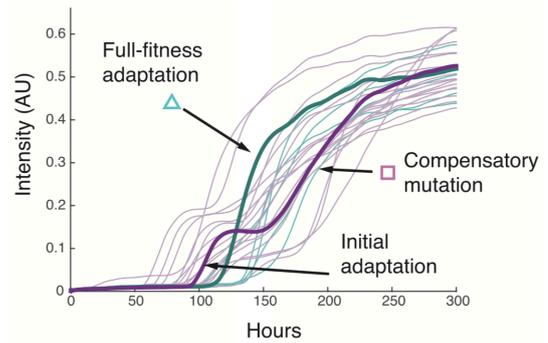


Figure I-15 : L'évolution est faite de compromis

Ce graphique montre la croissance de différentes lignées et met en évidence la présence de mutations compensatoires. Alors que certaines mutations permettent une adaptation des bactéries sans affecter leur croissance (courbes cyan), d'autres, menant à une plus forte résistance, réduisent fortement leur taux de croissance. Pour le restaurer, elles sont généralement suivies d'une mutation compensatoire (courbe mauve)[27].

Mais il se trouve que ces compromis ne sont pas rares dans la nature. Ils justifient le résultat de la sélection naturelle et la diversité du monde du vivant. Leur existence et leur impact sont d'ailleurs parfaitement illustrés par le compromis fait entre optimisation du taux de croissance et optimisation du rendement en biomasse chez les organismes unicellulaires [33]. Alors que l'augmentation du taux de croissance est avantageuse pour un individu (microorganismes à croissance rapide), l'optimisation du rendement en biomasse, passant par une croissance plus lente, est plus avantageuse pour une population. Sans de tels compromis, la sélection naturelle aurait peut-être sélectionné uniquement les organismes à croissance rapide. Bachmann et al. ont montré que l'arrangement structurel d'une culture affecte grandement les pressions de sélections, et donc le résultat de l'évolution [33]. Pour ce faire, ils ont mis en compétition deux souches (une à croissance rapide, l'autre à croissance lente), et ont conduit une expérience d'évolution par dilution en série, soit en suspension, soit en émulsion. Les bactéries utilisées étaient *Lactococcus lactis*, bactérie à croissance rapide, et sa mutante *L. lactis* Δdb , à croissance lente mais à meilleur rendement. Dans le cas d'une culture en suspension, le transfert en série repose sur des cycles de dilution/propagation d'un échantillon de la culture, puis de croissance. Lors de ce processus, tous les organismes se battent pour les mêmes ressources, et ceux à croissance rapide vont

se retrouver majoritaires à la fin de la phase de croissance. Ainsi, quand un échantillon sera prélevé pour propager la culture, les chances de sélectionner des organismes à croissance lente seront réduites. Après un certain nombre de cycles, on aura donc fixation des organismes à croissance rapide dans la population (Figure I-16, A). Dans le cas d'une émulsion, des microgouttes de milieu de culture (phase dispersée), formées et contenues dans de l'huile (phase continue), sont utilisées comme bioréacteur pour la croissance bactérienne. Chaque microgoutte représente un environnement indépendant (similaire à un flacon) dans lequel les bactéries pourront se développer. Le but d'une telle compartimentation est d'éliminer la compétition entre les bactéries, en n'inoculant qu'une seule cellule par microgoutte. Ainsi, chaque microgoutte contiendra au départ une bactérie sauvage ou une mutante. Après la phase de croissance, les microgouttes contenant des mutants présenteront une densité plus forte que celles contenant des non mutantes. Le transfert en série est ainsi entrecoupé d'étapes où l'émulsion est cassée, afin de procéder à la phase de dilution et de propagation, puis reformée, pour permettre la phase d'incubation. Au cours des cycles, l'émulsion favorise donc la sélection des bactéries à meilleur rendement, bien qu'elles présentent une croissance plus lente (Figure I-16, B). Le résultat de cette expérience prouve, une nouvelle fois, que la structure de l'environnement joue un rôle crucial dans l'évolution.

Quel que soit le dispositif utilisé, la compartimentation est donc un bon moyen de favoriser la diversification des voies évolutives. Elle semble être primordiale pour laisser la chance aux moins aptes et aux moins rapides de proposer des solutions évolutives.

I.3.B.2. La parallélisation favorise la diversification et l'exploration

Nous venons de voir que la compartimentation (ou la structuration) aide à l'exploration des voies évolutives. Nous souhaitons désormais présenter un moyen supplémentaire permettant de favoriser l'exploration ainsi que la diversification : la parallélisation. La parallélisation consiste à réaliser plusieurs expériences du même type indépendamment et en parallèle.

Le principe de parallélisation est parfaitement illustré par l'expérience d'évolution microbienne la plus célèbre et la plus longue à l'heure actuelle, nommée « Long-Term Evolution Experiment »

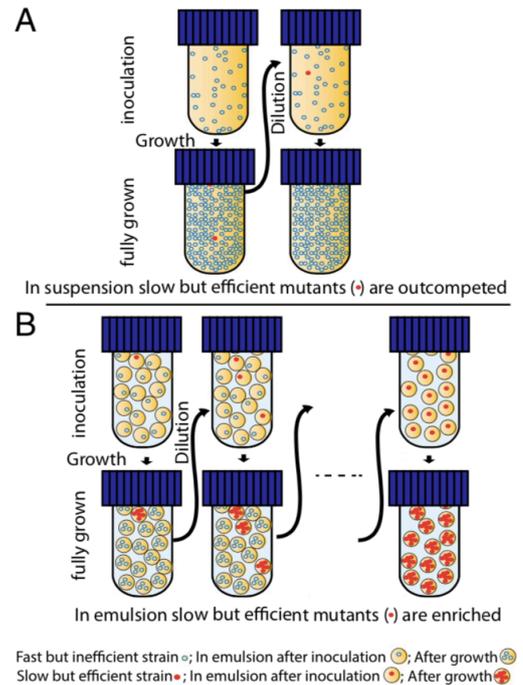


Figure I-16 : La compartimentation comme critère de sélection

Une expérience d'évolution par transfert en série effectuée exactement dans les mêmes conditions, en suspension ou en émulsion, ne conduit pas au même résultat. A- La propagation en suspension conduit à la sélection des organismes à croissance rapide, alors que B- l'utilisation d'une émulsion favorise la sélection des organismes à meilleur rendement en biomasse [33].

(LTEE), et lancée par Richard Lenski le 24 fév. 1988 [43]. Le but de cette expérience était de savoir si l'évolution de populations bactériennes soumises à des conditions de cultures identiques de manière indépendante présenterait des trajectoires évolutives similaires, ou au contraire variées. Depuis 32 ans, Lenski et son équipe cultivent 12 populations de *E. coli* (issues d'une souche commune) par transfert en série, de manière indépendante et en parallèle. Chaque population possède des conditions de culture identiques, à savoir un milieu de culture « pauvre », où le glucose (seule source de carbone assimilable) est la ressource limitant la croissance de la population. Ainsi, quotidiennement depuis le début de l'expérience, 1% de chacune des cultures est transféré dans un nouvel environnement aux conditions identiques, puis laissé en croissance pendant 24h à 37°C, avant d'être dilué à nouveau, et de permettre l'évolution de chacune des 12 lignées indépendamment (Figure I-17).

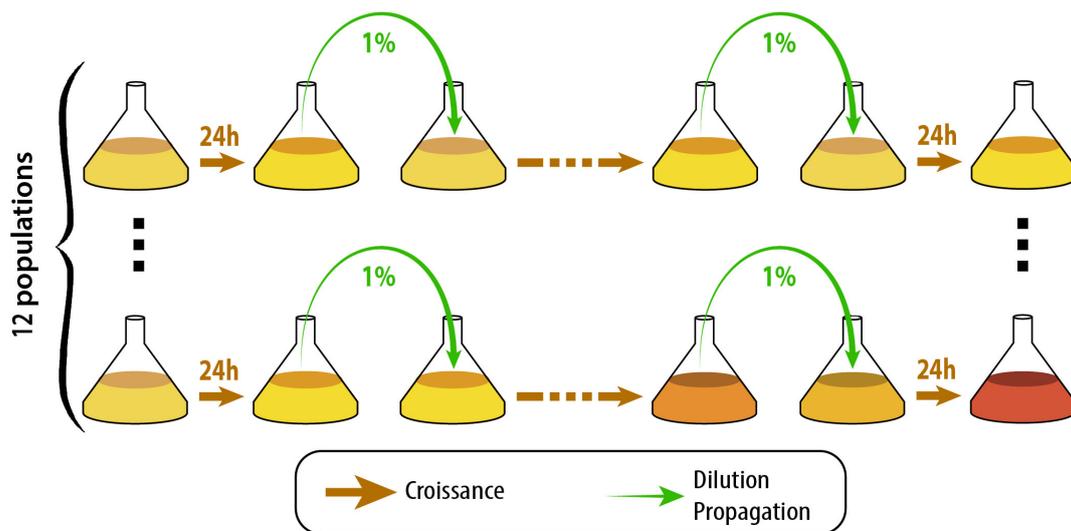


Figure I-17 : « Long Term Evolution Experiment » (LTEE)

Schéma représentant l'expérience d'évolution par transfert en série effectué par Richard Lenski sur les douze populations d'*E. coli* en parallèle. Toutes les 24h depuis le début de l'expérience, 1% de chacune des 12 populations est transféré dans du milieu frais pour permettre sa croissance, et donc son évolution. A chaque étape de dilution/propagation, un échantillon de chacune des lignées est récupéré et congelé pour garder un historique de l'évolution et permettre, si besoin, de réaliser des mesures supplémentaires.

Sous de telles conditions, les bactéries ont naturellement évolué vers une consommation plus efficace du glucose (ressource limitante). Au cours des 2000 premières générations, des mécanismes d'adaptation identiques ont été observés dans chacune des douze lignées. Ils ont ainsi pu observer une réduction de la durée de la phase de latence suite à des mutations qui se sont fixées sur un même gène (*pykF*) au sein de chaque lignée, ainsi qu'une augmentation de la taille des bactéries [44]. Après les 2000 premières générations, d'autres phénomènes reproductibles furent observés. Toutes les lignées se sont spécialisées vers une utilisation plus efficace du glucose, au détriment de leur capacité à assimiler d'autres sucres, sources de carbone. Toutes ont ainsi vu leur utilisation du ribose être altérée voire supprimée. La parallélisation semble donc être pertinente en vue d'étudier la répétabilité des mécanismes adaptatifs employés.

Néanmoins, alors que l'on aurait pu penser que l'évolution des populations aurait atteint un optimum après un temps suffisamment long, l'expérience prouve qu'après plus de 60 000 générations chacune des douze lignées continue de présenter de nouveaux mécanismes adaptatifs [44], [45]. Bien que la plupart des lignées aient empruntées des stratégies d'adaptation similaires, comme il a été observé sur le début d'expérience, d'autres se sont mises à proposer des solutions variées et inattendues. Dans l'une des populations, les chercheurs ont découvert que deux types de lignées bactériennes, l'une

constituée de grandes cellules (L) et l'autre de petites (S), se sont mises à cohabiter. Cette cohabitation est en fait le fruit d'une interaction bénéfique. Les cellules L se reproduisent très rapidement en présence de glucose, mais produisent des métabolites toxiques (acétate) nuisant à leur croissance, que les cellules S sont alors capables d'utiliser [46]. En d'autres termes, les cellules L ont créé une nouvelle niche écologique que les cellules S ont su exploiter. En raison du compromis entre la croissance sur le glucose et l'acétate, les deux écotypes peuvent coexister de manière stable et bénéfique depuis plus de 50 000 générations.

Un autre exemple frappant de la diversification des voies évolutives est survenu dans une des lignées autour de la 31 000^{ème} génération. Alors que les conditions de croissance n'avaient pas changé, et que la densité de population maximale semblait atteinte dans chaque population depuis plusieurs milliers de générations, l'une d'entre elle l'a soudainement vu augmenter drastiquement (multipliée par un facteur 6), (Figure I-18). La population de cette lignée s'est soudainement vue développer la capacité à utiliser le citrate (source de carbone utilisée comme tampon dans les milieux de culture) comme source principale de carbone (phénotype nommé Cit+)[47]. L'évolution de ce phénotype est particulièrement surprenante car la bactérie *E. coli* est normalement incapable d'assimiler le citrate en présence d'oxygène. Ce phénotype serait apparu suite à l'accumulation de plusieurs mutations, et c'est pourquoi il aurait nécessité autant de temps pour apparaître. Mais cette expérience d'évolution n'était conduite que sur un faible nombre de lignée en parallèle et n'était pas dirigée. On peut imaginer que si des centaines, voire des milliers de populations avaient été utilisées, ou si des critères de sélection artificielle avaient été employés, de tels phénomènes seraient apparus bien plus rapidement.

La parallélisation, même appliquée à des environnements non structurés, s'avère donc être un puissant outil favorisant la diversification et l'exploration des voies évolutives. Mais la parallélisation présente également un bon moyen d'évaluer la question de la reproductibilité des mécanismes évolutifs. En effet, une des questions fondamentales de la biologie évolutive est de savoir si face à un même problème la nature va toujours proposer les mêmes solutions. Elle présente un intérêt fondamental pour la compréhension de l'évolution de la vie sur Terre, mais aussi pour des enjeux plus pragmatiques. Si l'évolution est prédictible (dans une certaine mesure), et s'il est possible d'anticiper la réponse évolutive d'organismes face à des changements environnementaux, il est plus simple de trouver des solutions adaptées. L'importance de cette question fait qu'elle est actuellement au cœur de beaucoup des études d'évolution menées, et il semblerait qu'une certaine forme de reproductibilité soit souvent observée [29], [35], [48], [49].

Dans le cas de la résistance aux antibiotiques, par exemple, une meilleure compréhension de la manière dont une forte résistance se développe pourrait aider à mieux lutter contre ce genre de phénomène, ou à trouver de nouvelles solutions quant à leur emploi. En effet, les voies d'évolution phénotypiques et génotypiques conduisant à de forts niveaux d'adaptation sont peu connues. Il semblerait néanmoins qu'une sorte de reproductibilité ait été identifiée dans les mécanismes employés

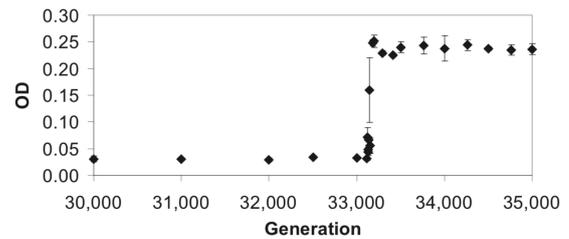


Figure I-18 : Apparition du phénotype Cit+ dans une des populations de la LTEE

Les premières bactéries assimilant le citrate furent identifiées autour de la 31000^{ème} génération, bien que l'impact phénotypique sur le rendement en biomasse du phénotype Cit+ ne se soit fait percevoir que vers la 33000^{ème} génération. L'analyse génotypique et phénotypique des échantillons congelés a permis de remonter jusqu'à ces données. Ce graphique présente la DO420 mesurée à saturation au cours des générations (chaque point correspond à une moyenne faite sur 3 réplicas)[47].

par les bactéries pour acquérir de telles résistances. Ce phénomène a été observé sur les plaques MEGA, où le phénotype mutateur est apparu au moins six fois de manière indépendante (dont 3 fois avec exactement le même allèle)[29]. Il a également été observé dans l'expérience en morbidostat de Toprak et al. [35] précédemment présentée. En faisant évoluer des populations d'*E. coli* face à trois antibiotiques : le chloramphénicol (CHL), la doxycycline (DOX) et le triméthoprimé (TMP), de manière séparée, et sur plusieurs populations en parallèle (5 répliques par antibiotique), ils ont mis en évidence des trajectoires phénotypiques similaires (Figure I-19). Bien que les stratégies mutationnelles ne soient pas les mêmes d'un antibiotique à l'autre (adaptation graduelle pour CHL et DOX, échelonnée pour TMP), ils ont observé des scénarios très similaires entre répliques, et notamment pour TMP, ou des mutations redondantes sont apparues.

Ces expériences montrent l'intérêt des chercheurs à paralléliser leurs expériences d'évolution, et ce, quelle que soit leur méthode de culture. Cependant, encore une fois, des études avec un plus grand nombre de cultures évoluant en parallèle, et au sein desquelles les conditions peuvent être changées, semblent nécessaires pour explorer l'ensemble des voies évolutives menant à l'adaptation face à un stress. De telles études pourraient aussi permettre d'identifier comment ces voies dépendent de l'environnement, de la taille de la population ou encore de la force de la pression de sélection.

I.3.C. Conclusion

Comme nous le soulignons depuis le début de cette thèse, il est de notre intérêt de chercher à mieux comprendre comment les synergies entre microorganismes apparaissent et se développent, afin de pouvoir en tirer des bénéfices. A ce jour, et malgré l'intérêt porté par les scientifiques aux communautés microbiennes, la majeure partie des expériences d'évolution a été conduite sur des souches uniques, et de manière isolée. Poussés plus loin, ces concepts d'évolution compartimentée et de parallélisation peuvent être un bon moyen de créer des coopérations entre microorganismes, et d'étudier les interactions présentes au sein de communautés complexes. Cependant, parmi les différentes méthodes présentées, aucune ne permet à la fois : de manipuler facilement un grand nombre de compartiments en parallèle, de jouer dynamiquement sur leurs conditions (taille de populations, temps d'incubation, composition de l'environnement), et sur les pressions qui leurs sont indépendamment appliquées. Aujourd'hui, le besoin d'une technologie permettant de diriger l'évolution d'un grand nombre de communautés microbiennes en parallèle est impératif. Cet instrument a été développé au cours de ma thèse. Il s'appuie sur plus de dix années de recherche préliminaires autour

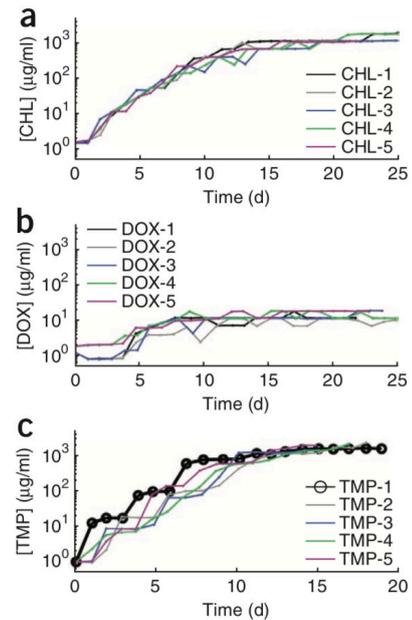


Figure I-19 : Des trajectoires adaptatives similaires
 Ces graphiques présentent l'évolution de la résistance de différentes populations (en parallèles) face à un même stress antibiotique de a- chloramphenicol, b- doxycycline, c- triméthoprimé. Pour chacun des antibiotiques, les 5 répliques semblent adopter des trajectoires adaptatives phénotypiques similaires avec a,b- une adaptation graduelle ou c- échelonnée, jusqu'à une résistance multipliée a- 870, b- 10, c- 1.680 [35].

d'une science nouvelle : la millifluidique. Le chapitre qui suit a donc pour but de formaliser le modèle expérimental que nous avons choisi d'exploiter pour parvenir à nos fins, ainsi que de présenter cette science qu'est la millifluidique, et les résultats des travaux passés.

Chapitre II : Millifluidique en gouttes

II. Millifluidique en gouttes : un outil adapté pour la culture, la manipulation et l'analyse de communautés de microorganismes

Maintenant convaincus de l'importance de travailler sur l'évolution des communautés de microorganismes, nous souhaitons présenter le modèle expérimental que nous avons choisi d'utiliser pour parvenir à nos fins. Ce modèle expérimental peut être mis en œuvre grâce à une science permettant la compartimentation, la parallélisation et la manipulation de communautés en de multiples bioréacteurs : la millifluidique digitale. Nous présenterons cette science et verrons comment les recherches effectuées par le laboratoire dans ce domaine ces quinze dernières années ont conduit au développement d'un instrument de culture et d'analyse permettant la manipulation d'un millier de communauté microbienne en parallèle. Nous verrons que, bien que cet instrument présente des limitations pour travailler sur l'évolution, il fournit néanmoins une base solide sur laquelle s'appuyer pour développer une nouvelle technologie qui permettra de réaliser l'évolution dirigée de communautés de microorganismes.

II.1. Un modèle expérimental d'évolution dirigée de communautés

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, que bien que de nombreuses méthodes d'évolution expérimentale existent, aucune n'est suffisamment adaptée pour explorer et diriger l'évolution de communautés microbiennes. Elles nous ont néanmoins permis d'identifier certains des concepts clef de l'évolution à exploiter pour parvenir à nos fins, tels que : la compartimentation, la parallélisation, le contrôle dynamique des conditions de culture et des pressions de sélections. Nous souhaitons ici revenir sur ces concepts, les formaliser, et présenter le modèle expérimental que nous avons choisi de mettre en œuvre afin de diriger l'évolution de communautés microbiennes.

II.1.A. Mise en évidence des clefs de l'évolution de communautés

II.1.A.1. Les communautés vues comme des entités Darwiniennes

Une bonne façon de travailler sur l'évolution de communautés microbiennes est de les considérer comme des entités Darwiniennes à part entière [50]–[52]. Une entité est dite Darwinienne si elle présente les propriétés de **variation**, de **reproduction** et d'**hérédité**. Un gène, une cellule, une bactérie, un microorganisme, un organisme, tous sont des entités Darwiniennes. Ici, nous voulons montrer qu'une communauté de microorganismes peut aussi être considérée en tant que tel (Figure II-1). Par souci de simplicité, nous allons parler de populations et d'individus, mais un équivalent direct aux communautés et aux membres (ou espèces) les constituants peut être fait.

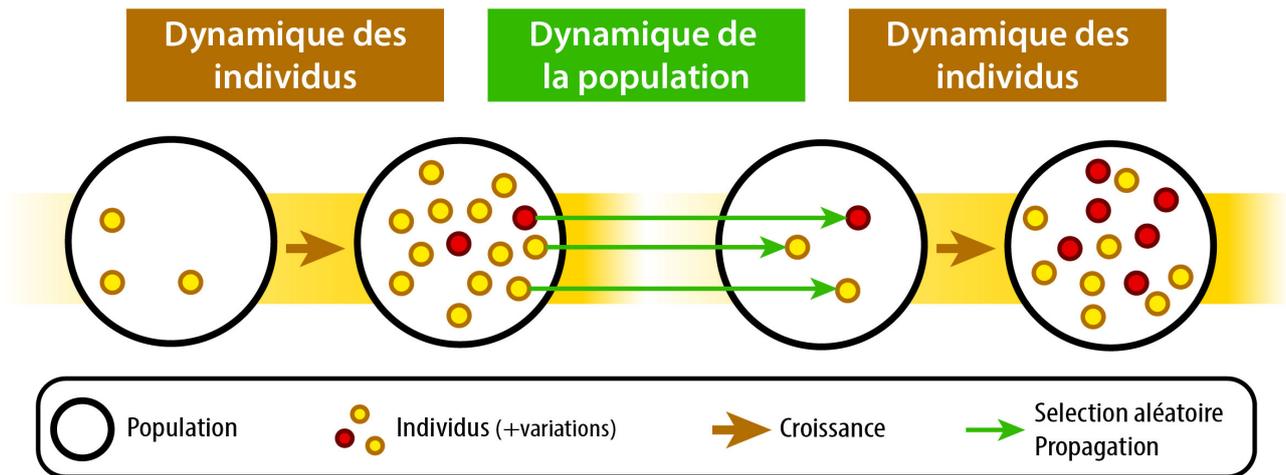


Figure II-1 : Propriétés Darwiniennes appliquées à une population.

Ce schéma représente la dynamique d'individus aux propriétés Darwiniennes au sein d'une population, ainsi que la dynamique à appliquer à la population pour qu'elle présente, elle aussi, ces mêmes propriétés. La reproduction héréditaire de la population passe par une étape de propagation d'un échantillon des individus (sélectionnés aléatoirement). Sa variation résulte de la variation moyenne des individus la composant. La population devient alors l'entité de base sur laquelle vont s'appliquer variabilité, reproduction et hérédité (schéma inspiré de [52]).

Considérons une population (cercle noir) possédant des individus (cercles jaunes), présentant tous un phénotype identique au départ. Ces individus, étant des entités Darwiniennes, vont se reproduire avec hérédité au sein de la population, se diversifier par le biais des variations (cercles rouges), et être soumis à la sélection naturelle. Une fois la population ayant atteint une taille suffisante, il faut qu'elle puisse se reproduire. Pour cela, quelques individus de cette population « mère » sont sélectionnés aléatoirement et introduits dans un nouvel environnement (flèches vertes), dans lequel ils pourront se reproduire à nouveau et former une nouvelle population « fille ». La population fille ressemble à sa mère, soulignant le caractère héréditaire de cette reproduction. Aussi, les variations des individus au sein de la population entraînent une variation « moyenne » de la population justifiant ainsi son caractère Darwinien. Ainsi, si une variation présentant un avantage adaptatif apparaît, elle aura des chances d'être transmise à la descendance, de perdurer et de s'imposer dans le temps, entraînant ainsi la variation de la population.

La situation que nous venons de présenter est un modèle « idéal ». Cependant, lors de ce processus, sélections aléatoires et naturelles peuvent aussi conduire à des pertes de diversité. Or la diversité est au cœur de l'adaptabilité et il est de notre devoir de bien la gérer.

II.1.A.2. Gestion de la diversité intra-populations : deux niveaux de sélection

Nous venons de voir qu'une population pouvait être considérée comme une entité Darwinienne. Nous savons que la diversité est au cœur de l'adaptabilité, et donc de l'évolution, et que pour la maximiser, il faut travailler avec des populations les plus grands possibles. Nous avons aussi vu précédemment (I.2.C.1) que de nombreux mécanismes (bruit d'expression génétique, régulation, mutations...) sont source de la diversification des individus à l'intérieur d'une population. Cependant, lors de la reproduction d'une population, sa diversité interne subit aussi des pertes, dues à un double niveau de sélection : la sélection aléatoire, nécessaire à la reproduction de la population (par propagation), et à la sélection naturelle, présente au sein des populations.

II.1.A.2.1. Pression de sélection aléatoire

Lors du processus de reproduction de la population, caractérisé par la sélection aléatoire d'individus et leur propagation, une perte de diversité peut être observée. En effet, l'échantillon sélectionné aléatoirement pour coloniser le nouvel environnement peut ne pas être représentatif de la diversité présente dans la population mère. En cas d'une proportion trop faible de colons, on peut assister à un phénomène de dérive génétique.

La dérive génétique [53] est définie comme la modification aléatoire de la fréquence des allèles ou des génotypes au sein d'une population (ou de la fréquence des espèces dans une communauté). Dans le cas présent, elle se produit par un mécanisme appelé goulet d'étranglement de population, « bottleneck » en anglais (Figure II-2). Il se caractérise par la réduction conséquente, aléatoire et soudaine d'une population, suivi par la croissance démographique des survivants, entraînant donc une perte de diversité au sein de la population. Pour pallier à la dérive génétique, et minimiser cette perte de diversité, l'inoculum (le « bottleneck ») doit être suffisamment grand, pour représenter au mieux la diversité intra-population.

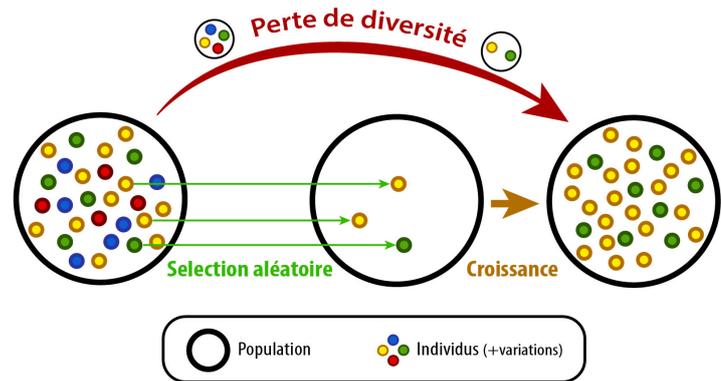


Figure II-2 : Goulet d'étranglement de population

Lors de son processus de reproduction, une population mère possédant au départ quatre phénotypes différents se voit n'en transmettre que deux à sa descendance. Cette perte de diversité fait suite à la sélection aléatoire et à la propagation d'une trop faible portion de sa population. La population a subi un effet d'étranglement.

Cependant, travailler avec un bottleneck trop grand ne favorise pas non plus la diversité. En effet, augmenter la taille de l'échantillon propagé revient à diminuer son temps de croissance (ou nombre de générations) entre deux cycles de propagations, et réduit donc la probabilité que des mutations apparaissent et se multiplient avant la prochaine propagation. Nous parlons ici des mutations car elles sont les principales sources de diversifications à long terme dans notre système, mais cela concerne, bien évidemment, tous les mécanismes de diversification interne à la population.

On comprend facilement qu'une dilution par deux (synonyme d'une unique génération par cycle) générera beaucoup moins de diversité, sur un cycle, qu'une dilution par cent (7 générations/cycle). Cependant, une dilution par cent conduira à la perte de la plupart des mutations acquises (par goulot d'étranglement) tandis qu'une dilution par deux tendra, au contraire, à les conserver et à les accumuler, œuvrant ainsi à la diversification [52]. Il existe donc un compromis à faire entre taux de dilution et nombre de générations afin de gérer au mieux ce niveau de diversité. La gestion de ce compromis dépend aussi du type d'expérience que l'on souhaite faire, mais en somme, il est important de s'assurer que la diversité augmente. Ce modèle a été implémenté numériquement [52], et la théorie montre que sur un faible nombre de cycles, de forts taux de dilution et des temps de croissance plus long favorisent la diversité, tandis que sur un grand nombre de cycles, de faibles taux de

dilution sont plus favorables. Il est donc primordial de pouvoir jouer sur le taux de dilution, et donc la pression de sélection aléatoire, dans le modèle que nous mettrons en place.

II.1.A.2.2. Pression de sélection naturelle

La sélection aléatoire n'est pas l'unique sélection en vigueur à s'appliquer sur ces populations. Les individus au sein de la population sont aussi soumis à la sélection naturelle. Si aucune pression particulière n'est appliquée, ce sont les individus étant les plus nombreux à chaque fin de cycle qui auront le plus de chance de s'imposer au fil des générations. Les variations, source de diversité, joueront alors un rôle primordial dans l'adaptabilité. Néanmoins, il ne faut pas oublier que dans notre cas, le but est d'étudier l'évolution de populations en vue de la diriger. Pour ce faire, et comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent (I.3), le but est d'appliquer un stress (manque de nutriments, antibiotique...) au sein de la population, afin que la sélection naturelle favorise la reproduction, et donc la propagation, des individus développant un avantage sélectif (pouvant être une interaction bénéfique) face au stress en question. Cependant, des précautions sont aussi à prendre sur ce deuxième niveau de sélection. Il s'avère que l'intensité de la pression de sélection naturelle joue aussi un rôle considérable dans la capacité d'adaptation, et donc dans l'évolution des populations [29], [35], [40], [41]. Une pression de sélection naturelle trop forte ou trop soutenue peut en effet conduire à une perte de diversité et à une réduction de la taille efficace d'une population, affectant ainsi grandement son adaptabilité, et donc son évolution.

Baym et al. ont mis en évidence ce phénomène avec leur plaque MEGA. Pour cela, ils ont changé le type de gradient appliqué dans leur dispositif. Au lieu d'utiliser un gradient en quatre étapes, ils utilisèrent une seule étape de transition (de concentration variable) entre la concentration nulle (C_0) et la concentration maximale (C_{max}) en antibiotique (Figure II-3). Ils ont ainsi montré qu'un saut direct à la concentration maximale ne permettait pas l'adaptation des bactéries. Bien que certaines adaptations aient pu être observées avec une étape intermédiaire (quelle que soit sa concentration), elles n'étaient pas significatives, car elles résultaient plus du gradient local dû à la diffusion de l'antibiotique entre les bandes que d'une réelle adaptation.

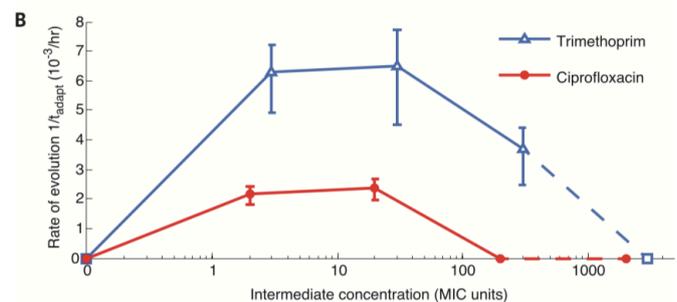


Figure II-3 : Impact d'étapes graduelles sur l'adaptation à une pression de sélection

Pour évaluer l'impact d'une pression de sélection plus forte et plus soudaine, une seule étape intermédiaire entre $C_0=0$ et C_{max} (3000xMIC pour TMP, 2000xMIC pour CPR) est utilisée. Plusieurs valeurs de concentration sont testées pour cette étape intermédiaire ($C_i=0, 3, 30, 300$ xMIC pour TMP, $C_i=0, 2, 20, 200$ xMIC pour CPR), et le taux d'évolution (ou d'adaptation) est évalué pour chacune d'entre elles. Ce graphique représente le taux d'évolution en fonction de la concentration de l'étape intermédiaire [29].

Au même titre qu'un gradient spatial en voie solide (tel que celui réalisé dans la plaque MEGA), il a été montré qu'un gradient temporel en voie liquide permet une meilleure adaptation des microorganismes à un environnement inhospitalier. En réalisant l'évolution par transfert en série de 1255 populations de *E. coli* (en plaques 96-puits), face à différents taux de stress antibiotique (soudain, modéré et graduel), Lindsey et al. ont prouvé que le chemin évolutif est d'une importance capitale dans

le processus d'adaptation [41]. Ils ont montré que des taux de changements environnementaux trop forts et soudains conduisaient majoritairement à l'extinction des populations, tandis que des taux graduels favorisaient leur adaptation (Figure II-4). Il est facile de comprendre qu'un stress trop fort diminue drastiquement la taille d'une population, et limite donc le taux de mutations associé. Cependant, Lindsey et al. ont montré que ce n'était pas le seul facteur en action. Des sauts évolutifs trop grands empêcheraient aussi l'accès à des mutations intermédiaires (pouvant être neutres), nécessaires à une lignée pour lui permettre de construire une trajectoire mutationnelle jusqu'à une solution. De même, certaines mutations bénéfiques à faible concentration en antibiotique, ne le sont plus à de fortes concentrations. Le niveau d'adaptation d'une lignée dépend de son histoire évolutive. Des successions ou des accumulations de mutations peuvent être nécessaires dans la construction de cette histoire.

Il est donc d'une importance capitale de pouvoir bien gérer la pression de sélection naturelle au sein de nos populations, et de maximiser leur diversité interne.

II.1.A.2.3. Gestion de la double pression de sélection

Une gestion non maîtrisée ou indépendante de ces deux formes de sélections conduit inexorablement à une perte de diversité, voir à l'extinction de la population. En effet, une forte dérive génétique accentuera le poids de la pression de sélection naturelle, et, au contraire, une forte pression de sélection naturelle favorisera les risques de dérive génétique.

Pour diriger l'évolution d'une population en maximisant sa diversité interne, il est donc préférable de travailler par vagues de pressions d'intensité modérée, maintenue sur plusieurs générations (équivalent d'une pression graduelle) et avec des inoculums suffisamment représentatifs. La pression de sélection naturelle permettra dans un premier temps de sélectionner les individus les mieux adaptés. Puis, l'effet de cette pression devenant moins présent (car la population s'adapte), elle permettra à la population de se diversifier à nouveau, et de tendre vers son équilibre. La sélection aléatoire aidera alors au maintien de cet équilibre et pourra laisser la chance à certains individus, ne

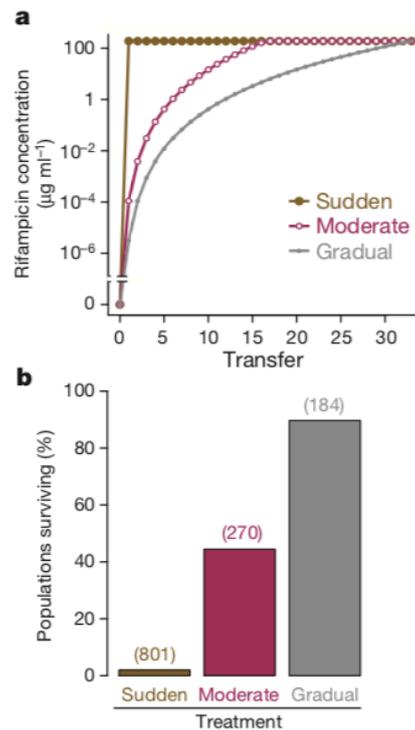


Figure II-4 : Taux de survie en fonction de la pression de sélection

L'évolution de la résistance à la rifampicine est évaluée sur 1255 populations d'*E. coli*, en augmentant la concentration de l'antibiotique d'une valeur minimale de 0mg/ml à une valeur maximale de 190 mg/ml selon trois modes : soudain, modéré, graduel. a- Evolution des pressions de sélection (concentrations en antibiotique) appliquées au sein des populations au cours du temps (selon le mode). b- Pourcentage de populations survivantes face au mode de stress donné. Les chiffres au-dessus des barres de l'histogramme donnent le nombre de populations initiales [41].

s'étant pas adaptés aussi vite que les autres, de déployer des mécanismes d'adaptation qui permettront peut-être leur survie sur le plus long terme. Une fois la population présentant une diversité suffisante, la pression de sélection naturelle pourra être augmentée légèrement, afin de réaliser une nouvelle vague d'adaptation.

En jouant avec les deux niveaux de pression simultanément, on peut voir que l'une permet la modération de l'autre. Là où la sélection naturelle est déterministe et sélectionne les plus adaptés face à un certain critère, la sélection aléatoire, elle, ne l'est pas, ne fait aucune différenciation, et peut aider à la diversification. Ceci peut notamment favoriser le développement d'interactions bénéfiques entre microorganismes, voire au sein d'une même espèce, comme il a été démontré par Richard Lenski [46](I.3.B.2).

Il est à noter que la gestion des pressions de sélection dépend bien évidemment du type d'expérience que l'on souhaite réaliser. Si l'on ne cherche pas à explorer le plus de chemins évolutifs possibles (avec un maximum de diversité), mais au contraire, à trouver la solution la plus rapide face à un stress donné, il peut, par exemple, être plus intéressant d'utiliser une forte pression de sélection naturelle. Il faudra tout de même gérer cette pression pour faire attention à ne pas conduire la population à une extinction.

Le modèle expérimental que nous présentons ici permet, en théorie, de gérer ces deux niveaux de sélection de manière séparée et de faire en sorte que l'une ne prédomine sur l'autre. Nous verrons, dans la suite de cette thèse (III.1), comment parvenir à cela dans la pratique. A la manière d'un morbidostat ou d'un turbidostat, où conditions de cultures et pressions de sélections (naturelles et aléatoires) sont dynamiquement ajustées en fonction de l'adaptabilité des microorganismes à chaque cycle de dilution, un mécanisme permettant la gestion de la propagation (sélection aléatoire) et de la pression de sélection naturelle au sein de nos populations en temps réel semble nécessaire dans notre technologie.

II.1.A.3. Un double niveau d'échelle source d'une double diversité

Jusqu'à présent, nous n'avons considéré qu'une unique population. Cela nous a permis de montrer qu'une population peut en fait être considérée comme une entité Darwinienne, qui se reproduit en transmettant ses variations à sa descendance. Cette première étape nous a aussi permis d'évaluer les mécanismes sur lesquels jouer pour gérer sa diversité interne (taille de la population, de l'inoculum, nombre de générations, pression de sélection naturelle). Cependant, en vue de travailler sur l'évolution de populations, nous ne pouvons pas considérer une seule population. En effet, nous avons vu I.3.B.2 que la parallélisation est nécessaire, afin d'acquérir une diversité entre les populations (inter-populations) et ainsi explorer le plus grand nombre de chemins évolutifs possibles.

Reprenons le modèle de la Figure II-1, en considérant maintenant un certain nombre P de populations (Figure II-5).

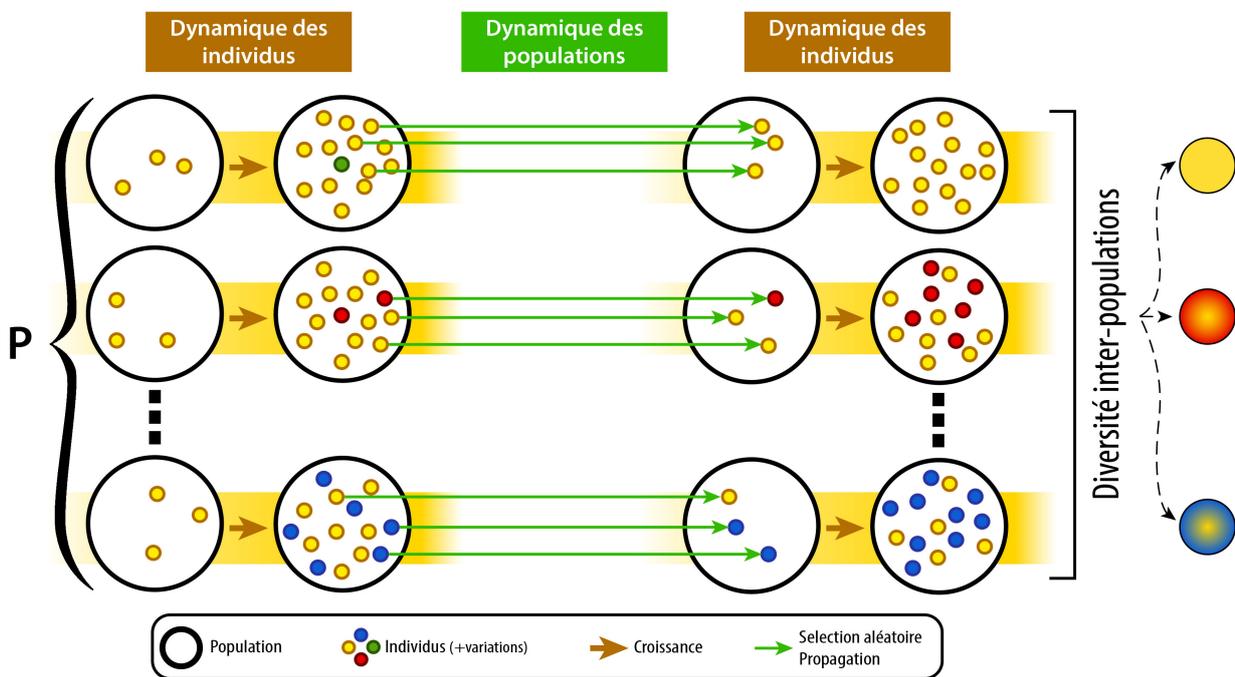


Figure II-5 : Une double diversité

Ce schéma montre comment appliquer les propriétés Darwiniennes à un nombre P de populations en parallèle. Il reprend simplement le modèle utilisé sur une population unique (présenté Figure II-1) et l'applique à plusieurs populations. Ce modèle correspond en fait à une expérience de transfert en série, dans laquelle chaque population est soumise à sa propre dynamique et donc à ses propres pressions de sélections aléatoires et naturelles, comme vu précédemment. De la différence de composition phénotypique entre les populations naît un niveau de diversité supplémentaire, appelé diversité inter-populations (droite). La parallélisation des populations conduit ainsi à un double niveau de diversité intra et inter populations (schéma inspiré de [52]).

Comme nous pouvons le voir Figure II-5, ce double niveau d'entités Darwiniennes individu-population mène à un double niveau de diversité intra et inter populations, qu'il faut pouvoir maîtriser. Nous avons vu dans le paragraphe précédent comment gérer la diversité intra-population, et la maximiser, dans le cas où l'on considérerait une population unique. Lorsque l'on considère plusieurs populations, un nouveau phénomène apparaît : le flux génétique. Ce phénomène, assez courant dans la nature, concerne la migration d'individus entre deux populations (ou sous-populations). Il peut être caractérisé comme source d'innovation génétique pour les populations (un peu comme les mutations au niveau des individus). Il apporte de nouveaux allèles dans une population, voire de nouvelles espèces

dans des communautés. Le flux et la dérive génétiques ont donc des effets opposés. Alors que la dérive génétique joue en faveur de la diversité inter-populations, en diminuant l'intra-population, le flux génétique tend lui à homogénéiser les variations entre populations, diminuant ainsi la diversité inter-populations et augmentant la diversité intra-populations. Dans la nature, plusieurs niveaux de flux génétiques existent. Dépendant de la structure de l'habitat, et de celles des populations, on voit donc plusieurs phénomènes apparaître dans les métapopulations⁵. Ainsi, on peut trouver des populations totalement indépendantes, où chacune va diverger de son côté, ou au contraire très interdépendantes, où l'extinction de l'une conduira l'extinction de la métapopulation (ensemble des sous populations). Il existe aussi des états intermédiaires, où les flux de migrations sont trop faibles pour affecter une population, mais pourront, dans le cas de l'extinction d'une population, coloniser la niche alors laissée libre [54].

Nous verrons par la suite (Chapitre IV) que dans notre système, le flux génétique est minimisé, et qu'il peut être considéré comme négligeable. Il est possible que des niches vides soient colonisées après un temps d'incubation suffisamment long, mais le flux génétique n'affectera pas une population présente.

II.1.B. Gestion de la diversité inter-populations : une question de sélection

II.1.B.1. Le transfert en série et ses limites

Manipuler plusieurs populations simultanément, même si cela ne consiste qu'à les propager toutes de manière indépendante, sans appliquer de sélection au niveau des populations à propager (comme dans l'exemple de la Figure II-5), permet déjà d'étudier un grand nombre de chemins évolutifs en parallèle. Dans un tel système, chacune des lignées représente une expérience indépendante et peut présenter, sous les mêmes conditions, des chemins évolutifs différents. L'expérience de Lenski (I.3.B.2)[43], bien que conduite à la main sur uniquement une douzaine de lignées en parallèle, en fournit une belle preuve. Or il a été montré que dans une telle expérience, la diversité globale était proportionnellement liée au nombre de populations considérées, à leur taille, et au taux de mutation des individus les composants [52]. Augmenter le taux de mutation des individus reviendrait à les modifier synthétiquement, chose que nous ne souhaitons pas faire ici. Le bon moyen d'augmenter la diversité (et ainsi d'étendre l'exploration) dans une expérience de transfert en série, est donc de maximiser la taille des populations et leur nombre.

Jusqu'à présent nous considérons que toutes les populations étaient soumises aux mêmes conditions, et forces évolutives. Cependant, dans un tel système de transfert en série, il est tout à fait imaginable que chacune des lignées puisse être soumise à ses propres paramètres (taille de l'inoculum, pression de sélection naturelle). Des variations entre pressions naturelles et aléatoires pourraient par exemple être instaurées sur un ensemble de populations, afin d'insister sur la diversité inter-populations, et d'explorer un maximum de chemins évolutifs différents. Cependant, un des problèmes majeurs du transfert en série reste le manque de contrôle sur la diversité inter-populations. En effet, dans un tel système, la diversité inter-populations dépend uniquement de phénomènes aléatoires : mutations et dérive génétique. De plus, si les conditions initiales ne sont pas les bonnes, ou bien à cause

⁵ On appelle « métapopulation » une « grande » population composée de plusieurs « sous » populations.

de la dérive génétique, une ou plusieurs lignées peuvent venir à s'éteindre. Or des lignées vides ne sont pas souhaitables et doivent être évitées au maximum. Un bon moyen d'éviter ces phénomènes, et d'introduire de la diversification inter-populations est d'appliquer la sélection artificielle au niveau des populations, pour diriger leur évolution.

II.1.B.2. La sélection artificielle au cœur l'évolution dirigée

Nous venons de voir que le transfert en série est une bonne méthode pour faire évoluer un grand nombre de populations en parallèle, par le biais des sélections aléatoire et naturelle. Cependant, le double niveau d'échelle individu-population implique un double niveau de diversité qu'il faut pouvoir gérer, car la diversité est au cœur de l'évolution. Or, le transfert en série présente des limitations quant à la gestion de la diversité inter-populations. Afin de pallier à ces limitations, un bon moyen est d'ajouter un troisième niveau de sélection, cette fois-ci, entre les populations à propager.

Dans la nature, une espèce possédant les propriétés Darwiniennes (variation, reproduction, hérédité), évolue par le biais de la sélection naturelle pour s'adapter à son environnement. Mais nous savons aussi que cette évolution peut être dirigée, afin d'améliorer, ou de développer des traits phénotypiques particuliers. Sous l'intention de l'Homme, cela a donné naissance à la sélection artificielle. Via cette dernière, de nombreuses espèces, végétales et animales, ont vu se développer de nouvelles caractéristiques face à une pression de sélection appliquée génération après génération par l'Homme (ex : élevage du bétail, domestication des animaux : chats, chiens, et des plantes : blé, maïs ...). La sélection artificielle est la clef à exploiter en vue de diriger l'évolution de populations ou communautés microbiennes.

Pour illustrer cela, reprenons le modèle de la Figure II-5, en considérant maintenant qu'au lieu de simplement transférer toutes les populations en série, on applique un critère artificiel de sélection au niveau des populations. Ainsi, à chaque cycle, seules les populations répondant à ce critère seront propagées, et donneront plusieurs descendants, tandis que les populations non sélectionnées n'en donneront pas (Figure II-6). Ce niveau de sélection supplémentaire permet d'instaurer un processus de « naissance-décès » au niveau des populations, et sur une échelle de temps plus grande que celle des individus. La naissance d'une population est synonyme de sa propagation, son décès de sa suppression. Étant donné que nous considérons, dans ce modèle, les échanges entre populations dus au flux génétique comme négligeables, il est possible d'établir une démographie au niveau des populations.

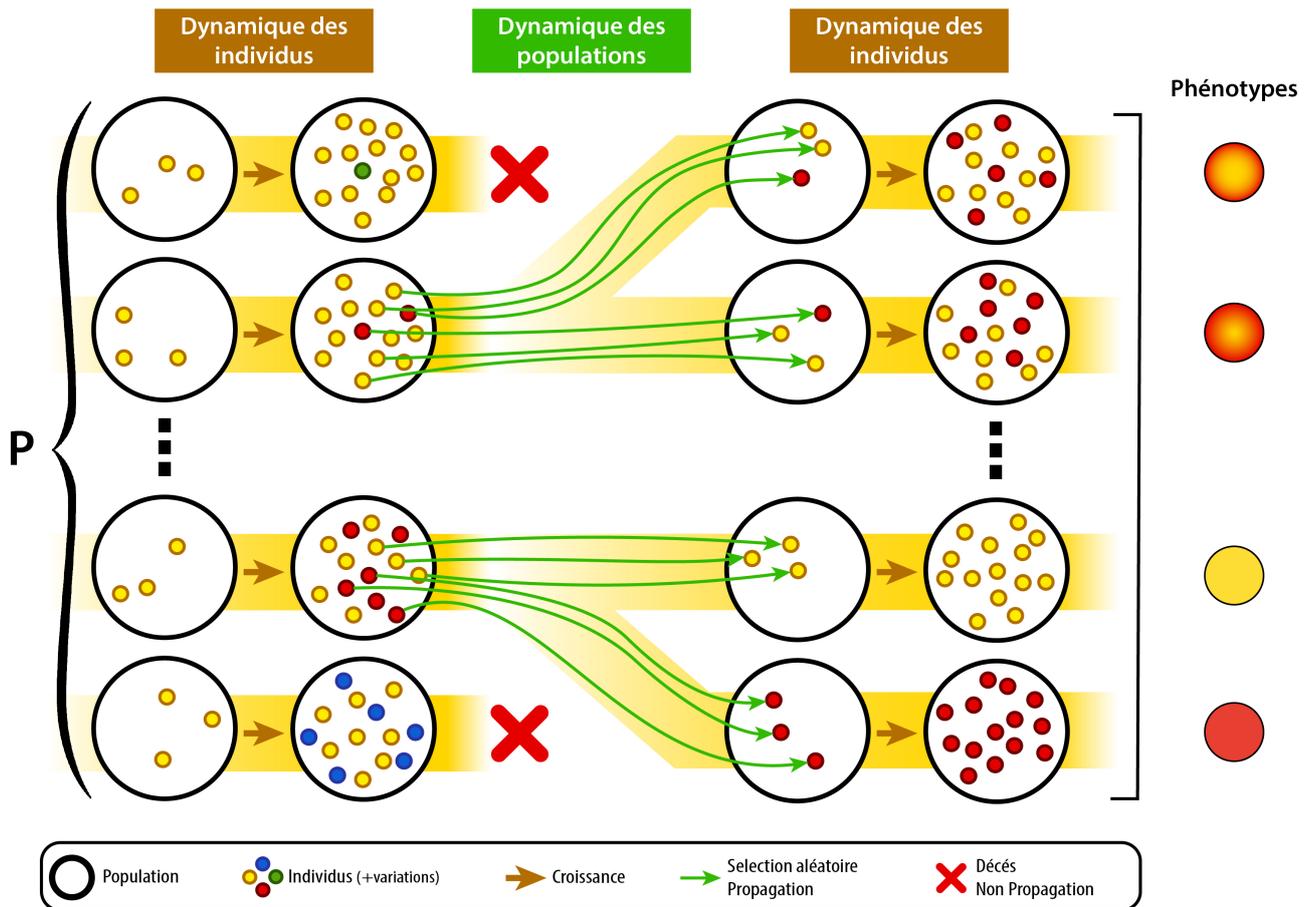


Figure II-6 : La sélection artificielle au cœur de l'évolution dirigée

Ce schéma montre comment la sélection artificielle permet de gérer la diversité inter-populations. Un critère de sélection (au niveau des populations) peut être établi et permettre de diriger l'évolution. Les populations répondant au critère sont propagées (naissance), et dupliquées, tandis que celles ni répondant pas sont supprimées (décès). Ici, par exemple, nous ne souhaitons conserver que les populations contenant des individus jaunes/rouges. Après le premier cycle de propagation sous sélection artificielle, on voit bien l'ensemble des populations obtenues tendent à avoir un phénotype jaune/rouge. Sans sélection, nous aurions eu un phénotype jaune/vert, un jaune/bleu, et deux jaune/rouge. Ceci prouve que la sélection artificielle permet la gestion de la diversité inter-populations, et est un outil puissant pour diriger l'évolution. Aussi, ce schéma illustre bien l'effet de la dérive génétique. Sur les deux populations du bas, on peut voir qu'à partir d'une population mère jaune/rouge, on obtient une population fille jaune et une rouge (schéma inspiré de [52]).

Comme nous pouvons le voir Figure II-6, les trois niveaux de sélections sont bien présents, mais découplés et appliqués à des échelles différentes. Alors qu'on laisse la sélection naturelle agir au sein des populations, et que l'aléatoire intervient lors de la reproduction des populations, la sélection artificielle, elle, n'interviendra qu'au niveau du choix des populations à propager. Là où la sélection naturelle est adaptative et autorégulée, l'emploi de la sélection artificielle vise aussi à l'adaptation mais, sous un effet d'intentionnalité extérieur. Dans la nature, une solution adaptative ne résulte pas forcément d'une sélection naturelle unidirectionnelle, ou favorisant les phénotypes les plus nombreux. Différents modes de sélection constituent la sélection naturelle et sont applicables artificiellement : la sélection stabilisante, la sélection directionnelle et la sélection diversifiante (Figure II-7).

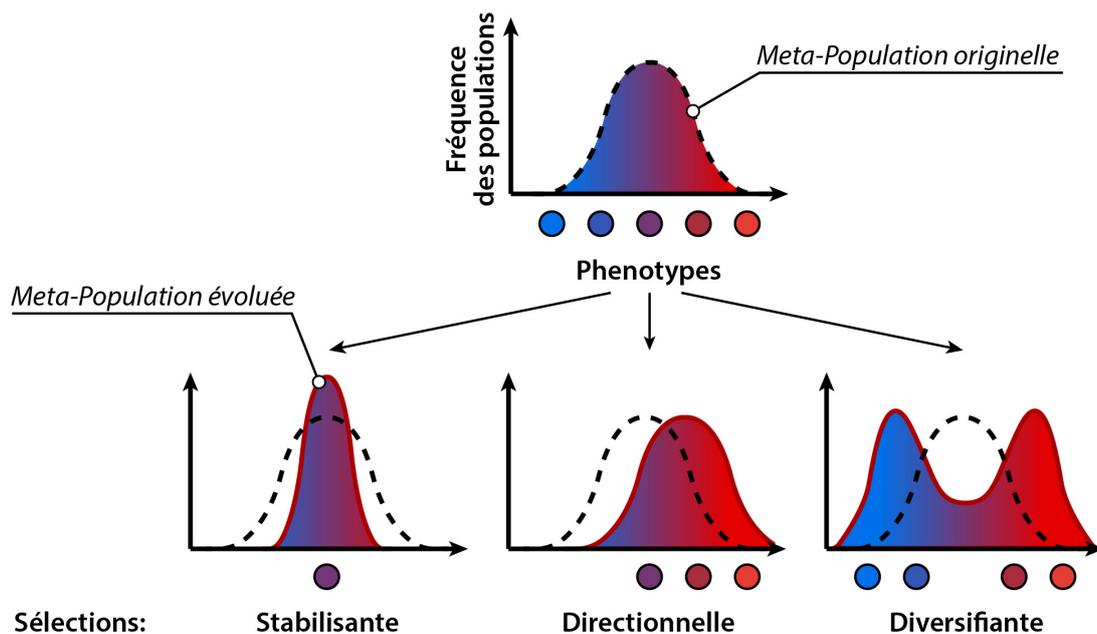


Figure II-7 : Modes de sélections applicables par sélection artificielle

Dans la nature, différents modes de sélection existent : la sélection stabilisante, la sélection directionnelle et la sélection diversifiante. La première sélectionne les phénotypes les plus représentés et resserre la distribution phénotypique, la seconde décale la distribution phénotypique vers des phénotypes peu représentés, la troisième diversifie les phénotypes en favorisant les extrêmes de la distribution. Ces modes de sélection sont aussi applicables artificiellement.

Pour rester en équilibre dans un environnement changeant, une population (ou communauté) doit tendre à se stabiliser dans son milieu (sélection stabilisante) tout en se diversifiant (sélection diversifiante), et doit également pouvoir proposer de nouvelles solutions adaptatives (sélection directionnelle) face à un changement majeur au sein de l'environnement. Ces trois modes de sélection, œuvrant à l'adaptabilité dans la nature, peuvent aussi être employées de manière artificielle pour diriger l'évolution.

L'emploi de la sélection artificielle ne se résume donc pas à sélectionner à chaque cycle les populations les plus adaptées. Elle peut ainsi être mise à profit pour favoriser la diversification inter-populations, ou encore l'exploration de chemins « non naturels », en dirigeant l'évolution vers des voies non favorisées par la nature. Cependant, ces trois formes de sélection doivent rester en équilibre car des pressions stabilisante, diversifiante, ou directionnelle trop fortes conduiront inexorablement à une fin évolutive. Dans le but de diriger l'évolution de communautés de microorganismes en maximisant les opportunités évolutives, il faudra donc jouer avec ces trois types de sélection intelligemment. Certes, une sélection directionnelle est nécessaire pour orienter l'évolution dans la direction souhaitée, et pour permettre à des populations de s'adapter à de nouvelles conditions. Si elle est suffisamment maintenue, elle peut même conduire à la spéciation. Cependant, des étapes de stabilisation et de diversification sont aussi nécessaires pour que nos populations restent versatiles. En modifiant le poids de chacune d'entre elles au cours du temps, il est possible de maximiser la diversité globale, et ainsi d'explorer le plus grand nombre de chemins évolutifs possibles.

Mais, la sélection et la propagation des populations, au cœur de ce modèle car nécessaires pour conduire la sélection artificielle, permettent également d'accéder à une capacité de maîtrise quasi totale des diversités intra et inter populations. En effet, elles permettent de créer de la diversité inter-populations à partir d'une diversité intra-population présente (Figure II-8-A), ou au contraire, de créer de la diversité intra-population à partir d'une diversité inter-populations (Figure II-8-B). La sélection artificielle représente le pont de communication entre ces deux diversités, et apporte le contrôle jusqu'à présent manquant sur ces diversités. Dans une expérience d'évolution dirigée il est de plus possible, en cas d'extinction d'une lignée, de la remplacer par division d'une population mère, ce qui n'est pas le cas dans une expérience de transfert en série.

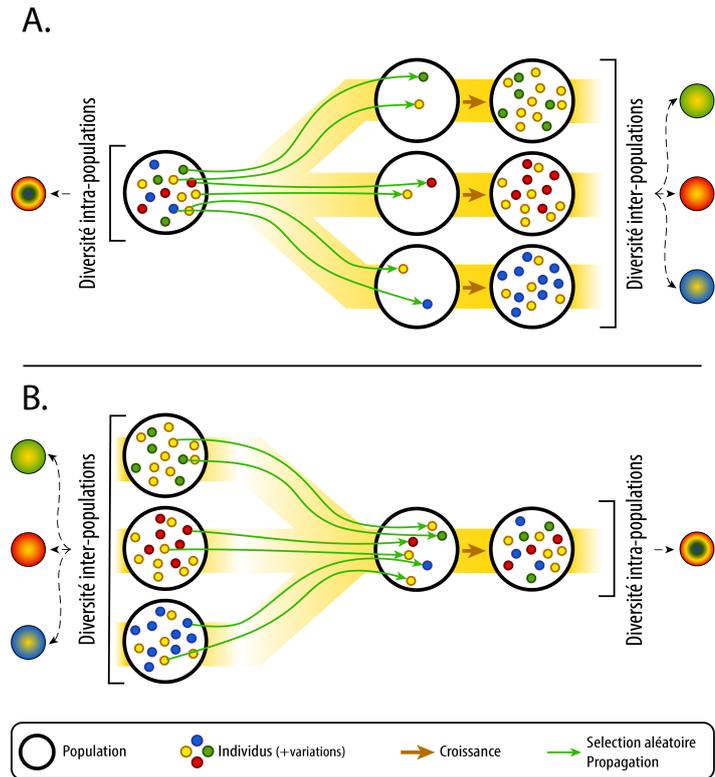


Figure II-8 : Gestion de la double diversité

Ce schéma montre comment la sélection artificielle permet d'établir le pont de communication manquant entre les deux niveaux de diversité. A- Division d'une population mère en trois populations filles (intra -> inter). B- Mélange de trois populations mères dans une population fille (inter -> intra).

Ce niveau de contrôle sur les populations est primordial dans un instrument d'évolution, et nous devons nous assurer que notre technologie permette sa mise en œuvre.

II.1.C. Vers une méthode appliquée : les clef de l'évolution à appliquer

La maximisation des opportunités évolutives passe par une bonne gestion des deux niveaux de diversité intra et inter populations. Or, nous avons montré que dans le modèle proposé, et une fois la taille et le nombre de compartiments fixés, ce sont les sélections, aléatoire, naturelle, et artificielle qui sont au cœur de cette gestion.

Il est tout à fait concevable de réaliser ce type d'expérience sur un petit nombre de compartiments à la main, à la manière dont l'a fait Lenksi, sur 12 flasques [43], ou encore de manière automatisée, en parallélisant des morbidostat, comme l'ont fait Toprak et al. sur 5 réacteurs [35]. Flasques et réacteurs représentent de parfaits environnements dans lesquels des communautés peuvent être compartimentées et manipulées en vue d'instaurer une démographie des communautés. Cependant, ces systèmes ne sont pas adaptés à la manipulation d'un grand nombre de compartiments en parallèle. Comme nous l'avons conclu au Chapitre I (I.3.C), il n'y a aujourd'hui aucune méthode adaptée pour diriger efficacement l'évolution de communautés microbiennes. Une nouvelle technologie est requise, et elle se doit de pouvoir manipuler ces trois types de sélections sur un grand nombre de

compartiments (contenant des communautés), en parallèle. Cette technologie devra donc présenter les avantages de pouvoir gérer :

- la sélection aléatoire, en permettant le contrôle du taux de dilution (taille de l'inoculum) de chaque population, qui va de pair avec le contrôle de leur temps de croissance (équivalent au nombre de générations par cycle)
- la sélection naturelle, en permettant le contrôle des conditions de culture, et donc du stress appliqué, au sein de chaque population. Ces conditions devront de plus pouvoir être ajustées en fonction de l'adaptabilité des microorganismes, qui devra donc être mesurée.
- la sélection artificielle, en permettant la manipulation des populations : leur sélection face à un critère donné (vérifié par analyse phénotypique), puis leur propagation (pouvant consister à une séparation ou un mélange).

Imaginons qu'une technologie présente ces propriétés et permette de les appliquer sur des centaines, voire des milliers de populations de manière automatisée. Alors, l'enjeu en deviendrait tout à fait différent. Ici, nous touchons du doigt la finalité de cette thèse, qui est de développer, dans la continuité des précédents travaux réalisés au sein du laboratoire, une nouvelle technologie totalement automatisée permettant la manipulation et l'évolution dirigée de centaines de communautés microbiennes en parallèle. Avant d'en venir à cette technologie (Chapitre III), nous souhaitons présenter la science sur laquelle elle repose, la millifluidique en gouttes, ainsi que le travail de recherche préliminaire ayant été conduit au sein du laboratoire ces quinze dernières années.

II.2. La millifluidique et la puissance des gouttes millimétriques

Au même titre que des flasques, les gouttes sont des bioréacteurs permettant d'appliquer les propriétés Darwiniennes à des communautés. Compartimentation et parallélisation sont au cœur de notre modèle, et se trouvent être la base de la millifluidique digitale. Dans ce sous chapitre, nous introduirons cette science et verrons comment les gouttes permettent la culture, la manipulation et l'analyse de communautés microbiennes.

II.2.A. Introduction à la millifluidique digitale

La millifluidique est la science de la manipulation des fluides à l'échelle millimétrique. A l'instar de la microfluidique (manipulation à l'échelle micrométrique), elle présente la possibilité de manipuler des gouttes, émulsions de phase hydrophile (ex : eau) appelée phase discontinue, dans un fluide porteur hydrophobe (ex : huile) appelé phase continue. On parle alors de millifluidique digitale, ou millifluidique en gouttes. Ici, nous souhaitons introduire cette science, et montrer en quoi elle présente les caractéristiques requises pour fonder une technologie d'évolution de communautés microbiennes. En effet, les critères de base d'une telle technologie sont de pouvoir manipuler un grand nombre de compartiments en parallèle, tout en contrôlant leurs propriétés internes. Les gouttes se sont déjà avérées être un parfait outil à cet égard, notamment en microfluidique. Cependant, et bien que les gouttes microfluidiques présentent de nombreux avantages, l'échelle micrométrique présente aussi des limitations quant à l'évolution de communautés microbiennes. C'est de ces avantages et limitations que découle la solution millifluidique, similaire à la microfluidique, mais à une plus grande échelle.

Dans un premier temps, nous présenterons brièvement la microfluidique digitale, ses avantages, et ses limitations en vue de travailler sur l'évolution de communautés microbiennes. Ensuite, nous introduirons la millifluidique en gouttes. Nous verrons comment les recherches au sein du laboratoire ces quinze dernières années ont mené au développement d'un instrument d'analyse millifluidique, puis, à l'enjeu porté par cette thèse, à savoir : développer une technologie d'évolution de communautés bactériennes.

II.2.A.1. Les gouttes en microfluidique

La microfluidique s'intéresse à la manipulation de fluides au sein de canaux microfabriqués et de taille micrométrique (typiquement de 10 à 100 μm). Depuis le début des années 1990, la microfluidique connaît un véritable essor dû au développement des techniques de microfabrication. Se développent alors de petits dispositifs, des puces de quelques centimètres carrés nommées « laboratoires sur puces », permettant de réaliser un grand nombre d'opérations de laboratoire, chimiques ou biologiques, en un temps record, avec un minimum de réactifs et de consommables [55]. A la manière des puces électroniques et de leurs circuits intégrés, ces puces microfluidiques intègrent de nombreux canaux permettant de réaliser un tas d'opérations sur les fluides. Un des avantages principaux de ces dispositifs se révèle rapidement être l'utilisation de microgouttes, donnant alors naissance à la microfluidique digitale. La génération de microgouttes (de quelques femtolitres à quelques nanolitres) monodisperses à haut débit (jusqu'à $\sim 2\text{kHz}$) permet la formulation d'émulsions, la synthèse de microparticules, mais a aussi fait de la microfluidique un puissant outil pour les applications biomédicales [56]. Les gouttes représentent en effet des microréacteurs indépendants pouvant être individuellement transportés, mélangés, analysés, triés et permettant l'encapsulation de nombreuses entités biologiques (cellules, protéines, ADN...). Elles trouvent ainsi des applications pour la délivrance thérapeutique (microcapsules biocompatibles et biodégradables contenant des médicaments), le diagnostic médical, la recherche de médicaments par criblage haut débit, la synthèse de biomolécules, l'expression de protéines, l'amplification d'ADN (PCR) ou encore pour l'évolution dirigée de protéines [56]. Couplée à la biologie synthétique, l'évolution dirigée a notamment permis d'améliorer l'efficacité d'enzymes, de créer de nouvelles classes de médicaments, ou encore de développer des souches de microorganismes améliorées pour l'industrie. Elle se trouve également être un puissant outil pour étudier les mécanismes d'évolution au niveau cellulaire.

Ces dispositifs sont très adaptés à l'étude de cellules uniques, mais l'échelle microfluidique n'est pas adaptée à l'évolution de communautés microbiennes. La taille des gouttes limite leur capacité à un maximum de 10^3 cellules, ce qui est faible et ne favorise pas la diversité au sein des populations ou communautés (diversité intra-goutte). De plus, et bien que ces systèmes facilitent la manipulation de petits volumes, ils ne favorisent pas la manipulation des compartiments un-à-un. Dans de tels systèmes, le transfert d'un petit échantillon (de taille contrôlé) d'une goutte mère à une goutte fille selon le modèle présenté précédemment et sur un grand nombre de gouttes semble très difficile, voire impossible.

Cette introduction à la microfluidique nous a, à la fois, permis d'identifier les avantages des microgouttes dans la compartimentation, la parallélisation, la manipulation et l'analyse, ainsi que de révéler leurs limitations en vue de travailler sur l'évolution de communautés, dues à une question d'échelle. La millifluidique digitale a pour but de tirer parti des avantages présentés par les gouttes

microfluidiques tout en s'affranchissant des limitations qu'elles présentent en vue de travailler sur l'évolution.

II.2.A.2. Les gouttes en millifluidique

A l'instar de la microfluidique digitale, la millifluidique digitale vise à manipuler des gouttes hydrophiles dans un fluide porteur hydrophobe, la principale différence étant que les canaux sont ici des tubes de taille millimétrique (pouvant aller de quelques centaines de micromètres à quelques millimètres). Les avantages et inconvénients de la microfluidique que nous avons évoqués ont poussé le laboratoire à développer la millifluidique digitale. En effet, les avantages de la microfluidique sont, pour la plupart, transposables à la millifluidique tandis que les limitations d'échelle s'estompent. L'augmentation du volume des gouttes permet de faciliter leur manipulation, de considérer un plus grand nombre de cellule par goutte, et d'envisager le transfert d'échantillons de taille raisonnable. De plus, là où les puces microfabriquées sont peu durables et facilement endommageables, les tuyaux millimétriques sont eux facilement assemblables, démontables, rinçables, remplaçables, et sont donc plus adaptés à des manipulations sur le long terme (comme, par exemple, des expériences d'évolution). Ainsi, depuis plus de dix ans, la millifluidique en gouttes est devenue l'un des secteurs de recherche clé du laboratoire. Ces recherches ont conduit en 2006, au développement d'un premier instrument de culture et d'analyse de populations bactériennes, totalement automatisé, et basé sur la millifluidique digitale [57]. Cet instrument, nommé MDA (« Millifluidic Droplet Analyser », photo en Annexe II), permet de manipuler et d'analyser facilement et efficacement un millier de populations bactériennes en parallèle à l'aide de gouttes d'une centaine de nanolitres. La technologie a déjà fait ses preuves et s'est avérée parfaitement adaptée pour étudier la dynamique de croissance de populations microbiennes issues d'une cellule unique. Le phénotypage dynamique des populations a ainsi permis la mesure très reproductible de MICs bactériens de haute précision (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) [57], [58], la mise en évidence d'hétérogénéités phénotypiques de croissance au sein de populations d'algues (*Chlamydomonas reinhardtii*) [59], ou chez des bactéries (*E. coli*) suite à une longue période de famine [60] ou en réponse à un stress antibiotique [61]. Par la suite, le développement de cet instrument millifluidique s'est poursuivi et a conduit à des versions plus évoluées [62], [63]. En 2015, ces développements ont mené à un aboutissement industriel, avec la création d'une start-up (Millidrop®) commercialisant un instrument automatisé de culture et d'analyse d'un millier de communautés microbiennes en parallèle. Purement dédié à l'analyse, cet outil n'est pas voué à travailler sur leur évolution. Depuis lors, le laboratoire s'est fixé le défi de continuer la recherche autour de la millifluidique pour parvenir à développer une technologie d'évolution de communautés microbiennes, dont nous traiterons dans le Chapitre III.

Nous souhaitons, dans ce chapitre, présenter les bases de la millifluidique digitale et du MDA, instrument de culture et d'analyse de communautés microbiennes. Cette technologie reposant sur la millifluidique digitale, nous souhaitons dans un premier temps montrer en quoi les gouttes de taille millimétriques favorisent la **culture** de microorganismes. Nous détaillerons ensuite le processus au cœur de cet instrument, permettant à la fois l'incubation et l'analyse continue des bioréacteurs : la **manipulation**. Enfin, nous présenterons le système mis en œuvre pour conduire cette **analyse**.

Avant d'entrer dans les détails de chacune de ces fonctions mères de l'instrument, et afin de mieux comprendre comment fonctionne le MDA, nous souhaitons en donner une vue d'ensemble par

une schématisation (Figure II-9). Pour parvenir à réaliser l'incubation et l'analyse de gouttes, la technologie doit en premier lieu permettre leur génération puis leur manipulation. Son fonctionnement peut donc être synthétisé en trois modules : la génération, la manipulation, l'analyse. A ce système a été ajouté un module supplémentaire permettant la récupération des bioréacteurs à l'extérieur de l'instrument, et leur tri.

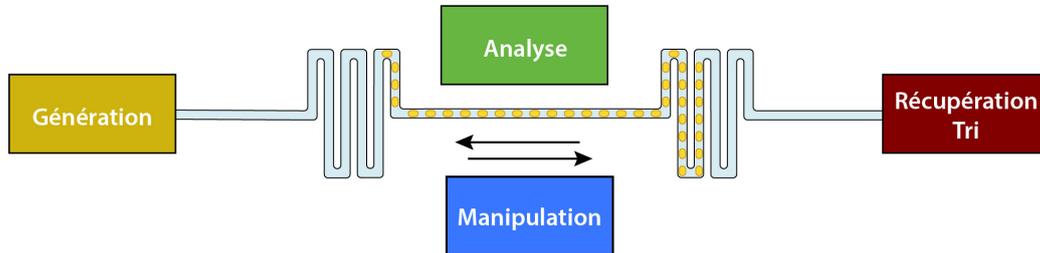


Figure II-9 : MDA - Schéma global

Le MDA se compose de 4 fonctions mères : la génération des gouttes, leur manipulation, leur analyse et enfin leur récupération/tri. Ces différentes fonctions seront présentées au cours de ce chapitre (photo en Annexe II).

II.2.B. Les gouttes : bioréacteur pour la culture de microorganismes

Au même titre que des flacons contenant du milieu de culture, les gouttes en millifluidique représentent des bioréacteurs dans lesquels des microorganismes peuvent être cultivés (Figure II-10).

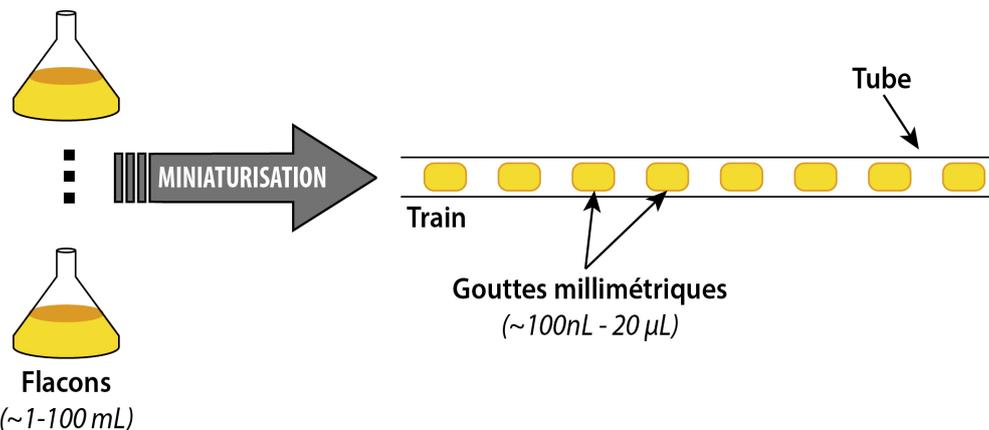


Figure II-10 : Miniaturisation en gouttes millimétriques

La miniaturisation des cultures en gouttes millimétriques permet la parallélisation d'un nombre de compartiments bien plus important qu'avec les méthodes de culture classique (des milliers face à des dizaines). Elle favorise ainsi la diversité inter-populations tout en conservant des tailles de populations suffisamment grandes (plusieurs millions de cellules) permettant d'observer une diversité intra-population intéressante, avec une fréquence suffisamment grande d'apparition de mutants. Un ensemble de gouttes arrangées linéairement dans un tube est appelé « train de gouttes ».

Dans le MDA, les gouttes millimétriques, typiquement d'une centaine de nanolitres en volume ($V = \pi r^2 L \approx 100 \text{ nL}$, avec $d = 2r = 500 \mu\text{m}$ et $l = 750 \mu\text{m}$), représentent un environnement contrôlé dans lequel des microorganismes ou des communautés, peuvent croître. Contrairement à la microfluidique, où les gouttes ne permettent de contenir qu'un faible nombre de cellules (avec un maximum de 10^3 individus par gouttes), la millifluidique permet la manipulation de populations plus conséquentes. Avec en moyenne 1 million de cellules par microlitre à saturation, elle permet ici d'atteindre des populations de l'ordre de 10^5 individus. Ces tailles sont suffisamment grandes pour permettre l'apparition de mutants et ainsi favoriser une diversité génétique intra-goutte, et donc intra-population. En effet, si l'on

reprend l'ordre de grandeur donné pour les bactéries *E. coli*, avec l'apparition d'un mutant toutes les 10 000 réplifications, on peut estimer leur nombre à une dizaine dans une même goutte. Si l'on s'intéresse à une mutation spécifique uniquement, la probabilité d'apparition étant de 10^{-7} par réplification, on peut estimer qu'un mutant spécifique aura 1 chance sur 100 d'apparaître dans une goutte de 100nL. Il faudrait donc manipuler 100 gouttes de 100nL pour être sûr de voir un mutant apparaître. Or l'intérêt d'utiliser la millifluidique digitale comme base d'une technologie d'évolution réside justement dans sa capacité de pouvoir manipuler un grand nombre de compartiments en parallèle. Ces gouttes étant de taille millimétrique, il est facile d'en manipuler en grande quantité (plusieurs centaines, voire quelques milliers) en parallèle dans un même tube de seulement quelques mètres de long (enroulé sur lui-même, ce tube rentre dans un cercle de 10cm de rayon). Sur un ensemble de 1000 gouttes, par exemple, l'apparition de mutants devient donc assez fréquente. De plus, chaque goutte étant un compartiment indépendant, cette structure favorise la diversité inter-gouttes, et donc inter-populations, nécessaire, comme nous l'avons vu, à l'exploration d'un maximum de chemins évolutifs.

Les caractéristiques que nous venons de présenter concernent le MDA, instrument dédié à l'analyse de populations et non à leur évolution. Néanmoins, et comme nous l'avons évoqué précédemment, depuis 2015, les travaux de recherche se sont poursuivis au sein du laboratoire en vue de se diriger vers le développement d'une technologie d'évolution. Un travail de recherche conséquent a ainsi été mené afin de maximiser la diversité manipulable en millifluidique [54]. Un millier de compartiments sont suffisants pour observer une grande diversité inter-populations et donc permettre l'exploration d'un grand nombre de chemins évolutifs en parallèles. En revanche, la diversité intra-population peut ici être optimisée de manière simple. En effet, la diversité interne d'une population dépend de la taille de la goutte, et il est assez aisé de l'augmenter : il suffit d'utiliser des

tubes de plus grand diamètre et/ou des gouttes plus longues. Une étude visant à évaluer la dynamique et la stabilité de trains d'un millier de gouttes en fonction du diamètre du tube a ainsi été conduite au sein du laboratoire, avant ces travaux de thèse (Figure II-11)[54]. Elle a permis d'identifier le diamètre optimal ($d=2.15\text{mm}$) permettant de concilier taille maximale des gouttes et stabilité du train. Le volume des gouttes est alors passé de 100nL (volume employé dans le MDA) à $10\mu\text{L}$, avec des gouttes 50% plus longues que larges ($l=3.4\text{mm}$, $d=2.15\text{mm}$), conduisant ainsi à une augmentation considérable de la taille des populations (de 10^5 à 10^7 individus). Au cours de ma thèse, ce volume a encore été optimisé pour atteindre un volume autour de $20\mu\text{L}$ ($l=6\text{mm}$, $d=2.15\text{mm}$), soit 20 millions de cellules par gouttes à saturation. Dans un tel volume, le nombre de mutations passe ainsi d'une dizaine à plusieurs centaines, voire un millier par gouttes, avec 1 chance sur 5 de voir apparaître une mutation spécifique

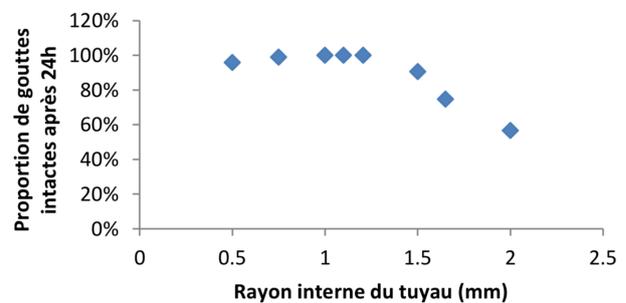


Figure II-11 : Stabilité d'un train en fonction du rayon du tube

Pour évaluer la stabilité d'un train en fonction du diamètre du tube employé, des trains de 1152 gouttes (de diamètre d et de longueur $l=2d$) ont été incubés durant 24h à 37°C dans des tubes de différents rayons (allant de 0,5 à 2 mm). A la fin de chaque incubation, la proportion de gouttes intactes était alors évaluée, donnant une estimation de la stabilité du train. Ce graphique montre qu'à mesure que le diamètre se rapproche de la longueur capillaire $l_{\text{cap}}=2,3\text{mm}$ le train devient instable sous l'effet de la gravité (voir détails en II.2.C.1.1). Le diamètre limite est ici estimé à 2,41mm, mais par mesure de sécurité, le diamètre choisi est de 2,15mm [54].

(contre 1/100 précédemment). Sur plusieurs centaines de gouttes, cette fréquence d'apparition devient donc élevée.

Là où l'échelle micrométrique présentait des limitations quant au volume des gouttes, la millifluidique présente des avantages. Les gouttes millimétriques remplissent les conditions nécessaires pour permettre la culture de communautés de microorganismes et sont suffisamment grosses pour envisager le prélèvement et le transfert d'échantillons de taille raisonnables. Portée à ses limites d'échelle, la millifluidique et les gouttes millimétriques fournissent un puissant outil favorisant la diversification intra et inter populations. Nous souhaitons à présent aborder les aspects liés à leur manipulation.

II.2.C. Les gouttes : bioréacteur pour la manipulation de communautés microbiennes

La manipulation des gouttes est au cœur de l'instrument millifluidique. Confinées au sein d'un tube, et entourées par le fluide porteur hydrophobe (généralement de l'huile), ces gouttes peuvent être manipulées en appliquant une différence de pression entre les deux extrémités du tube. En effet, la vitesse de déplacement des gouttes à l'intérieur du tuyau dépend du débit, qui est égal à la différence de pression sur la résistance hydraulique (Équation II-1).

$$v = \frac{Q}{S} \quad (a) \quad \text{et} \quad \Delta P = Q \times R_h \Leftrightarrow Q = \frac{\Delta P}{R_h} \quad (b)$$

Équation II-1 : Relation entre vitesse et débit d'un fluide, et débit, pression et résistance hydraulique

(a) La vitesse v d'un fluide dans un conduit est directement proportionnel à son débit Q sur sa surface de propagation S . (b) Or le débit du fluide Q dépend uniquement de la différence de pression ΔP appliquée aux extrémités du conduit et de la résistance hydraulique R_h de ce dernier.

Or la résistance hydraulique dans un canal cylindrique (Équation II-2) dépend principalement du rayon du canal.

$$R_h = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$$

Équation II-2 : Résistance hydraulique dans un canal cylindrique

L'expression de la résistance hydraulique R_h dans un canal cylindrique pour fluide monophasique incompressible en régime laminaire est donnée par l'équation ci-dessus. Dans cette équation, η représente la viscosité dynamique du fluide, L la longueur du canal et r son rayon. Il est important de noter que la résistance dépend principalement du rayon du canal (qui présente un exposant 4). A pressions égales et à fluides et matériaux identiques, une division par 10 du rayon d'un tube conduit à une division par 10^4 du débit, soit une division par 10^2 de la vitesse du fluide.

Étant donné que nous travaillons ici avec des tuyaux de diamètre de l'ordre du millimètre, les pressions à employer pour mettre le train en mouvement sont assez faibles (de quelques dizaines de millibar). La manipulation des gouttes peut ainsi être aisément réalisée en connectant chacune des extrémités du tube à un réservoir d'huile, soumis à différentes pressions (Figure II-12).

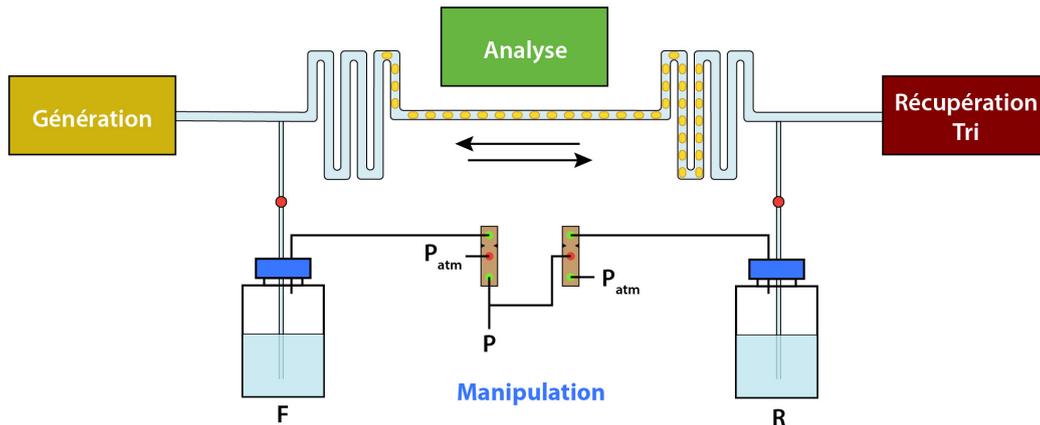


Figure II-12 : MDA - Schéma global (manipulation)

Manipulation - Chaque extrémité du tuyau baigne dans du fluide porteur contenu dans un réservoir (F pour « forward » ou R pour « reverse ») dont la pression est contrôlée. Une différence de pression appliquée entre les deux réservoirs conduit au mouvement du train. Cette différence de pression est ici établie en connectant l'un des réservoirs à la pression atmosphérique P_{atm} tandis que l'autre possède une pression supérieure de quelques dizaines de milliBar, P . Ce contrôle de pression peut ensuite être échangé par l'utilisation d'électrovannes (ou EV). Pour changer la direction du mouvement, il suffit d'échanger les pressions établies au sein des deux réacteurs.

Afin de procéder à l'analyse complète du train, il est nécessaire de lui imposer un mouvement de va-et-vient en face du module de d'analyse. Ce mouvement permet également de conserver les gouttes dans le tube et de s'assurer qu'elles ne finissent pas dans l'un des réservoirs. Pour voir le train changer de direction, il suffit d'échanger les pressions appliquées au sein des deux réservoirs. La résistance hydraulique étant faible, le système est très réactif, et le changement de direction est quasi immédiat.

La manipulation du train sous forme de va-et-vient semble donc, à priori, plutôt facile à mettre en œuvre. Il y a tout de même des critères importants à vérifier. Dans sa forme initiale, un train de goutte présente un arrangement linéaire, dans lequel chaque bioréacteur est indépendant et identifiable par sa position, et c'est ce qui fait la force de ce système. Il est donc impératif que les manipulations appliquées au train n'affectent pas ces propriétés.

II.2.C.1. Dynamique des fluides : Identification et indépendance des bioréacteurs

Lors du mouvement du train, nous souhaitons conserver l'indépendance de chaque goutte en s'assurant qu'elles ne viennent pas à coalescer, qu'elles ne mouillent pas les parois du tube ou qu'elles ne viennent à se fragmenter. Si l'indépendance est conservée, alors l'arrangement linéaire des gouttes dans le tube permet l'identification des bioréacteurs.

II.2.C.1.1. Mouillage

❖ Choix des matériaux :

Pour minimiser les interactions entre gouttes et parois du tube, ainsi que leur fragmentation, la première étape est de bien choisir les fluides ainsi que la nature des tubes utilisés. Jusqu'à présent nous n'avons parlé que de phase continue pour le fluide porteur (phase non aqueuse) et de phase discontinue pour les gouttes (phase aqueuse), sans s'attarder sur la nature des fluides ou des tubes employés, mais le

choix en est crucial. En microfluidique digitale, les huiles fluorocarbures sont généralement utilisées comme phase continue car elles permettent l'émulsification de phase hydrophile en limitant leur solubilité. De plus, elles favorisent la diffusion de l'oxygène, critère important lorsqu'on travaille avec des organismes vivants. C'est donc naturellement que le laboratoire s'est tourné vers l'utilisation d'une huile de ce type, en choisissant pour phase continue de l'huile fluorée FC40 (commercialisée par 3MTM). La phase aqueuse, destinée à être utilisée comme bioréacteur, est généralement du milieu de culture. En termes de propriétés mécaniques, cette phase peut néanmoins être assimilée à de l'eau. Enfin, pour minimiser les interactions entre goutte et parois du tube, il a été choisi d'utiliser un tube du même type que l'huile choisie, à savoir, fluoré (ex : PTFE, ETFE, PFA, FEP). En effet, si l'on veut supprimer le contact entre la phase aqueuse et les parois des tubes, ces dernières doivent être en permanence recouvertes par la phase continue, à savoir l'huile fluorée. Il faut donc que le matériau utilisé présente une plus grande affinité avec cette huile qu'avec l'eau, et c'est pourquoi le laboratoire s'est tourné vers le FEP (signifiant « Fluorinated Ethylene Propylene »). Il se trouve que le choix de la nature des tubes utilisés résulte d'un travail de recherche réalisé au sein du laboratoire avant ce travail de thèse, dans le but de trouver le tube minimisant au maximum les contaminations par mouillage ou fragmentation, tout en étant transparent, et résistant [54]. Le choix des matériaux est illustré par la Figure II-13.

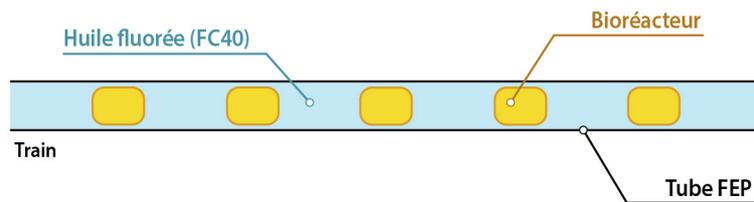


Figure II-13 : Choix des matériaux d'un train de gouttes

Schéma présentant le choix des matériaux dans l'instrument millifluidique. Les tubes employés sont en FEP, la phase continue est de l'huile fluorée FC40 et les bioréacteurs sont du milieu de culture de phase aqueuse.

❖ Film de lubrification

Maintenant le choix des matériaux effectué, il nous est possible de caractériser notre système à l'aide des nombres sans dimension couramment utilisés en mécanique des fluides (Équation II-3).

$$Re = \frac{\text{Forces inertielles}}{\text{Forces visqueuses}} = \frac{\rho v L_c}{\eta} \quad (1) \quad We = \frac{\text{Forces inertielles}}{\text{Forces de surface}} = \frac{\rho v^2 L_c}{\gamma} \quad (2)$$

$$Ca = \frac{We}{Re} = \frac{\text{Forces visqueuses}}{\text{Forces de surface}} = \frac{v \eta}{\gamma} \quad (3)$$

Équation II-3 : Nombres caractéristiques adimensionnels

L'écoulement d'un fluide dans un canal peut être facilement caractérisé par des nombres adimensionnels. (1) Le nombre de Reynolds Re permet d'évaluer le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses, et de déterminer la nature de l'écoulement (si $Re < 2300$ le régime est laminaire, $Re > 4000$ le régime est turbulent). (2) Le nombre de Weber We permet d'évaluer le rapport entre les forces inertielles et les forces de surface, et est couramment utilisé pour caractériser un écoulement multiphasique. (3) Le nombre capillaire Ca peut être obtenu du rapport de ces deux nombres. Il permet d'évaluer le rapport entre les forces visqueuses et les forces de surface. Dans cet ensemble d'équations, ρ représente la masse volumique du fluide porteur, η sa viscosité dynamique, γ la tension superficielle entre les deux fluides, v la vitesse et L_c la longueur caractéristique du système (généralement le diamètre pour un canal cylindrique).

	Microfluidique	Millifluidique	
$L_c = d$ (m)	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$2,15 \cdot 10^{-3}$
Re	$2,3 \cdot 10^{-3}$	$2,3 \cdot 10^{-1}$	4,2
We	$1,7 \cdot 10^{-8}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-3}$
Ca	$7,7 \cdot 10^{-6}$	$7,7 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-4}$

Tableau II-1 : Comparaison dynamique de fluides en micro et millifluidique

Dans le cas d'une émulsion de gouttes d'eau confinées dans un canal cylindrique de diamètre $d = 2r$ (r étant le rayon du canal), on considère la longueur caractéristique comme étant le diamètre du canal $L_c = d$. Pour les applications numériques on prendra donc $\rho = 1855 \text{ kg/m}^3$, $\eta = 4,1 \text{ mPa.s}$, $\gamma = 53.3 \text{ mN/m}$, $v = 2L_c \text{ m/s}$ et $d = 50 \text{ }\mu\text{m}$ pour un canal microfluidique, $d = 500\mu\text{m}$ (MDA) ou $d = 2,15 \text{ mm}$ (thèse) pour un canal millifluidique.

Le calcul de ces nombres caractéristiques dans les cas d'un canal microfluidique ($d = 50\mu\text{m}$) ou d'un tube millifluidique ($d = 500\mu\text{m}$ ou $d = 2,15 \text{ mm}$) nous permet de prouver que la dynamique des fluides à ces deux échelles est bien similaire (Tableau II-1). Dans les deux cas, nous sommes en présence d'un écoulement laminaire ($Re < 2300$), où forces inertielles et forces visqueuses sont dominées par les forces de surfaces ($We \ll 1$, $Ca \ll 1$), justifiant ainsi la stabilité des gouttes. En microfluidique, l'écoulement est dominé par les forces visqueuses plutôt que les forces inertielles ($Re \ll 1$) mais cet effet s'estompe en millifluidique, où forces inertielles et forces visqueuses sont du même ordre ($Re \sim 1$). Quoi qu'il en soit, dans ces conditions, et tant que les gouttes sont en mouvement, il a été montré qu'un film de lubrification de phase continue se forme entre les gouttes et la paroi du tube et assure leur indépendance [64] (Figure II-14).

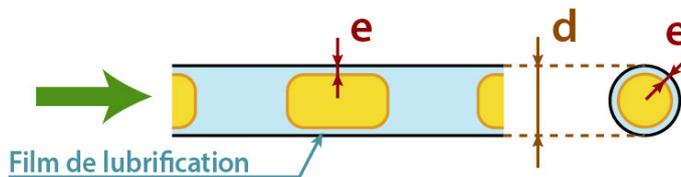


Figure II-14 : Film de lubrification d'huile

Mise en évidence du film de lubrification dans notre système. Tant que le train reste en mouvement, un film de lubrification de phase continue d'épaisseur e est maintenu entre le tube (de diamètre d) et les bioréacteurs (de phase aqueuse).

L'épaisseur de ce film de lubrification e est déterminé par la compétition entre forces visqueuses et pression capillaire de la goutte, et dépend donc du nombre capillaire selon Équation II-4.

$$e \propto Ca_d^{\frac{2}{3}} \times d$$

Équation II-4 : Épaisseur du film de lubrification

L'épaisseur du film de lubrification e dépend du nombre capillaire calculé pour une goutte (la phase dispersée) Ca_d , et du diamètre d du tube selon l'équation ci-dessus, tant que la condition $Ca_d < 0,01$ est vérifiée. En prenant $\gamma = 53.3 \text{ mN/m}$, $v = 2L_c \text{ m/s}$ et $\eta_d = 1 \text{ mPa.s}$, on a $Ca_d = 8,1 \cdot 10^{-5} < 0,01$. La condition est bien respectée dans notre système, donc l'équation applicable et on peut estimer l'épaisseur du film de lubrification $e \approx 3\mu\text{m}$ (avec $d = 2,15 \text{ mm}$). A partir de cette épaisseur peut être calculé le ratio ε de l'épaisseur du film de lubrification sur le rayon r du tube, qui est ici d'environ 3% ($\varepsilon = \frac{e}{r}$) [64].

❖ Effet de la gravité

Un autre facteur à considérer dans le mouillage à l'échelle millifluidique est la gravité. Le nombre de Bond Bo permet d'évaluer le rapport entre forces gravitationnelles et forces de surfaces (Équation II-5).

$$Bo = \frac{\text{Forces gravitationnelles}}{\text{Forces de surface}} = \frac{\Delta\rho g L_c^2}{\gamma} = \left(\frac{L_c}{l_{cap}}\right)^2 \quad \text{où} \quad l_{cap} = \sqrt{\frac{\gamma}{\Delta\rho g}}$$

Équation II-5 : Nombre de Bond et longueur capillaire

Le nombre de Bond Bo permet d'évaluer le rapport entre forces gravitationnelles et forces de surfaces appliquées sur un fluide. Ce nombre met en jeu la longueur capillaire l_{cap} , qui caractérise le rapport entre tension superficielle et pesanteur exercées sur une interface. Dans ces équations, $\Delta\rho$ représente la différence des masses volumiques des phases continues et dispersées, g la gravité, γ la tension superficielle entre les deux fluides et L_c la longueur caractéristique, ici $L_c = d = 2r$ (où d est le diamètre du canal, r son rayon).

	Microfluidique	Millifluidique	
$L_c = d$ (m)	$5,0 \cdot 10^{-5}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	$2,15 \cdot 10^{-3}$
Bo	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-2}$	$7,3 \cdot 10^{-1}$
l_{cap} (m)		$2,3 \cdot 10^{-3}$	

Tableau II-2 : Comparaison de l'effet de la gravité en micro et millifluidique

Dans le cas d'une émulsion de gouttes d'eau confinées dans un canal cylindrique de diamètre $d = 2r$, on a $\Delta\rho = 1855-997 = 858 \text{ kg/m}^3$, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$, $\gamma = 53.3 \text{ mN/m}$, et $L_c = d$, où nous prenons $d = 50 \text{ }\mu\text{m}$ pour un canal microfluidique et $d = 500 \text{ }\mu\text{m}$ (MDA) ou $d = 2,15 \text{ mm}$ (thèse) pour un canal millifluidique. On peut ainsi calculer la longueur capillaire, $l_{cap} = 2,3 \text{ mm}$.

En comparant la valeur du nombre de Bond (Tableau II-2) pour un canal microfluidique ($Bo \ll 1$) et un canal millifluidique ($Bo < 1$ mais $Bo \sim 1$), on voit que l'effet de la gravité, bien que n'entrant pas en ligne de compte en microfluidique, commence à se faire sentir en millifluidique. L'effet de la gravité augmente à mesure que la dimension caractéristique L_c se rapproche de la longueur capillaire l_{cap} .

En millifluidique, le film de lubrification est maintenu par les forces de surfaces tant que le train est en mouvement [64][65], mais l'effet de la gravité se fera ressentir sur les gouttes si elles sont arrêtées. Une immobilité prolongée conduira à la disparition du film d'huile, synonyme de mouillage par création d'une interface goutte/tube. Le mouvement perpétuel des bioréacteurs, nécessaire pour l'analyse, se révèle donc être impératif pour éviter le mouillage et assurer l'indépendance.

II.2.C.1.2. Mélange au sein des réacteurs

En plus d'être bénéfique contre le mouillage, le mouvement continu du train s'avère aussi favoriser le mélange à l'intérieur des bioréacteurs (Figure II-15).

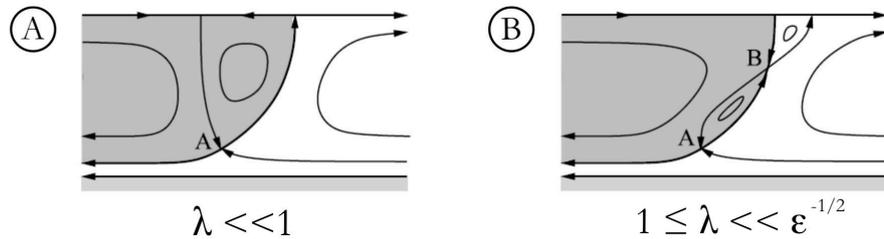


Figure II-15 : Mélange au sein du système fluide

Ces deux schémas montrent les lignes de courant approximatives au sein de notre système pour (A) des gouttes non visqueuses, $\lambda \ll 1$ (ex : bulle d'air) et (B) des gouttes visqueuses, $1 \leq \lambda \ll \varepsilon^{-1/2} \propto Ca_d^{-1/3}$ [66]. λ représente le ratio des viscosités dynamiques, soit $\lambda = \eta_d / \eta_c$, où η_d est la viscosité de la phase dispersée et η_c la viscosité de la phase continue. Dans notre système, pour une goutte d'eau dans du FC40 on a donc $\lambda = 1.10^{-3} / 4,1.10^{-3} = 0.24$, soit $\lambda < 1$ mais $\lambda \sim 1$. Les lignes de courant sont donc dans un état intermédiaire entre les schémas (A) et (B).

Lors de la culture de microorganismes, le mélange est important. Il permet de maintenir des conditions homogènes dans chacun des compartiments en évitant la sédimentation, et en permettant à tous les organismes d'accéder aux nutriments en présence. Ce mélange est induit par la différence de vitesse, et de viscosité, entre la goutte et la phase continue [64], [66]. En effet, la présence du film de lubrification implique une vitesse des gouttes supérieure à celle du fluide porteur. Il en résulte une évolution non linéaire de la pression le long du canal, qui est qualitativement représentée par la Figure II-16.

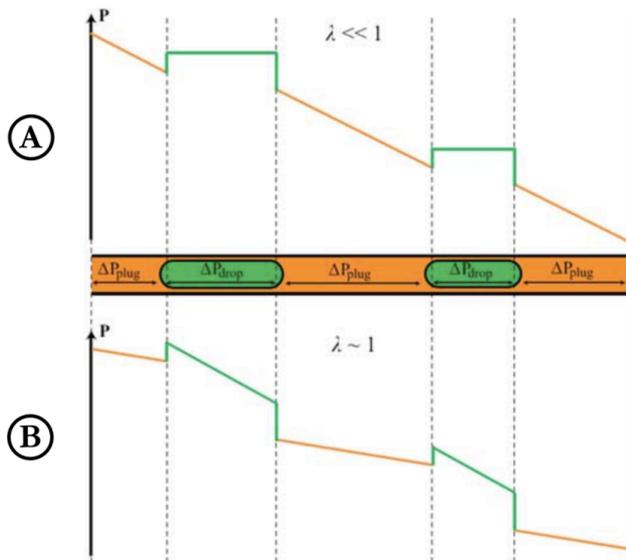


Figure II-16 : Évolution qualitative de la pression

Ce schéma fournit une représentation qualitative de l'évolution de la pression le long d'un canal contenant des gouttes de phase dispersée dans un fluide porteur [64], (A) dans le cas de gouttes non visqueuses, $\lambda \ll 1$ (ex : bulle d'air), et (B) de gouttes peu visqueuses. Dans notre cas, nous avons $\lambda = 0.24$, soit une situation intermédiaire, mais proche de la représentation (B).

II.2.C.1.3. Coalescence et structuration d'un train de gouttes

La manipulation continue d'un train de goutte soulève cependant un nouveau problème : la coalescence. En effet, même si les distances initiales entre toutes les gouttes sont les mêmes, une circulation prolongée conduira à des variations dans ces distances, pouvant aboutir à la fusion de deux réacteurs : leur coalescence. Ce phénomène s'explique par le fait que des échanges d'huile ont lieu entre les différentes poches et conduisent les gouttes à se rapprocher (ou à s'éloigner) (Figure II-17).

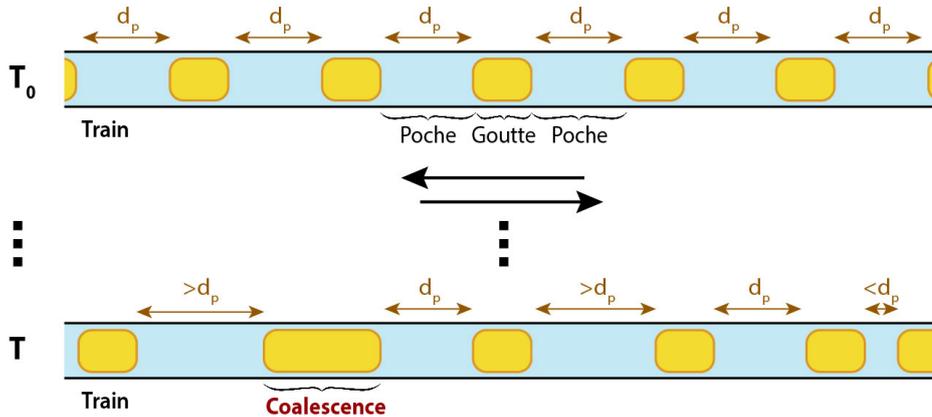


Figure II-17 : Échanges d'huile entre poches et coalescence

Lors du mouvement d'un train, les distances des poches d'huile présentes entre les gouttes ont tendance à fluctuer au cours du temps en raison d'une dynamique des fluides non linéaire. Bien qu'initialement toutes les distances soient égales ($d=d_p$), après un certain temps, elles ne seront plus conservées sur l'ensemble du train. Certaines gouttes se seront éloignées ($d > d_p$) tandis que d'autres se seront rapprochées ($d < d_p$), parfois même jusqu'à leur mise en contact : leur coalescence.

Ces variations de volumes des poches d'huile s'expliquent par plusieurs phénomènes. D'abord, la vitesse des gouttes étant plus grande que celle de l'huile, et toutes les gouttes n'étant pas strictement de la même taille, de légères variations de vitesse peuvent être observées sur l'ensemble du train. De plus, et comme nous l'avons vu précédemment, l'effet de la gravité commence à être ressenti à l'échelle millifluidique. Le système fluidique n'étant pas parfaitement à la même hauteur sur l'ensemble du dispositif, la différence de densité volumique entre huile et eau conduit à des fluctuations de vitesses locales. En effet, la densité volumique de l'huile étant supérieure à celle de l'eau ($\rho_{FC40} = 1855 \text{ kg/m}^3 > \rho_{\text{eau}} = 997 \text{ kg/m}^3$), en cas de non-horizontalité les gouttes auront tendance à migrer vers les points les plus hauts (phénomène expliqué par la poussée d'Archimède), créant ainsi des flux d'huiles entre gouttes. Même si ces variations sont d'un ordre négligeable sur le court terme, lors d'une manipulation prolongée (de plusieurs heures) le phénomène de coalescence est automatiquement rencontré. Or, il est impératif de s'affranchir de ce problème afin qu'il ne limite pas le temps d'incubation de nos microorganismes.

En microfluidique, des tensioactifs sont souvent utilisés pour palier à ce problème, mais à cette échelle, l'utilisation de tensioactifs ne suffit pas pour éviter la coalescence [62]. La stratégie adoptée pour conserver un espacement entre les bioréacteurs, et ainsi maintenir leur indépendance, a donc été d'ajouter, entre chacun d'eux, une phase séparatrice. Pour que cette astuce fonctionne, cette troisième phase doit être immiscible vis à vis des phases, continue et aqueuse, déjà utilisées. Il a ainsi d'abord été utilisé une phase liquide, de l'huile minérale (M5904 Sigma-Aldrich®)[57], [62], [63]. L'utilisation de cette huile est avantageuse dans le sens où, en plus d'être immiscible avec les deux autres phases, c'est un fluide incompressible et son utilisation n'affecte donc pas la dynamique des fluides et la réactivité du

train. Cependant, il s'est avéré que cette huile ne pouvait être utilisée qu'en présence d'un tensioactif. La tension superficielle entre l'huile minérale et l'huile fluorée étant très faible (4 mN.m^{-1}), et celle entre eau et huile minérale (25 mN.m^{-1}) étant plus faible que celle entre eau et huile fluorée (44 mN.m^{-1}), on assiste généralement à une double encapsulation : eau dans huile minérale dans huile fluorée. Pour favoriser l'interface huile fluorée-eau plutôt que huile minérale-eau, il est donc nécessaire d'utiliser un tensioactif diminuant l'énergie de surface entre phase continue et bioréacteurs [57], [62], [63].

Bien que les premiers instruments aient fonctionné avec ce genre de séparateurs (huile minérale + tensioactif), ils ont ensuite été remplacés par des bulles d'air. En effet, l'utilisation de tensioactif n'est pas favorable dans un tel système. D'une part pour des raisons pratiques (coût, recyclage des fluides), ainsi que pour des raisons de contamination (par contact entre gouttes et séparateurs). D'autre part car elle réduit les possibilités de manipulation des bioréacteurs : injection de composés [67], transfert d'un échantillon des bioréacteurs, qui sont nécessaires dans une technologie d'évolution comme nous l'avons vu dans le modèle expérimental (nous reviendrons sur cet aspect au Chapitre III). L'utilisation de bulles d'air comme séparateur (Figure II-18) a ainsi permis de résoudre les problèmes liés à l'utilisation de tensioactifs, ainsi que de fournir une source d'oxygène supplémentaire aux microorganismes.

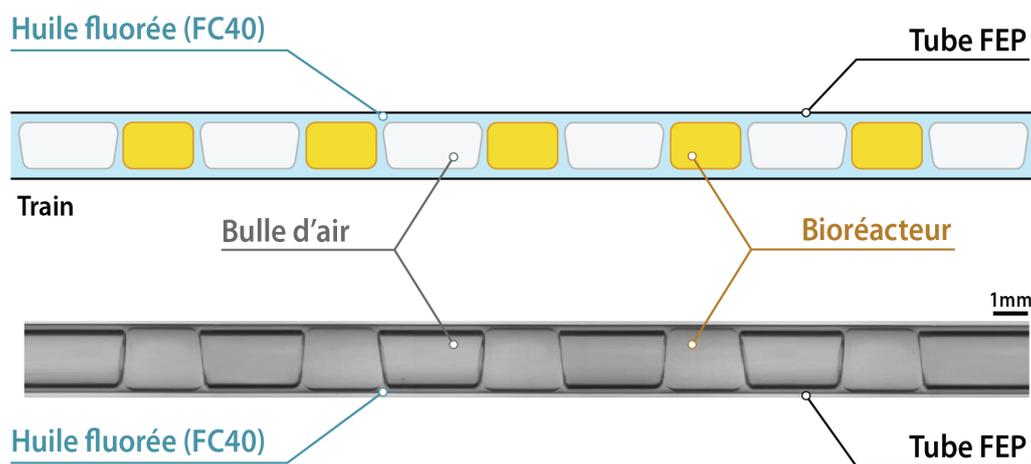


Figure II-18 : Structure d'un train de gouttes

Un train de goutte correspond à une succession de gouttes de phase aqueuse (servant en tant que bioréacteur) séparées par des bulles d'air, le tout entouré par un fluide porteur (de l'huile fluorée FC40), et contenu dans un tube en FEP.

En revanche l'utilisation de l'air, très soluble dans l'huile fluorée et compressible, a conduit à de nouvelles limitations à prendre en considération. Le premier problème rencontré avec l'utilisation de bulles d'air comme séparateurs est que leur taille n'est pas constante au cours du temps. La taille des séparateurs va peu à peu diminuer, à cause de la respiration microbienne, mais aussi de la solubilisation de l'air dans l'huile fluorée, favorisées par la pressurisation. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser des séparateurs de taille suffisante pour que, sur la durée d'une expérience (pouvant être de 48h), ils ne viennent pas à disparaître. Or l'air étant compressible, il affecte la dynamique d'un train et réduit sa réactivité face aux changements de pression. Une augmentation du volume d'air conduit à une réduction d'autant plus grande de la réactivité du train. Dans l'instrument d'analyse, une forte réactivité du train n'est pas recherchée et c'est pourquoi l'air représente, dans ce dispositif, la meilleure solution [54], [59]. Nous verrons cependant dans le prochain chapitre (Chapitre III) que ces limitations ont resurgi lors du développement de la machine d'évolution, et que des solutions technologiques ont dû être développées au cours de ma thèse pour y remédier.

Mais, avant d'en venir à la technologie d'évolution, de nombreux concepts de base de la microfluidique restent à définir. L'étude de la dynamique des fluides au sein du dispositif microfluidique nous a permis de justifier le choix des matériaux et de la structure des trains employés au cours de cette thèse. Elle nous a aussi permis de montrer que le mouvement des trains limite les contaminations, favorise le mélange, et permet une incubation « propre », où tous les réacteurs restent indépendants et identifiables au cours du temps. La manipulation des trains s'avère donc cruciale dans cet instrument, mais, pour pouvoir les manipuler, il faut d'abord les former. La structure des trains étant à présent établie, nous souhaitons voir comment ils peuvent être générés.

II.2.C.2. Génération d'un train

Jusqu'à présent, nous avons évoqué la structure d'un train et sa dynamique, mais nous ne sommes pas intéressés à sa formation. Les gouttes étant massivement utilisées en microfluidique, leur génération a été largement étudiée au cours de ces dernières années, et elle s'en retrouve très bien documentée [56], [64], [68]. Leur formation peut être simplement réalisée en poussant la phase continue et la phase dispersée au travers de géométries particulières, permettant l'émulsification à haut débit. En microfluidique, trois types de géométries existent : la jonction en T (« T-jonction »), la focalisation de flux (« Flow-focusing ») et le flux coaxial (« co-flow ») (Figure II-19). Ces trois méthodes peuvent être applicables en microfluidique et ont été utilisées par le passé dans le MDA [57]–[63].

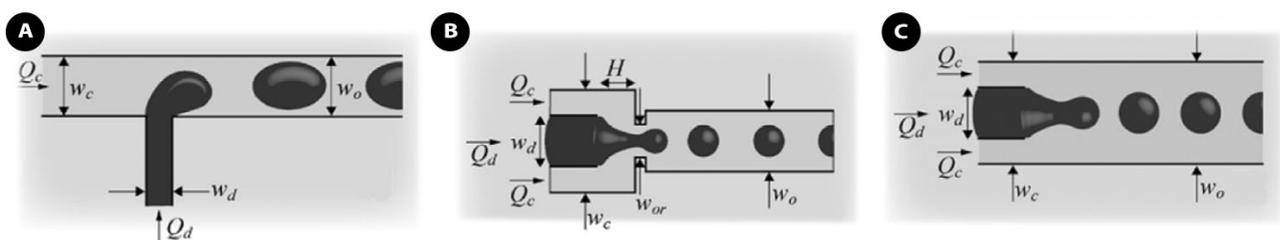


Figure II-19 : Géométries de génération de gouttes en microfluidique

Ce schéma présente les trois géométries permettant de générer des gouttes en microfluidique. Pour cela, les trois jonctions mettent en compétition forces de cisaillement et tension de surface. (A) Dans la jonction en T, la phase dispersée (noire) va être cisailée verticalement par la phase continue (gris clair). (B) Dans la focalisation de flux, la phase dispersée est « pincée » verticalement (dans les deux directions) par la phase continue. (C) Dans le flux coaxial, le cisaillement par la phase continue a lieu orthogonalement tout autour du flux de phase dispersée [68].

Ici, nous ne souhaitons pas nous attarder sur ces méthodes, car elles ne sont aujourd'hui plus utilisées dans l'instrument d'analyse. Nous reviendrons sur la jonction en T dans le Chapitre III, quand nous aborderons la technologie d'évolution. En effet, bien que ces méthodes soient très efficaces pour générer des gouttes monodisperses, elles ne permettent pas de créer une très grande diversité inter-gouttes. Des variations dans leur contenu peuvent être induites grâce à l'emploi de gradients, mais le niveau de variabilité entre les gouttes reste limité. Il n'est par exemple pas possible de choisir de manière indépendante le contenu de chaque goutte générée. Or, le but de cet instrument étant de pouvoir phénotyper un millier de populations bactériennes en même temps, et à terme de diriger leur évolution, il est nécessaire de pouvoir avoir accès à ce niveau de contrôle. N'oublions pas que la gestion de la pression de sélection naturelle repose sur le contrôle du contenu des gouttes. Ainsi, une méthode de génération de goutte différente est employée. Au lieu de procéder par poussage des fluides au travers d'une géométrie particulière, cette méthode vise à créer les bioréacteurs par aspiration à partir d'un

ensemble d'échantillons contenus dans une plaque 96-puits (Figure II-20). Ainsi, la diversité présente sur plaque peut être transférée en gouttes.

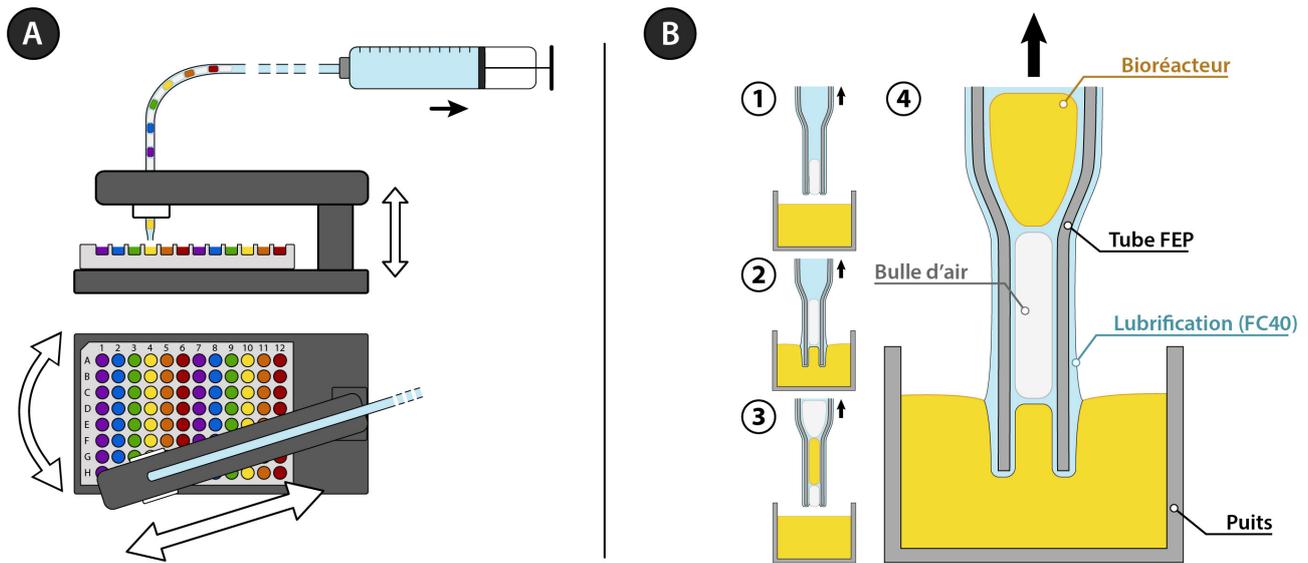


Figure II-20 : Génération par aspiration sur plaque à puits – Sipper

(A) Module de génération dans son ensemble, appelé « sipper » (bas : vue de dessus, haut du de face). Un bras robotisé (Cetoni® rotAXYS360) permet de contrôler le mouvement de l'extrémité du tube qui y est attachée (ou « tête d'aspiration ») dans les directions x, y et z. Dans le même temps, une succion continue est appliquée à l'autre extrémité du tube par un pousse seringue (en aspiration). La génération est alors assurée par le mouvement que le bras robotisé va effectuer. Le contrôle du bras est réalisé par un programme informatique, établi pour effectuer le passage d'un puits à un autre avec des vitesses et des temps de pauses contrôlés, et calibrés pour générer la structure de train souhaité. (B) Détail de la génération au niveau de la tête d'aspiration. Comme nous pouvons le voir sur l'ensemble des schémas, la tête d'aspiration est constamment lubrifiée par la phase continue (FC40). Le tube est initialement rempli d'huile fluorée. 1- La tête d'aspiration est ensuite placée au-dessus du premier puits (mouvement x, y) et commence par aspirer de l'air, générant ainsi le premier séparateur. 2- Elle est ensuite plongée dans le puits (mouvement en z) et permet la génération de la première goutte. 3- Puis elle est retirée du puits (z) et déplacée au-dessus du nouveau puits (x, y), générant dans le même temps le second séparateur d'air. 4- Enfin, la tête est à nouveau plongée dans le puits qu'elle surplombe (z) pour permettre la génération d'une nouvelle goutte. Cette séquence est conduite en boucle afin de générer un train complet. Il est à noter que l'extrémité du tuyau utilisée pour la génération est étirée et présente un diamètre plus fin que ce dernier. Cette géométrie permet un meilleur contrôle du volume ponctionné. Des photos de ce module sont disponibles en annexe (Annexe I).

Afin de procéder à la succion, un pousse seringue est connecté à l'une des extrémités du tuyau et aspire le fluide tandis que l'autre extrémité, permettant la génération du train, est déplacée de puits en puits à l'aide d'un bras robotisé (Figure II-20, A). Par ce mécanisme, on assure la génération des bioréacteurs, et des séparateurs, les bulles d'air, qui sont générées entre chaque puits. Cependant il est aussi nécessaire de lubrifier le tout avec la phase continue, l'huile fluorée. Pour cela, un apport continu d'huile est réalisé sur l'extrémité du tube utilisée pour la génération. Cette huile, possédant une très grande affinité avec le tube, va couler le long des parois jusqu'à l'extrémité du tuyau, où elle va alors être aspirée, et permettre la lubrification interne (Figure II-20, B). Ce système permet ainsi la génération d'un train à la structure présentée précédemment, à savoir : une succession de bioréacteurs, séparés par des bulles d'air, le tout porté par de l'huile fluorée. Avant et après la génération du train, l'extrémité du tube est plongée dans de l'huile fluorée afin de remplir le tuyau de la phase continue (et non d'air). Une fois l'étape de génération terminée, la seringue maintient son aspiration afin d'amener le train dans le circuit principal. Il passe au travers d'une vanne qui, après son passage, est fermée pour isoler le circuit principal du module de génération. Les pressions prennent alors le relais pour la manipulation du train (Figure II-21).

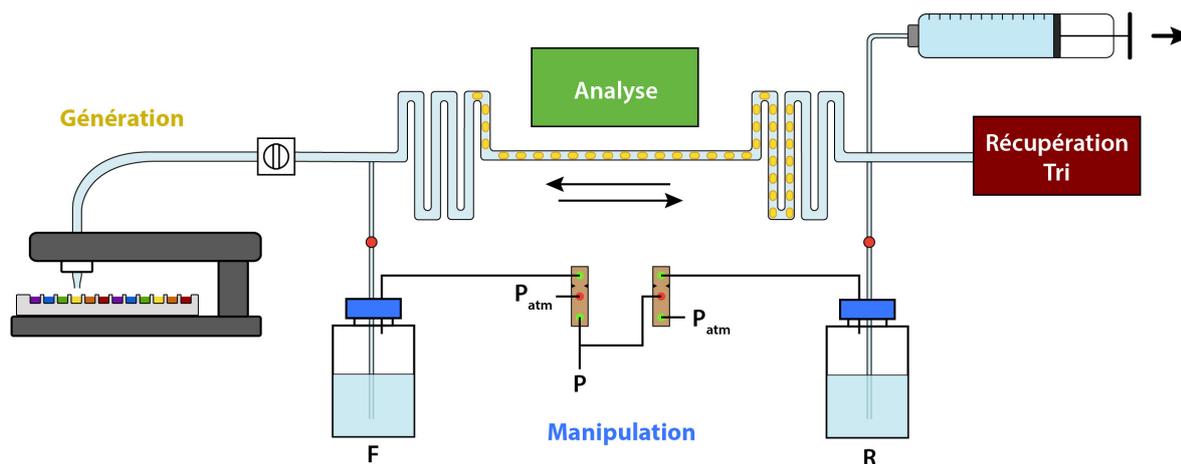


Figure II-21 : MDA - Schéma global (manipulation, génération)

Implémenté du module de génération (le sipper), le MDA possède désormais la possibilité de générer un millier de gouttes, puis de les manipuler afin de réaliser leur incubation.

La diversité fournie par cette méthode de génération correspond à la diversité contenue dans la plaque à puits utilisée. Dans le MDA, des plaques 96-puits sont utilisées, et il est donc possible de générer 96 conditions différentes. Or, le nombre de compartiments manipulables dans l'instrument d'analyse est dix fois plus élevé. Afin de générer un millier de gouttes il est donc nécessaire de ponctionner 10 gouttes par puits (soit 960 gouttes). Ceci peut être intéressant dans le cas où l'on souhaite avoir de nombreux réplicas, mais réduit considérablement la diversité manipulable, et donc les capacités de l'instrument. De plus, les puits des plaques 96-puits ayant une capacité de 200 μ L, ceci est réalisable avec des gouttes de 100nL et non plus avec des gouttes 20 μ L, où le volume deviendrait limitant. Ainsi, et toujours dans l'optique d'utiliser cette base technologique pour développer une machine d'évolution, les recherches conduites depuis 2015 ont visé à augmenter cette diversité inter-gouttes générable à l'entrée de l'instrument [54]. La solution pour augmenter la diversité à la génération des bioréacteurs est d'augmenter le nombre de conditions possibles, soit le nombre de puits. Ceci peut être réalisé en générant un train à partir de plusieurs plaques 96-puits, ce qui demande des ajustements technologiques (dont le changement de bras robotisé), ou en utilisant une plaque possédant un plus grand nombre de puits (plaque 384-puits, de volume 100 μ L/puits). Le laboratoire s'est ainsi tourné vers des plaques 384-puits, car elles présentent plusieurs avantages face aux plaques 96-puits. Premièrement, il été montré que la ponction d'un faible nombre de gouttes par puits (1goutte/puits étant l'optimum) permet une génération plus précise et plus reproductible. Il n'est donc plus nécessaire de posséder un grand volume dans les puits, et le volume de 100 μ L fourni par les plaques 384-puits est suffisant. Ces puits, de plus petite taille, fournissent aussi une nouvelle solution de lubrification des tubes. Au lieu de réaliser la lubrification par un débit constant d'huile à l'extérieur de la tête d'aspiration, une couche d'huile peut tout simplement être déposée à la surface de la phase aqueuse, au sein des puits (Figure II-22).

Bien que l'huile soit plus dense que l'eau ($\rho_{FC40} = 1855 \text{ kg/m}^3 > \rho_{\text{eau}} = 997 \text{ kg/m}^3$), elle reste ici à la surface de cette dernière car les forces de surfaces sont plus fortes que les forces de gravitationnelles (ce qui n'était pas le cas avec des puits de plaque 96-puits). Cette méthode de lubrification s'est révélée être source de moins de contaminations (à la génération) que lors de l'utilisation du film externe, et permet également un meilleur contrôle de la compaction du train formé [54]. En effet, avec la lubrification externe, le train généré reste compact, et ce quel que soit le débit imposé. En revanche, la lubrification de surface permet de jouer sur la compaction du train en ajustant la quantité d'huile aspirée, via l'épaisseur du film d'huile employé.

Cette méthode de génération, avec plaque 384-puits et film de surface, a permis d'augmenter la diversité générable dans l'instrument millifluidique, d'optimiser le procédé de génération du train, et d'obtenir un meilleur contrôle de sa structure. Actuellement, elle reste la méthode employée au sein du laboratoire pour introduire des échantillons biologiques dans un instrument millifluidique. C'est donc celle que nous avons employée tout au long de cette thèse pour charger des populations bactériennes dans la technologie d'évolution (nous verrons par la suite, III.2.B, qu'elle n'est en fait pas la seule méthode de génération mise en œuvre dans la technologie d'évolution).

Génération et manipulation sont au cœur de la technologie millifluidique, et sans elles, la culture et l'analyse de populations microbiennes seraient impossibles. Nous avons vu en quoi les gouttes favorisent culture et diversification, et nous souhaitons à présent montrer comment elles permettent l'analyse.

II.2.D. Les gouttes : bioréacteur pour l'analyse de communautés de microorganismes

Comme nous l'avons mentionné au début de ce sous chapitre, le but de l'instrument millifluidique, le MDA, est d'analyser un grand nombre de populations ou communautés de microorganismes de manière dynamique et parallélisée. Nous venons de voir comment cette technologie permet la génération de milliers de gouttes contenant une diversité de microorganismes, leur manipulation et leur croissance. La manipulation des bioréacteurs s'est avérée présenter de nombreux avantages dans l'incubation des microorganismes : contamination limitée, mélange favorisé, indépendance et identification des réacteurs assurées. Cependant, il ne faut pas oublier qu'un des enjeux cruciaux de cette manipulation est l'analyse. Le mouvement de va-et-vient imposé au train devant le module d'analyse est employé pour permettre la mesure de facteurs biologiques dans nos réacteurs (ex : croissance). Les tubes utilisés étant transparents, les mesures reposent sur des méthodes optiques. Dans le MDA, le suivi de l'activité biologique se fait par fluorescence et nous nous consacrerons donc, dans ce paragraphe, à présenter cette méthode de mesure.

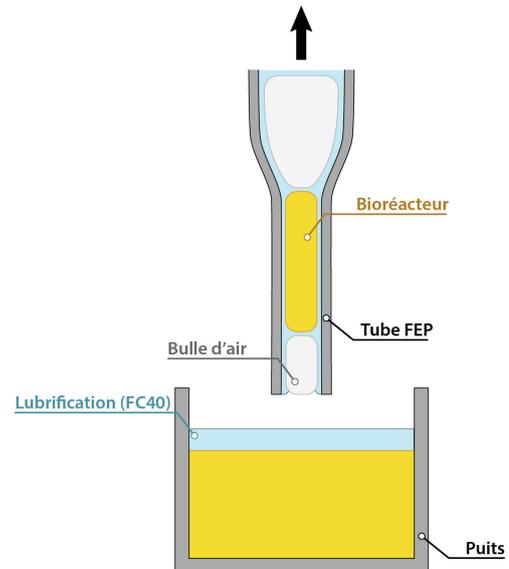


Figure II-22 : Lubrification de surface
La lubrification de surface consiste à déposer un film de phase continue (FC40) à la surface de la phase dispersée (milieu de culture), comme représenté sur ce schéma.

II.2.D.1. Mesure de fluorescence

La mesure de fluorescence est efficace en présence de souches fluorescentes, ou de marqueurs biologiques, et a fait ses preuves lors des travaux passés [54], [57]–[63]. Dans le cadre de ma thèse, elle a aussi été employée, notamment pour caractériser la machine d'évolution (nous y reviendrons au Chapitre IV). Nous souhaitons présenter ici le module que nous avons spécifiquement conçu et développé au cours de cette thèse (Figure II-24) permettant de mesurer la GFP (Figure II-23).

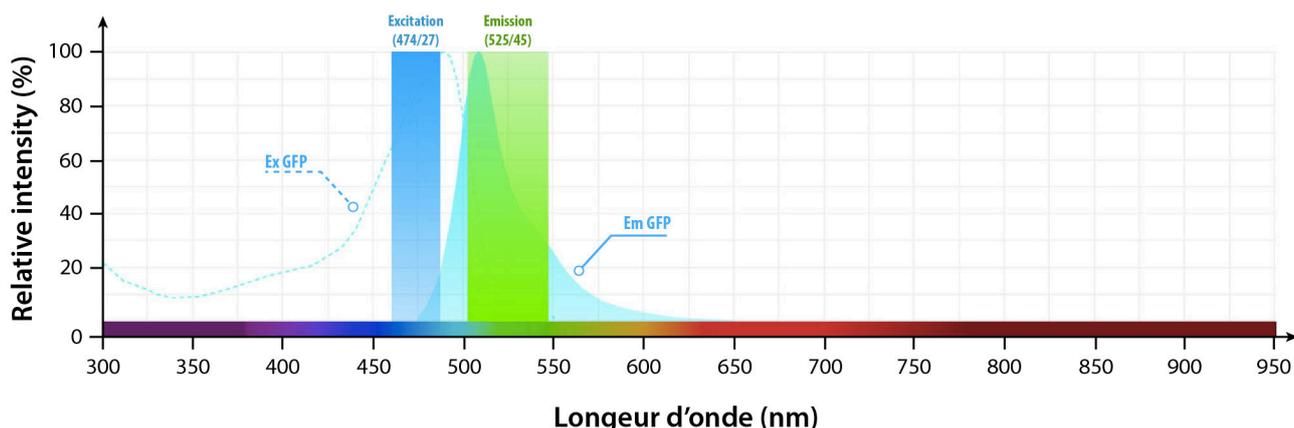


Figure II-23 : Spectre de fluorescence GFP

La fluorescence a lieu suite à l'excitation d'une molécule qui absorbe l'énergie issue de la lumière (à une certaine longueur d'onde) et résulte en la réémission de la lumière à une autre longueur d'onde. Lorsque l'on travaille en fluorescence, on parle alors de longueur d'onde d'excitation, et d'émission. Dans le cadre de nos travaux, nous avons travaillé avec de la GFP (« Green Fluorescent Protein»), une protéine fluorescente possédant son pic d'excitation à 488nm et d'émission à 510nm (spectre donné par les courbes cyan en pointillée « Ex GFP », et cyan pleine « Em GFP »). Les bandes passantes bleues et vertes représentent ainsi les filtres d'excitation et d'émission que nous avons utilisés dans notre module optique, comme indiqué ci-après Figure II-24 (spectre généré à partir de [69], puis annoté).

La GFP a un pic d'excitation à 488nm et un pic d'émission à 510nm. Le bloc optique développé et utilisé au cours de ma thèse (Figure II-24) est constitué d'une partie visant à l'excitation (envoi du signal), et d'une autre à l'émission (réception du signal). Afin d'effectuer l'excitation, une diode électroluminescente (LED) dont le pic d'excitation est à 470nm est employée (Thorlab® M470L3). Pour réduire la bande d'excitation, un filtre centré en 474nm et de largeur 27nm est utilisé (Semrock® FF01-474/27-25). Ensuite, le faisceau est coupé à 495nm par un miroir dichroïque (Semrock® FF495-Di03-25x36) : les longueurs d'ondes inférieures sont réfléchies alors que celles supérieures sont transmises. Le faisceau d'excitation est ainsi transmis à l'objectif optique (Leica® N plan L, 20x/0.4, distance de travail 10.8mm), qui le focalise au centre du tuyau. L'excitation du fluorophore a alors lieu, et une partie de la lumière émise est renvoyée dans

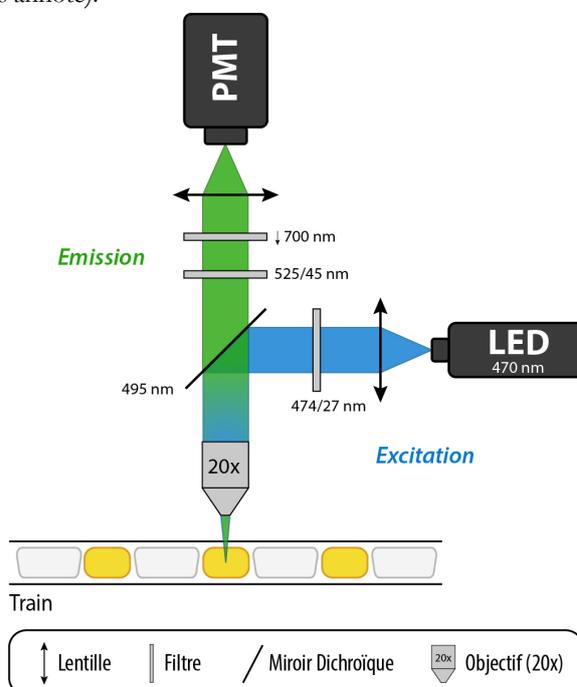


Figure II-24 : Module de fluorescence

Schématisme du module optique développé et utilisé au cours de ma thèse pour permettre la mesure de fluorescence (GFP) dans les gouttes.

et une partie de la lumière émise est renvoyée dans

l'objectif. Les longueurs d'ondes supérieures à 495nm sont alors transmises par le miroir dichroïque et filtrées autour de 525nm (Semrock® FF01-525/45-25) jusqu'au photomultiplicateur (PMT, Hamamatsu H10722-01), pour acquisition du signal sur l'ordinateur (à l'aide d'une carte d'acquisition). Nous pouvons voir qu'un filtre passe-bas coupant à 700nm (Thorlab® FESH0700) est aussi employé dans le chemin optique. Ce filtre additionnel a pour but couper les infrarouges, qui ont été mis à profit dans ma thèse pour imager le tube à l'aide d'une caméra infrarouge (nous reviendrons sur cet aspect en III.2.C.1).

II.2.D.2. Acquisition du signal de fluorescence et détection des gouttes

Le signal de fluorescence récupéré sur l'ordinateur est traité et enregistré en temps réel par un programme informatique. Afin d'affecter la bonne mesure de fluorescence à la bonne goutte, il est nécessaire de pouvoir identifier les gouttes, c'est ce que l'on appelle : la détection. Dans le MDA, la détection des gouttes est effectuée grâce au signal de fluorescence, car toutes les gouttes possèdent un niveau minimum de fluorescence qui n'est pas nul. Soit le milieu de culture est auto-fluorescent (ex : Lisogeny Broth ou LB), soit un agent chimique fluorescent (ex : de la fluorescéine, F-6377 Sigma-Aldrich®) est employé pour donner un niveau de fluorescence à toutes les gouttes. Un niveau seuil est donc établi et permet de détecter toutes les gouttes (Figure II-25).

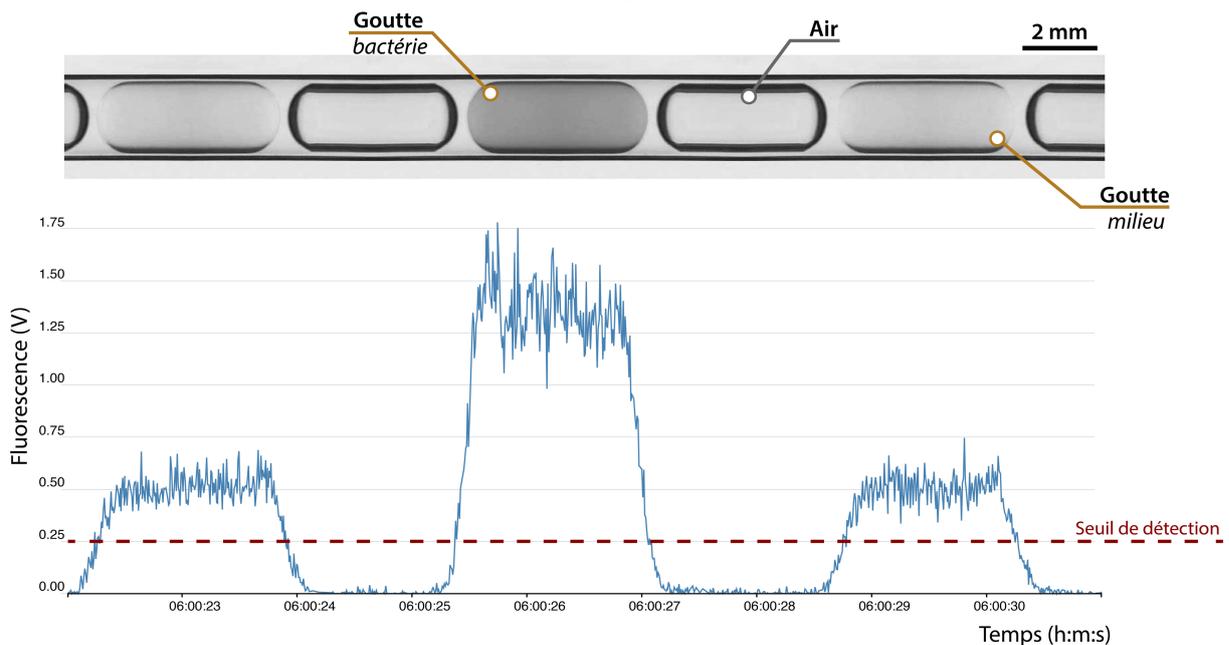


Figure II-25 : Acquisition du signal de fluorescence et détection des gouttes lors d'un run

Ce schéma représente le signal acquis par le PMT et reçu sur l'ordinateur ($f = 125\text{Hz}$) lors du passage de gouttes devant le module de fluorescence. La photo du train de goutte (haut) permet au lecteur d'établir la correspondance entre gouttes et signal de fluorescence (bas). On peut voir que le signal mesuré augmente lors du passage des gouttes, qui sont plus ou moins fluorescentes (ici, les gouttes aux extrémités ne contiennent que du milieu de culture tandis que celle au centre possède des bactéries fluorescentes). Ainsi, toutes les gouttes présentant un niveau minimum de fluorescence, il est possible de les détecter en regardant quand le signal de fluorescence est supérieur au seuil fixé.

L'indépendance et l'ordre des bioréacteurs étant maintenu par la structure du train, leur traçabilité au cours du temps est simple. Il suffit de numérotter (fictivement) chacune des gouttes, et de suivre le compte présent devant le détecteur en fonction de la direction du train pour savoir quelle est la goutte qui est actuellement en train d'être analysée (Figure II-26).

Le programme informatique compte ainsi en direct le nombre de gouttes passant devant le détecteur en analysant le signal de fluorescence (comme décrit en Figure II-25). Ce compte lui permet de déterminer si l'ensemble du train est passé devant le détecteur ou si des gouttes doivent encore être analysées. Lorsque l'ensemble du train est passé, le programme ordonne le changement de direction du train, et procède automatiquement aux changements de pressions via l'ouverture des électrovalves requises. A chaque passage devant le détecteur (nommé « run ») toutes les 10-15min (temps d'un aller), le signal de fluorescence est donc mesuré et enregistré pour l'ensemble des gouttes du train (Figure II-27).

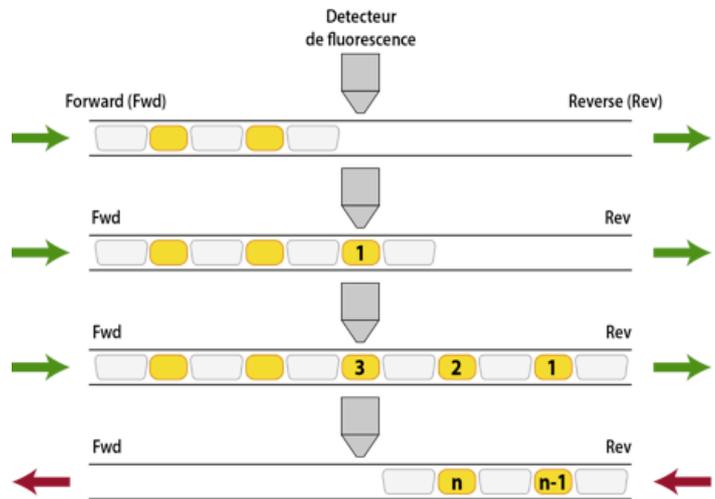


Figure II-26 : Détection et numérotation des gouttes

Lorsque toutes les gouttes sont du côté gauche du détecteur (appelé côté « forward »), le compte est à zéro. Dès qu'une goutte apparaît devant le module de fluorescence elle est détectée (car son signal étant supérieur au seuil établi) et le compte augmente. Tant que le train va de la gauche vers la droite (forward -> reverse, le côté droit étant appelé « reverse »), le compte augmente. S'il n'y a plus de goutte détectée pendant un temps suffisamment long, le programme considère que le train est passé : il change alors la direction du train (en inversant les pressions appliquées au sein des réservoirs d'huile). Lorsque la direction est fwd <- rev, le compte diminue.

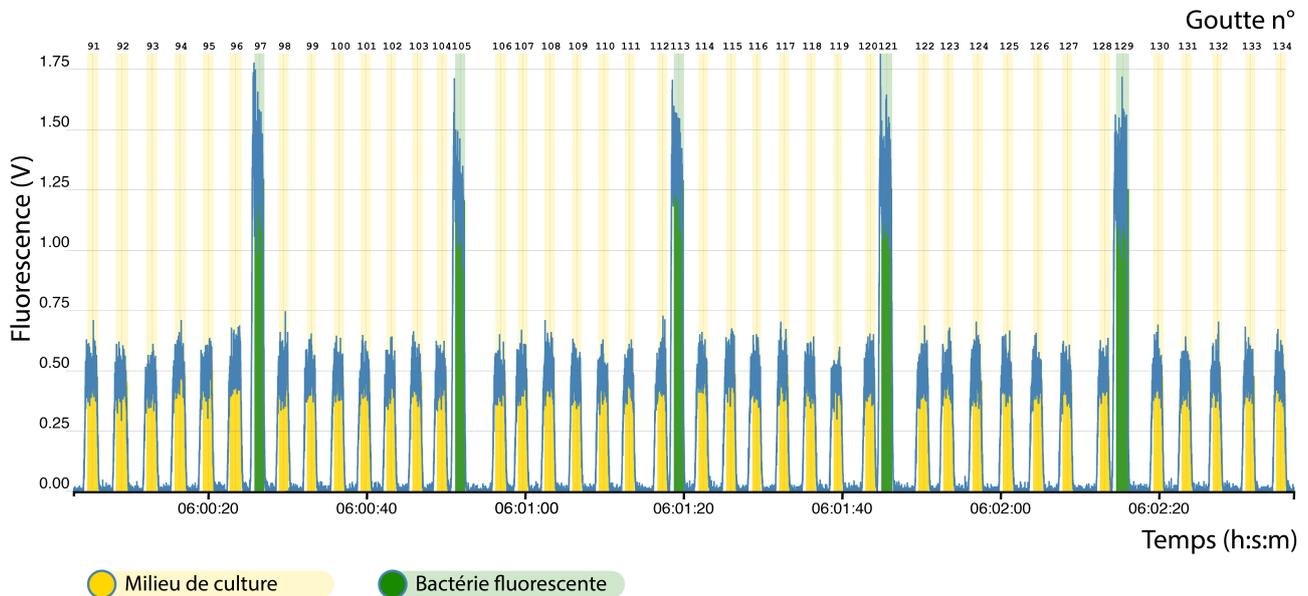


Figure II-27 : Extrait de signal enregistré sur un run

Ce graphe présente un exemple de données brutes enregistrées au cours d'un run. Les gouttes vertes correspondent à des gouttes où des bactéries fluorescentes sont présentes et entrain de croître, les autres traduisent le niveau minimal de fluorescence présenté par le milieu de culture. Après acquisition, ces données sont traitées et permettent d'accéder à une mesure de fluorescence par goutte par run (voir II.2.D.3).

II.2.D.3. Analyse des données

Une fois le signal de fluorescence acquis sur l'ensemble des runs, il peut être analysé à posteriori par un autre programme informatique. Le but de cette analyse est de reconstruire l'évolution temporelle des niveaux de fluorescence dans chacune des gouttes. A partir de la détection des gouttes effectuée précédemment, il est ensuite possible de d'extraire une mesure de la fluorescence de chaque goutte à chaque run (Figure II-28).

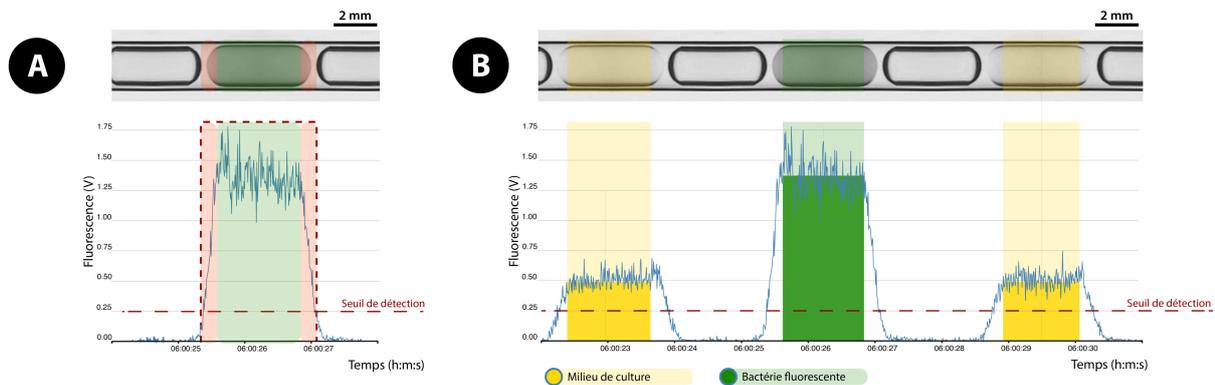


Figure II-28 : Mesure de la fluorescence de chaque goutte

(A) Les gouttes sont détectées et identifiées (rectangle pointillé) à partir de la méthode présentée précédemment (seuil de détection). Ensuite, et afin de mesurer une valeur représentative de la fluorescence, les parties correspondantes aux interfaces de la gouttes (fond rouge) sont supprimées et seule la partie centrale est conservée (fond vert). (B) La moyenne des valeurs sur cette partie est alors effectuée et donne accès à une mesure de fluorescence par goutte. Ici, par exemple, la mesure de fluorescence dans les gouttes de milieu est de 0,5V (auto-fluorescence) tandis que celle de la goutte contenant des bactéries fluorescentes est de 1,35V.

En moyennant le signal mesuré pour chaque goutte, à chaque run, on obtient donc un point de mesure par goutte par run. A partir des points de mesures obtenus pour toutes les gouttes sur l'ensemble des runs, il est ensuite possible de reconstituer l'évolution du niveau de fluorescence pour chaque goutte au fil des runs, et donc au cours du temps (Figure II-29).

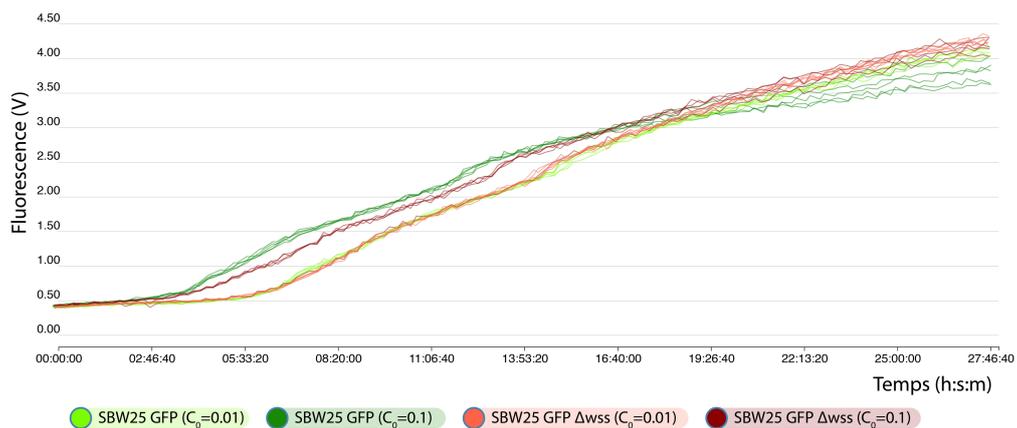


Figure II-29 : Evolution du signal de fluorescence au cours du temps

La croissance de bactéries fluorescentes peut être suivie optiquement dans le MDA. Ici, deux souches de *Pseudomonas Fluorescens* SBW25 GFP et SBW25 GFP Δwss (mutant ne formant pas d'agrégats) ont été utilisées à deux concentrations initiales ($C_0 = 0.1\text{OD}$ ou 0.01OD), donnant ainsi quatre conditions de culture. Pour chacune des conditions, 5 réplicas furent réalisés (dans 5 gouttes différentes). Ce graphique présente une analyse phénotypique par suivi de la fluorescence dans ces 20 gouttes au cours du temps. Le niveau de fluorescence n'étant mesuré qu'une fois par run, son évolution s'en retrouve échantillonnée au cours du temps, avec une fréquence imposée par la durée d'un run (typiquement un point de mesure toutes les 10-15min).

Pour chaque expérience réalisée avec cet instrument d'analyse (le MDA), le résultat est donc un ensemble de courbes traduisant l'évolution de la fluorescence au cours du temps. Le plus souvent, cette fluorescence est utilisée pour suivre la concentration en bactéries au sein des gouttes. La fluorescence étant proportionnelle à la biomasse, elle permet, lorsqu'elle est constitutive, d'évaluer la croissance bactérienne dans les gouttes (comme dans l'exemple de la Figure II-29).

Complété de ce module d'analyse, le MDA possède désormais tous les blocs nécessaires pour réaliser l'analyse phénotypique d'un millier de populations bactériennes de manière autonome : génération, manipulation et analyse des bioréacteurs (Figure II-30).

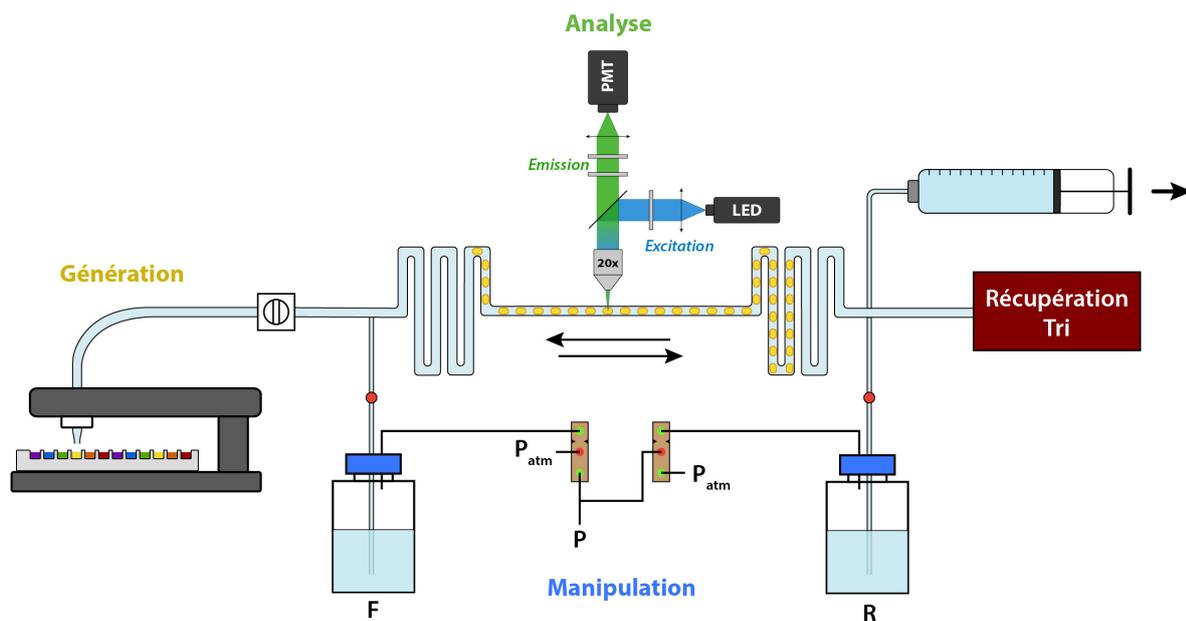


Figure II-30 : MDA - Schéma global (manipulation, génération, analyse)

Avec l'ajout du module d'analyse, le MDA possède désormais la possibilité de générer un millier de gouttes, puis de les incuber et de les analyser. Le module optique est placé au milieu du système fluide, afin que le train puisse être contenu dans une moitié de tube et que les allers retours soient réalisables. Comme nous l'avons vu, ce module permet de suivre l'évolution de la fluorescence sur l'ensemble du train au cours du temps grâce à l'analyse des gouttes, mais aussi leur détection.

Cependant, en plus de l'analyse optique, il peut s'avérer intéressant d'accéder au contenu biologique de chaque bioréacteur en fin d'expérience, pour des analyses complémentaires.

II.2.E. Récupération et tri des bioréacteurs

Afin de pouvoir récupérer les bioréacteurs en sortie de l'instrument, il a été développé un module de tri des gouttes (le «*sorter*»), basé sur le système utilisé pour la génération : le sipper. En effet, supplémenté d'une caméra permettant la détection des gouttes, le bras robotisé peut être utilisé pour récupérer et trier les bioréacteurs individuellement dans une plaque à puits. Grâce à la lecture phénotypique obtenue dans l'instrument d'analyse, les bioréacteurs, identifiés par leur position dans le train, peuvent être adressés dans des puits suivant leur identité. Là où le pousse seringue servait à aspirer le train lors de la génération, il est alors utilisé pour pousser le train hors de la machine (Figure II-31).

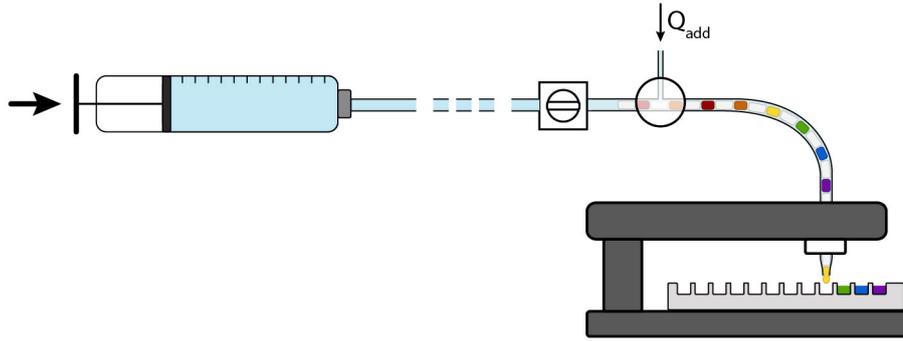


Figure II-31 : Mécanisme de récupération et de tri des bioréacteurs - Sorter

Une fois l'analyse effectuée, et chaque goutte identifiée, le train peut être récupéré dans une plaque multi-puits. Pour cela, le train est poussé vers la tête du sipper grâce à un pousse seringue. A son extrémité se trouve un détecteur permettant de synchroniser l'arrivée d'une nouvelle goutte avec son positionnement au-dessus d'un puits vide. Ainsi, le contenu de chaque goutte peut être récupéré individuellement. Les gouttes ne présentant aucun intérêt particulier, et que l'on ne souhaite pas récupérer, peuvent aussi être éliminées. Ce module fournit ainsi une solution permettant de sortir les gouttes une à une dans la position choisie.

Afin de s'assurer qu'une seule goutte soit délivrée dans chaque puits, une étape préliminaire consistant à l'expansion du train est nécessaire. Ce dernier passe alors au travers d'une jonction en T dans laquelle un flux d'huile est appliqué afin d'espacer les gouttes les unes des autres. Une fois la distance entre gouttes suffisamment grande, les gouttes peuvent être facilement triées. Les échantillons récupérés peuvent alors être utilisés pour réaliser des analyses complémentaires en dehors de l'instrument.

Avec ce nouveau module, l'instrument millifluidique fournit une méthode d'analyse complète de multiples communautés microbiennes en parallèle (Figure II-32).

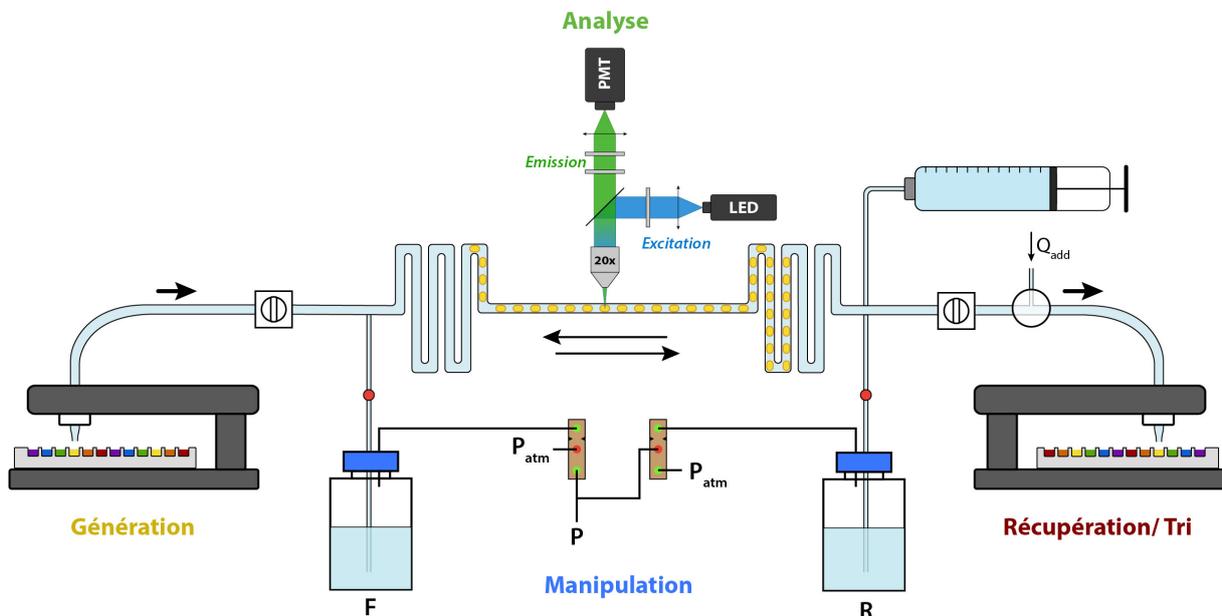


Figure II-32 : MDA - Schéma global (manipulation, génération, analyse, récupération/tri)

Avec l'ajout du module de récupération et de tri, le MDA possède désormais la possibilité de générer un millier de gouttes, puis de les incuber, de les analyser et enfin de les récupérer hors de l'instrument. Ainsi complété, le MDA fournit un puissant outil d'analyse de populations ou communautés de microorganismes.

Désormais, l'ultime fonction manquante pour conduire des cycles d'évolution est celle de la propagation des échantillons. La dernière partie de ce chapitre (II.3) nous permettra de montrer comment, peu à peu, le laboratoire a envisagé cela.

II.3. Millifluidique en gouttes : vers une technologie pour l'évolution dirigée de communautés

Le MDA, bien que possédant de nombreux avantages en faveur de la culture et de l'analyse de nombreuses populations en parallèle, présente tout de même des limitations quant à leur évolution. Nous avons vu (en II.2) comment, depuis 2015, la continuation des travaux de recherche en vue de travailler sur leur évolution a permis l'optimisation des diversités intra et inter populations dans l'instrument millifluidique. Cependant, et bien que cet instrument permette la manipulation des gouttes au sein de l'instrument, il ne présente, pour l'instant, pas de solution permettant d'instaurer une démographie au niveau des populations, telle que celle que nous avons présenté dans le modèle expérimental (sélection, propagation, voire mélange ou division). Notre but est à présent de montrer comment, depuis quelques années déjà, le laboratoire a envisagé cela, et comment la nécessité de développer une technologie de rupture est clairement apparue.

II.3.A. Vers un mécanisme de propagation des échantillons

La dernière fonction manquante au MDA pour en faire une technologie d'évolution est un mécanisme de sélection et de propagation des échantillons. Or, le module de récupération des bioréacteurs, initialement mis en place pour permettre une analyse plus poussée, fournit un niveau supplémentaire de manipulation de notre train de goutte qu'il est possible d'utiliser pour réaliser des cycles d'évolutions. En effet, avec ce dernier, tous les ingrédients pour réaliser une expérience d'évolution par transfert en série, voire par sélection artificielle, sont présents. Cet instrument permet de générer un millier de populations en maximisant diversité intra et inter-populations, de réaliser leur incubation et leur analyse en dynamique, puis de les récupérer, avec ou sans critère de sélection, sur plaque à puits. Une fois les populations récupérées, elles peuvent alors être diluées, ou manipulées à souhait, avant d'être réintroduites dans l'instrument millifluidique par génération, et ainsi réaliser des cycles d'évolution. Cet instrument fournit ainsi un accès à la gestion des trois types de sélections, naturelle, aléatoire et artificielle, requises dans notre modèle expérimental (II.1.C).

Très vite, néanmoins, cette méthode ne s'est pas révélée suffisamment adaptée aux études d'évolution. Premièrement, le volume des gouttes, de 20 μ L, n'est pas suffisamment petit devant la quantité d'un puits, de 100 μ L, pour permettre de réaliser l'étape de dilution et propagation directement sur une plaque à puits. Il faut donc récupérer les gouttes sur une première plaque, avant de pouvoir réaliser une étape de dilution sur nouvelle plaque, laquelle est ensuite suivie d'une nouvelle génération. De même, la division ou le mélange d'échantillons, requis lors de l'évolution par sélection artificielle, ne peuvent ici pas être effectués en une seule étape. Ceci représente des limitations en termes de temps de transfert, de maintien des conditions de culture, de contamination, ou encore d'automatisation. En effet, les temps de génération et de récupération d'un train de 1000 gouttes pouvant être estimés à plusieurs d'une heure chacun, l'étape de transfert entre deux incubations peut prendre, dans cet instrument, facilement plus de trois heures. Ce temps est trop long comparé à l'échelle de temps

biologique des microorganismes, où le temps de division peut être de moins d'une heure (comme pour *E. coli* ou *Pseudomonas*). Mais, cette limitation n'est pas la seule engendrée par ce processus. En effet, un des principaux intérêts de manipuler des gouttes en millifluidique est de les maintenir dans un environnement aux conditions contrôlées, isolées du monde extérieur, et d'éviter les contaminations. Le passage sur plaque implique nécessairement une externalisation, conduisant à la perte du contrôle des conditions de culture et pouvant être source de contaminations extérieures [54]. Cette externalisation implique également une complexification des manipulations, qu'il peut être difficile d'automatiser, et où les risques de contaminations entre échantillons sont accrus.

Bien que cette solution technologique présente le niveau de manipulation requis pour permettre de conduire l'évolution au niveau des populations, elle présente trop de limitations pour que son utilisation soit bénéfique. La gestion des trois niveaux de sélection, bien que possible, n'est ici pas simple. Ce genre de transfert engendre un trop grand nombre de biais non maîtrisés pour permettre de conduire une expérience d'évolution avec le niveau de contrôle que nous souhaitons, et sur le long terme. Il est donc de notre intérêt de limiter ces étapes critiques d'externalisation, et c'est pourquoi le développement d'une nouvelle solution technologique a dû être envisagé.

II.3.B. Conclusion

L'instrument d'analyse millifluidique (le MDA) permet, par l'utilisation de gouttes millimétriques, la culture, la manipulation, et l'analyse d'un millier de communautés microbiennes en parallèle de manière automatisée. Optimisé, cet instrument permet d'atteindre des conditions de cultures favorisant diversités intra et inter-communautés. Agrémenté du module de récupération et de tri, il permet même d'atteindre le niveau de manipulation requis pour instaurer une démographie au niveau des communautés et conduire leur évolution. La gestion de la sélection naturelle se fait lors de la génération du train, où chacun des bioréacteurs peut avoir une composition différente, tandis que le tri et la dilution en sortie de l'instrument, permettent la gestion des sélections artificielles et aléatoires. Il prouve ainsi que les gouttes permettent bien de répondre au modèle expérimental présenté en début de chapitre. Cependant, cette méthode présente des limitations trop conséquentes pour permettre de conduire des expériences d'évolution de façon viable et automatisée.

Les bases technologiques mises en œuvre dans l'instrument d'analyse millifluidique amélioré remplissent néanmoins toutes les exigences requises pour constituer l'épine dorsale d'une technologie d'évolution idéale. Le réel challenge est désormais de développer une nouvelle solution technologique permettant la sélection et la propagation de nos échantillons de manière simple, interne, robuste, rapide et directe.

Chapitre III :

Machine d'évolution microbienne

III. Machine d'évolution microbienne : une technologie pour diriger l'évolution de communautés de manière automatisée

La millifluidique digitale et l'emploi de gouttes millimétriques, forment une base solide sur laquelle une technologie d'évolution peut être construite. Tout ce qu'il manque à la technologie millifluidique présentée au Chapitre II est une innovation de rupture répondant aux exigences de notre modèle expérimental, permettant la sélection et la propagation des populations. Une solution disruptive a été inventée au sein du laboratoire et a permis le développement de cette technologie d'évolution. Ce troisième chapitre a pour but de présenter cette technologie, appelée « Machine d'Évolution Microbienne » (ou MEM pour « Microbial Evolution Machine », photo en Annexe III). Nous allons, dans un premier temps, entrer au cœur de la technologie d'évolution pour découvrir le mécanisme de sélection et de propagation qui l'anime : le « module de transfert ». Nous montrerons comment ce dispositif a permis de révolutionner la technologie millifluidique existante, et comment il permet de répondre à toutes les exigences de notre modèle expérimental. Nous verrons ensuite que ce cœur ne peut fonctionner sans être entourée d'autres organes, remplissant des fonctions vitales à la technologie d'évolution. Cette technologie, bien que simple dans son concept, n'en est pas moins complexe dans sa réalisation. Son fonctionnement repose sur une automatisation fiable et robuste, qui, plus que nécessaire, est impérative. Nous présenterons alors comment elle a été mise en place au cours de ma thèse.

III.1. Mécanisme de sélection et de propagation d'échantillons

La millifluidique en gouttes présente beaucoup d'avantages en ce qui concerne la culture, la manipulation et l'analyse de communautés de microorganismes. Cependant, en l'état, cette approche n'est pas suffisante pour réaliser l'évolution dirigée de ces communautés. Certes, l'utilisation du bras robotisé (le sorter) donne la capacité de propagation et de sélection, mais le passage par la millifluidique en deviendrait donc insignifiant et perdrait tout son sens. Comme nous l'avons souligné précédemment, un des intérêts majeurs de la millifluidique est son internalisation, et il n'y a donc aucun intérêt à sortir les gouttes du tube à chaque cycle pour ensuite les y réintroduire. De plus, cette méthode oblige à traiter toutes les gouttes en même temps, comme un « ensemble », alors que, comme dans le modèle expérimental établi, nous souhaiterions pouvoir effectuer les opérations voulues au niveau des gouttes, une à une. L'approche envisagée ici n'est pas la bonne. C'est de la réponse à ces deux contraintes, internalisation et individualisation, qu'a découlé la solution de rupture : utiliser deux tubes au lieu d'un seul.

III.1.A. La parallélisation des tubes au service des cycles d'évolution

En millifluidique, le tube est le support de base permettant toute opération, et nous en avons vu les nombreux avantages pour la culture et l'analyse de populations microbiennes. Cependant, pour permettre la propagation de nos populations, un seul tube n'est pas suffisant. Pour pouvoir prélever un échantillon d'une goutte, et le propager dans une nouvelle goutte, tout en conservant l'internalisation,

une parallélisation des tubes est nécessaire. C'est ainsi que le concept de base du mécanisme de propagation est apparu (Figure III-1).

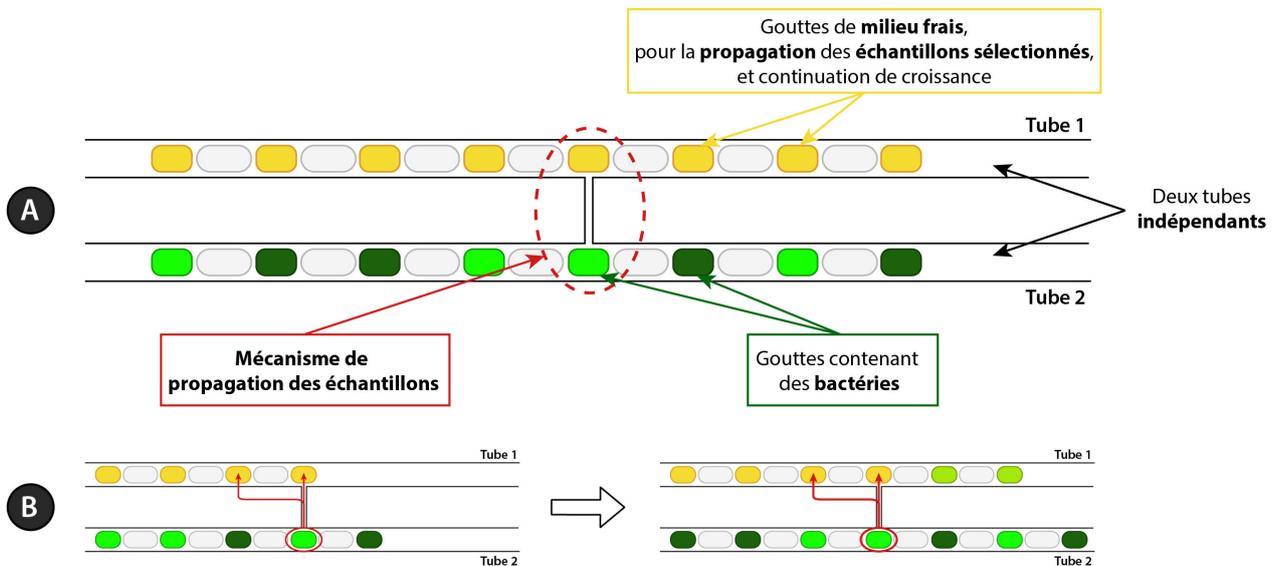


Figure III-1 : Concept du mécanisme de propagation des échantillons

Le concept de base du mécanisme de propagation est simple : deux tubes indépendants sont utilisés en parallèle et connectés par un mécanisme de propagation, un « canal de transfert » permettant d'établir une communication entre eux. A. Chaque tube étant indépendant, ce système permet une manipulation identique à celle explicitée dans le cas d'un tube unique, au sein de chacun d'eux. B. Mais, par la présence du canal de communication, ce système présente l'avantage de permettre l'échange d'échantillons entre les deux trains. Il permet de sélectionner une goutte mère souhaitée, et d'en propager un échantillon dans la ou les gouttes filles souhaitées. Ce système représente la solution technologique permettant d'instaurer une démographie au niveau des populations, telle que celle que nous avons présenté dans le modèle expérimental (sélection, propagation, voire mélange ou division), dans la technologie millifluidique.

L'utilisation de deux tubes indépendants en parallèle permet la manipulation de deux trains de gouttes de manière simultanée. Alors que le tube 2 permet l'incubation et l'analyse du train de gouttes « mères » (ou donneuses), contenant les populations microbiennes, le tube 1 est utilisé pour générer un train de gouttes « filles » (ou receveuses), contenant du milieu de culture frais, et prêtes à recevoir les échantillons que l'on souhaite propager. Ainsi, une fois l'incubation et l'analyse des populations microbiennes terminée dans le tube 2, un critère de sélection peut être établi sur les gouttes mères, et un échantillon de chaque goutte choisie peut être transféré vers une ou plusieurs gouttes filles, nouvel environnement dans lequel les microorganismes pourront croître et se développer. Ce système change drastiquement les possibilités de la technologie millifluidique en permettant un transfert d'échantillon interne et direct (de goutte à goutte). La manipulation aisée des trains dans leur propre tube permet de sélectionner et de positionner les gouttes donneuses et receveuses en face du canal de transfert, afin d'effectuer la propagation. Ce nouveau mécanisme donne ainsi accès au niveau de manipulation requis pour instaurer une démographie au niveau des gouttes, et donc des populations sous-jacentes. La réalisation de cycles d'évolution peut alors être facilement implémentée (Figure III-2).

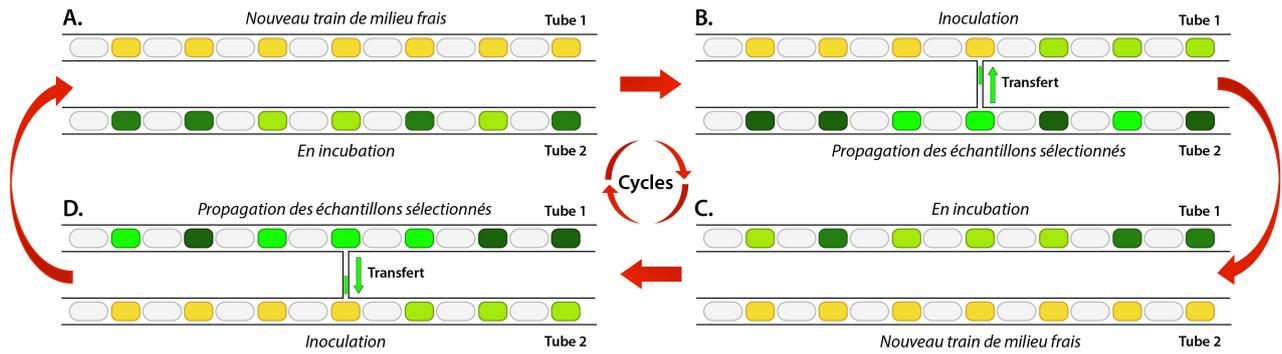


Figure III-2 : Concept des cycles d'évolution

Ce schéma présente comment, à partir du concept du mécanisme de propagation présenté précédemment (Figure III-1), des cycles d'évolutions peuvent être réalisés. A- Alors qu'un tube (tube 2) est utilisé pour incuber un train de populations microbiennes, un train de milieu frais peut être généré dans l'autre tube (tube 1). B- Une fois l'incubation terminée, on peut procéder à la propagation des populations sélectionnées, par transfert d'échantillons depuis les gouttes mères (tube 2) vers les gouttes filles (tube 1). Ici, par exemple, seules les gouttes vert clair sont sélectionnées et propagées, donnant ainsi un train ne contenant que des gouttes vert clair. C- Le train du tube 2 peut alors être évacué et remplacé par un nouveau train de milieu frais, tandis que le train fraîchement inoculé (tube 1) est maintenu en incubation. Ici, on peut voir que durant l'incubation, de la diversité apparaît entre les gouttes : des gouttes de couleur vert foncé apparaissent à nouveau. D- Une fois l'incubation terminée dans le tube 1, on peut à nouveau procéder à la propagation des populations sélectionnées, par transfert d'échantillons cette fois-ci depuis les gouttes mères du tube 1 vers les gouttes filles du tube 2. A nouveau, la sélection vise ici à ne propager que les gouttes de couleur vert clair. On revient alors à la situation de départ (décrite en A). La succession des étapes A, B, C et D permet la réalisation de cycles d'évolution.

Le processus de sélection et propagation des échantillons que nous avons présenté précédemment (Figure III-1) n'est effectivement pas figé à une unique direction, et les fonctions effectuées au sein de ces deux tubes peuvent être échangées. Après avoir procédé à la propagation dans une direction (2 -> 1), ces fonctions peuvent donc être interverties pour permettre la propagation dans l'autre sens (1 -> 2), et ainsi conduire l'évolution des populations microbiennes par la réalisation de cycles. Un exemple détaillé de ce processus est donné par la Figure III-2.

Bien que nous présentions ici ce module comme la solution pour diriger l'évolution de communautés microbiennes, ses applications ne se résument pas à l'évolution. En permettant de transférer un échantillon de taille contrôlé de n'importe quelle goutte d'un premier train vers n'importe quelle goutte d'un second train de manière directe et interne, cette technologie ouvre les portes à un pouvoir combinatoire en gouttes sans précédent. Dans ce système, des échantillons peuvent être manipulés, prélevés, mélangés, séparés, pour de la culture de microorganismes (comme dans notre cas), mais également pour du criblage de molécules chimiques ou biologiques, ou pour la réalisation de réactions, en une ou plusieurs étapes, entre différents composés.

Ce paragraphe nous a permis de nous faire une idée conceptuelle du fonctionnement et de l'utilité du mécanisme de propagation. Nous souhaitons désormais voir comment il est mis en œuvre dans la technologie d'évolution.

III.1.B. Module de transfert

Pour mettre en œuvre le concept que nous venons de présenter, un module permettant le transfert d'échantillons entre deux gouttes a été inventé au laboratoire [70]. Ce module, bien que conçu

peu de temps avant le début de ma thèse, a demandé près de trois ans de recherche et développement pour aboutir sur un prototype fonctionnel, robuste et fiable. Nous présenterons ici la version actuelle de cette pièce maîtresse, version employée dans la machine d'évolution que j'ai conçue et développée au cours de ma thèse. Notre but, ici, est que le lecteur puisse acquérir une compréhension du fonctionnement de ce mécanisme et de ce qui en fait sa complexité. Ceci permettra, par la suite, de mieux aborder le fonctionnement de la machine d'évolution dans sa globalité (voir III.2), puis de justifier ses caractéristiques actuelles (Chapitre IV).

III.1.B.1. Une vanne microfluidique à interfaçage millifluidique

Le modèle conceptuel du mécanisme de sélection et propagation repose, comme nous l'avons vu, sur l'utilisation de deux tubes, indépendants, mais pouvant communiquer via un canal de transfert. Afin de mettre en œuvre ce concept dans notre dispositif, un trou de diamètre $d_t = 600\mu\text{m}$ est réalisé dans chacun des tubes millifluidiques ($d=2,15\text{mm}$), et ces derniers sont insérés dans un bloc de PDMS⁶ contenant un fin canal microfluidique $d_c = 100\mu\text{m}$ permettant leur communication. Le PDMS étant un élastomère (polymère « élastique ») transparent, il permet à la fois d'assurer l'étanchéité de notre système, mais aussi la visibilité des gouttes, et donc leur détection et leur identification, nécessaires à leur manipulation. Mais les bénéfices du PDMS dans notre application ne s'arrêtent pas là. Son comportement élastique est aussi mis à profit pour convertir ce simple canal en une vanne microfluidique, permettant d'autoriser ou non la communication entre les tubes principaux (Figure III-3).

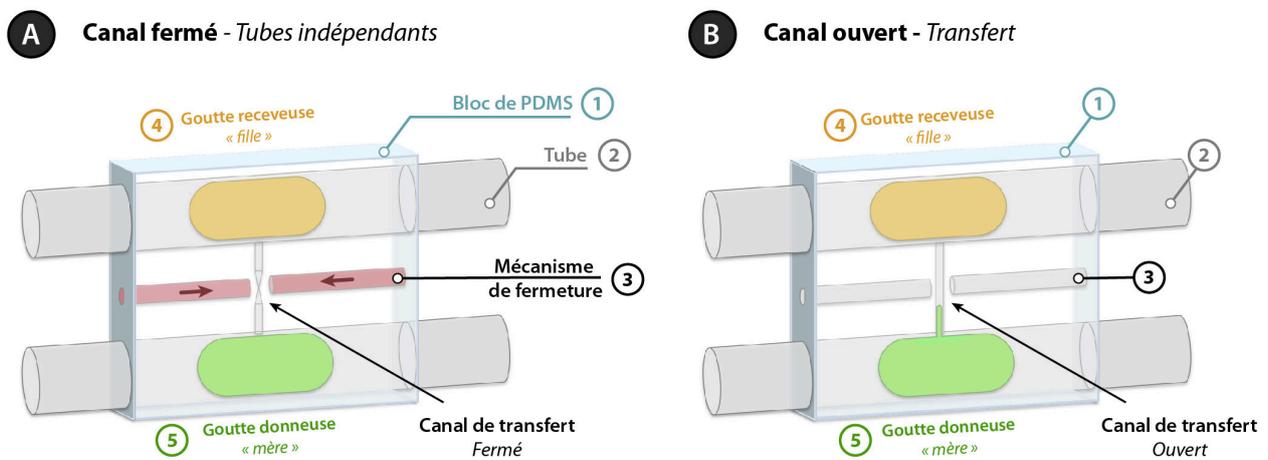


Figure III-3 : Module de transfert – schématisation

Schéma représentant le module de transfert, module permettant de connecter deux tubes millifluidiques par un canal microfluidique (de $100\mu\text{m}$ de diamètre et de 3mm de long). Des deux côtés de ce canal se trouvent des « canaux de pincement » permettant de convertir ce simple canal en une vanne microfluidique. Les extrémités de ces deux canaux (de diamètre $d_{\text{pinchoff}} = 1\text{mm}$) étant très proche du canal de transfert (à $100\mu\text{m}$), elles peuvent être aisément comprimées, par actionnement pneumatique (similairement à une vanne de Quake [71]) ou mécanique, pour fermer le canal. Aujourd'hui, un système mécanique est employé et permet un contrôle rapide de l'état de communication entre les deux tubes principaux (ouvert ou fermé). Nous présenterons ces performances au Chapitre IV. A- Dans son état fermé, la vanne ne permet aucun transfert de matière entre les deux tubes, jusqu'à une différence de pression critique $\Delta P_{\text{crit}} > 1000\text{mBar}$. B- Dans son état ouvert, elle autorise le transfert de fluide entre les deux tubes.

⁶ « Polydiméthylsiloxane », polymère siliconé souple, moulable et transparent couramment utilisé pour réaliser des dispositifs microfluidiques.

La fermeture de cette vanne par simple « pincement » mécanique permet d'assurer l'indépendance des deux tubes (jusqu'à une pression critique $\Delta P_{crit} > 1000\text{mBar}$). Les trains dans chacun des tubes peuvent alors être manipulés de manière isolée. Il suffit pour cela d'appliquer une différence de pression entre les deux extrémités du tube en question, comme expliqué en II.2.C. Mais, l'ouverture de cette vanne permet également la mise en communication des deux tubes. Si ces derniers sont à la même pression hydrostatique, aucun flux n'aura lieu entre eux. Cependant, si une différence de pression suffisante (supérieure à la pression capillaire $P_c \sim 20\text{mBar}$, voir Équation III-1) est appliquée entre les deux tubes, l'ouverture du canal conduira au transfert de fluide du tube à plus forte pression vers le tube à moins forte pression.

$$P_c = \frac{2\gamma \cos(\theta)}{r}$$

Équation III-1 : Pression capillaire au sein du canal de transfert

La pression capillaire P_c dans un canal fin est exprimée par l'équation ci-dessus, où γ représente la tension superficielle entre le fluide et le canal, θ l'angle de contact formé avec la surface du canal, et r le rayon du canal. Pour l'application numérique nous prendrons $\gamma = \gamma_{\text{eau-FC40}} = 53.3 \text{ mN/m}$, $\theta = 180^\circ$ (pour évaluer la limite supérieure) et $r = 50\mu\text{m}$ (le canal de transfert ayant un diamètre $d=100\mu\text{m}$). On trouve alors une pression capillaire $P_c = 21.32 \text{ mBar}$.

L'intérêt de ce dispositif est donc de manipuler le train donneur à plus forte pression que le train receveur, de manière à ce que, lors de l'ouverture du canal, le contenu du premier soit aspiré par le second. Afin de procéder au transfert entre deux gouttes, il est donc nécessaire de pouvoir les identifier, les positionner précisément en face du canal de transfert, puis de les maintenir en position le temps de l'ouverture du canal. Afin de contrôler le mouvement des gouttes de manière précise, une rétroaction sur leur position et leur vitesse est impérative. De même, pour contrôler le volume transféré (correspondant à l'inoculum propagé), une rétroaction sur la taille des gouttes est également requise (voir III.1.B.2.2), car, comme nous le verrons par la suite (Chapitre IV), le débit de transfert n'est pas constant.

Le module de transfert fournit donc le niveau de manipulation requis pour permettre la manipulation indépendante des trains puis la propagation de nos populations microbiennes, mais, ce système fluidique ne se suffit pas à lui-même. Une rétroaction sur la position, la vitesse et la taille des gouttes est requise. Ceci passe par une détection robuste des gouttes, mais également par un contrôle précis et rapide des pressions à employer.

III.1.B.2. Détection et manipulation lors d'un transfert entre deux gouttes

III.1.B.2.1. Détection

Le module de transfert permet d'effectuer les opérations fluidiques nécessaires au transfert de fluide entre deux tubes, mais, sans moyen de détection il n'est pas possible d'effectuer la propagation d'échantillons entre gouttes. En effet, dans ce processus, les gouttes étant repérées par leur position dans le train, si une erreur d'identification est commise, elle conduira à la sélection des mauvaises gouttes et donc à la propagation des mauvaises populations microbiennes. De plus, un contrôle très précis de la position des gouttes est requis, pour s'assurer que les gouttes donneuses et receveuses soient bien alignées avec le canal, et qu'elles le restent, pour ne pas transférer de l'air, de l'huile, ou une goutte non souhaitée. Plus que requise, une détection robuste et cent pour cent fiable est ici impérative.

Dans notre système, ce niveau de robustesse et de fiabilité ne peut être atteint qu'en ayant un contrôle visuel de nos gouttes. Pour ce faire, une caméra est employée, et focalisée sur le module de transfert, permettant ainsi d'obtenir une vue d'ensemble, où les deux tubes et le canal de transfert sont visibles (Figure III-4).

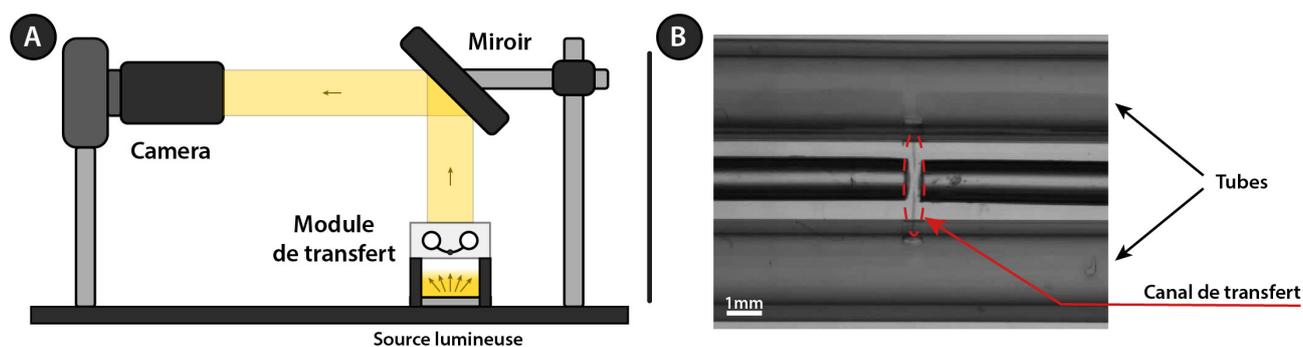


Figure III-4 : Dispositif optique du module de transfert

A- Schéma du dispositif optique permettant la détection des gouttes dans le module de transfert. B- Photo présentant la vue obtenue par la caméra employée pour effectuer la détection des gouttes.

Ce dispositif permet d'avoir un contrôle visuel en temps réel sur nos gouttes au sein de notre système, mais il est ensuite nécessaire de procéder au traitement des images acquises pour pouvoir y identifier les gouttes de manière dynamique. La méthode employée doit donc permettre de différencier la phase continue (l'huile), des gouttes de phase aqueuse, pouvant être de taille, de forme, de composition différentes, et des bulles d'air, d'aspect et de forme différentes selon leur taille (Figure III-5).

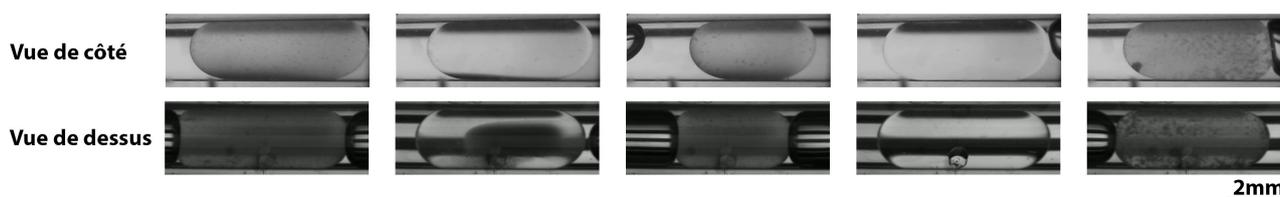


Figure III-5 : Des gouttes aux formes et aspects divers

Ces photos montrent la diversité de formes, de tailles et d'aspect que peut avoir un train dans un tube millifluidique. La forme des gouttes et des bulles d'air dépend de leur taille, mais aussi de la « compaction » du train. L'aspect des gouttes dépend de leur contenu (eau, milieu de culture, colorant) mais varie également au cours du temps en cas de croissance microbienne, et de leur phénotype (qui peut être planctonique, présenter des agrégats, ou sédimenter). Peu importe leur forme et leur aspect, leur détection doit néanmoins rester robuste et précise.

Réaliser cette détection par analyse d'image en temps réel de manière rapide, robuste et précise n'est pas aisé, d'autant plus qu'aucun compromis ne peut être fait sur aucun de ces critères. Une reconnaissance de forme, bien que possible, ne présente pas le niveau de performance requis sur aucun de ces trois critères, et ne convient donc pas à nos besoins. La solution employée doit s'affranchir du contenu de la goutte, et c'est ainsi qu'est née la première solution.

❖ Méthode de la ligne de détection

La méthode de la ligne de détection consiste à détecter les gouttes grâce à un élément externe (et non interne) à ces dernières, et indépendamment de leur contenu. Lorsqu'un tube est exposé à l'air libre, la réfraction de la lumière sur les bords d'une bulle d'air ou d'une goutte de phase aqueuse diffère, et permet l'identification de ces dernières, peu importe leur contenu, grâce à une « ligne de détection » (Figure III-6).

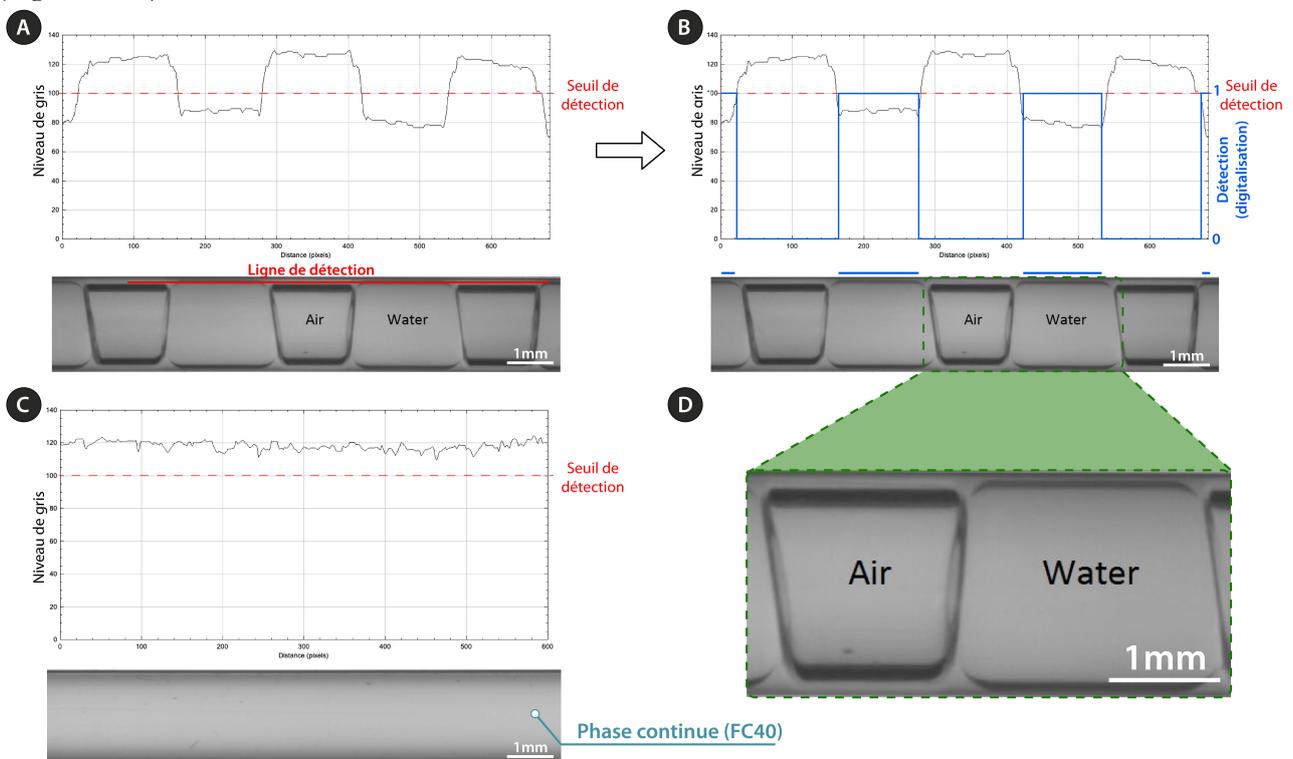


Figure III-6 : Ligne de détection

La méthode dite de « ligne de détection » consiste à regarder les valeurs des pixels (en niveau de gris) sur une ligne bien précise, en bordure du tube (figure A - ligne rouge). A- Sur cette ligne, les gouttes de phase aqueuse présentent toujours une valeur plus basse que les bulles d'air, ou que la phase continue (voir figure C). B- En appliquant un seuil de détection, il est donc possible de ne récupérer que le signal des gouttes, et de le digitaliser (figure B) de manière à obtenir un signal carré, oscillant entre 0 signifiant « pas de gouttes » et 1 signifiant « une goutte ». D- Un zoom est effectué sur une goutte et une bulle pour souligner la différence de niveau de gris en bordure de ces deux « objets ». Ce traitement rapide étant appliqué sur chaque image acquise en temps réel, un suivi des gouttes est facilement réalisable de manière robuste et fiable.

La méthode de la ligne de détection s'applique parfaitement pour tout tube exposé à l'air et présente alors les caractéristiques requises que sont : rapidité, robustesse et précision. Cependant, dans notre cas le tube n'est pas exposé à de l'air mais se trouve intégré dans un bloc en PDMS. Bien que transparent, ce dernier change les indices de réfraction au sein de notre dispositif et supprime cet effet optique, rendant impossible la méthode de la ligne de détection (Figure III-7).

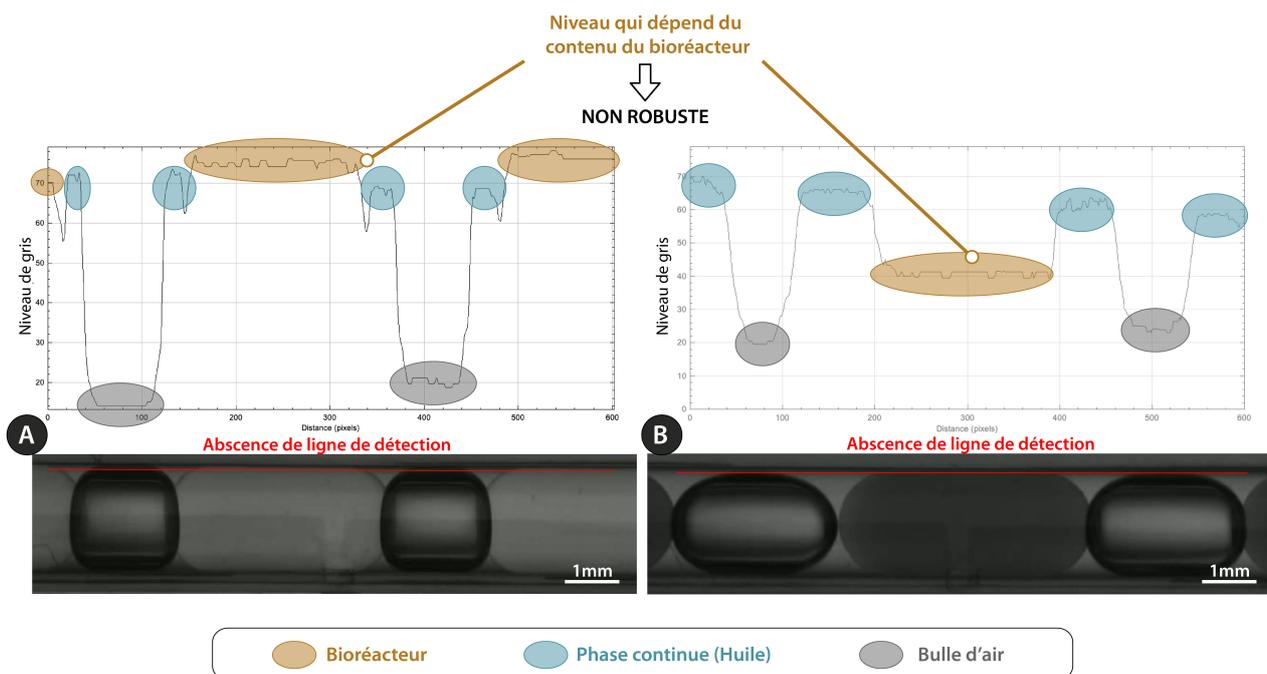


Figure III-7 : Le PDMS supprime la ligne de détection

Le PDMS change les indices de réfraction dans notre système et ne permet plus d'appliquer la méthode de ligne de détection. Si l'on essaie d'appliquer la même méthode précédemment expliquée, on se rend compte que la valeur des gouttes dépend de leur contenu, chose dont nous souhaitons nous affranchir.

Face à ce problème, un travail de recherche conséquent a été conduit au cours de ma thèse (en collaboration avec A. Chaurasia) afin de trouver une nouvelle solution aussi robuste, rapide, et précise que celle de la ligne de détection. De nombreuses méthodes de détection ont été mises en œuvre (dont la reconnaissance de forme), mais se sont toujours révélées présenter des limitations trop importantes sur au moins une de ces trois caractéristiques pour être utilisable de façon pérenne. La méthode de la ligne de détection restant inégalable, nous avons cherché à supprimer l'effet négatif du PDMS en modifiant la conception du module de transfert de façon à conserver la ligne de détection par exposition du tube à l'air. Néanmoins, et malgré les nombreux efforts fournis, étanchéité du module en PDMS et ligne de détection ne pouvaient jamais coexister. Ces étapes de recherche et développement, bien que non fructueuses, nous ont néanmoins permis d'acquérir une meilleure compréhension du phénomène de réfraction ayant lieu au sein du module. Nous sommes donc revenus au design initial du module de transfert, mais avec une compréhension optique supplémentaire, qui nous a permis de trouver la solution.

❖ Méthode de la double bande de détection

La solution employée consiste à tirer profit du phénomène de réfraction, pour modifier le chemin optique de manière à créer une double ligne de détection. Ce « motif » peut être créé en ajoutant deux bandes noires de dimensions contrôlées à des positions précises dans le chemin optique de chaque tube. Il permet de différencier les trois phases (bulle, goutte et phase continue), tout en s'affranchissant du contenu et de la forme des gouttes (Figure III-8).

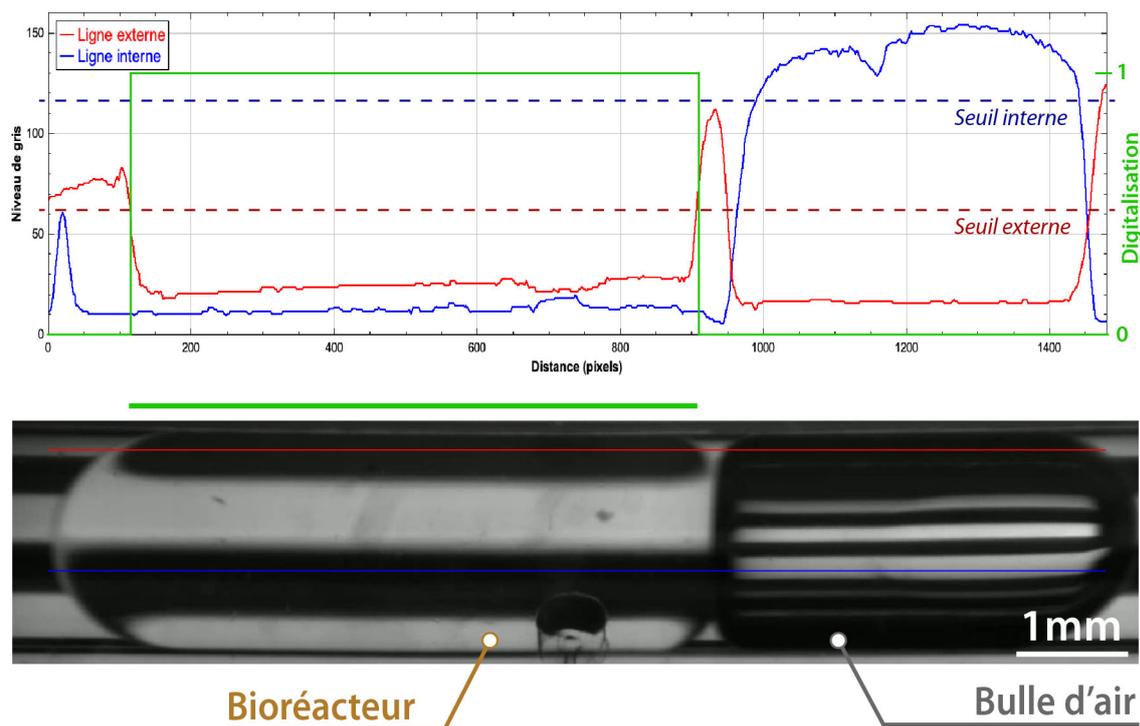


Figure III-8 : Double ligne de détection (dans du PDMS)

Par réfraction, il est possible de créer un « motif » présentant deux bandes noires au sein d'un même tube. La bande « externe » (ligne rouge), présente sur le bord des tubes, permet de différencier les gouttes et les bulles d'air, de l'huile. Ensuite, la bande « interne » (ligne bleue) permet de différencier les gouttes (et l'huile) des bulles d'air. Un programme informatique vérifie donc en temps réel laquelle de ces conditions est vérifiée, et permet une détection rapide des gouttes, quels que soient leur forme et leur contenu. Ce programme permet également de gérer des conditions plus spécifiques, survenant aux interfaces, ou dans des cas particuliers, comme le cas d'un train compact. Cette méthode fournit, dans du PDMS, les mêmes niveaux de robustesse, de fiabilité et de rapidité que la méthode de la ligne de détection sur un tube exposé à l'air.

Chaque double bande utilisée, si elle est précisément dimensionnée et positionnée, permet la création de deux lignes noires dans le tube qui la surplombe : une ligne « externe » et une ligne « interne ». La première ligne (la ligne externe) empêche le passage de la lumière sur les bords des gouttes (peu importe leur forme et leur contenu), et cela sans affecter la phase continue à ce même endroit. Ainsi, à la manière de la ligne de détection, les gouttes et les bulles (déjà noires à cet endroit-là) peuvent être différenciées de la phase continue. La seconde ligne (la ligne interne) fait que, à une position donnée dans le tube, la lumière n'est pas transmise dans les gouttes et la phase continue, tandis qu'elle le sera forcément dans une bulle. Cette configuration est essentielle, car elle permet de s'affranchir du contenu des gouttes de phase aqueuse, qui peuvent alors contenir du colorant, des microorganismes, des agrégats, des microparticules, etc. sans affecter leur détection. Cette méthode, qui pourrait être comparée à un « code-barres », n'est pas lourde en calcul, et permet donc une détection rapide, robuste et fiable des gouttes ainsi que des bulles d'air, par traitement d'image en temps réel. En plus de permettre l'identification des gouttes et leur suivi au cours du temps, nécessaire à leur transfert, elle permet également d'accéder à une mesure de leur taille, et donc de leur volume ou encore de leur vitesse. Ces informations s'avèrent cruciales dans notre technologie, que ce soit pour contrôler le volume transféré lors de la propagation des échantillons (voir III.1.B.2.2), ou encore maintenir nos bulles d'air de taille constante au cours du temps (voir III.2.C.2). Nous reviendrons sur ces aspects par la suite.

Ayant désormais un système de détection et d'identification des gouttes en temps réel fiable et robuste, nous souhaitons présenter le processus de manipulation conduit pour procéder au transfert d'un échantillon d'une goutte mère vers une goutte fille.

III.1.B.2.2. Manipulation et positionnement des gouttes

Grâce à une détection robuste, précise et rapide, il est désormais possible d'induire une rétroaction entre position de la goutte cible et pression à appliquer aux extrémités du tube. Les gouttes étant arrangées linéairement dans le tube, elles peuvent être identifiées par comptage au niveau de la camera, et il est donc aisé de savoir où se trouve la goutte recherchée, et de l'amener au module de transfert (Figure III-9).

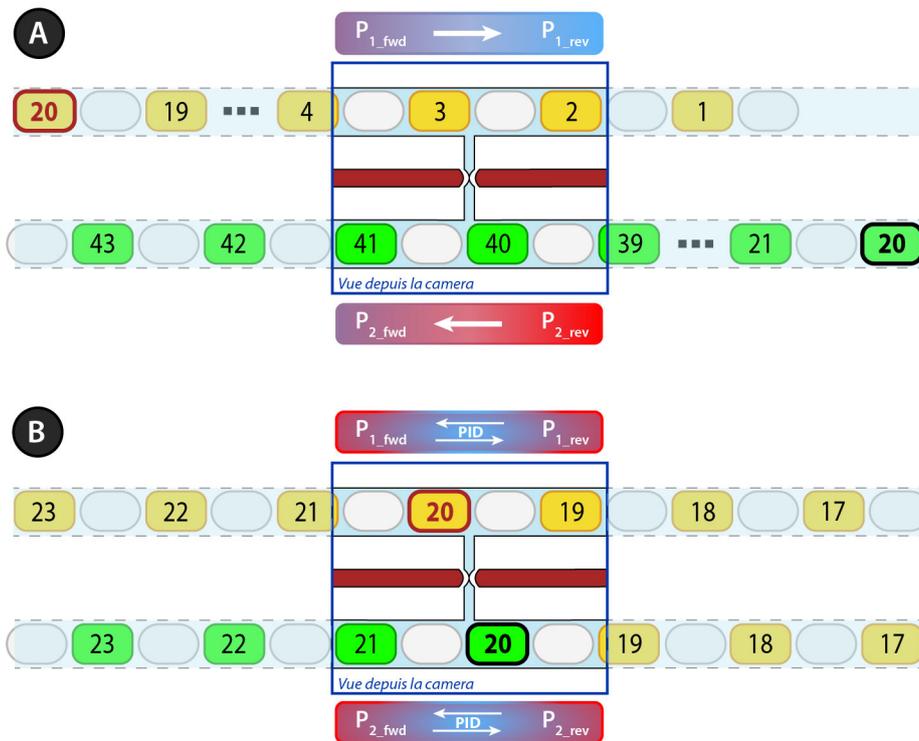


Figure III-9 : Positionnement des gouttes dans le module de transfert

Schéma représentant la rétroaction appliquée entre position de la goutte cible et pressions aux extrémités du tube concerné. Grâce à une détection robuste, il est possible d'identifier les gouttes, puis de les compter au niveau du module de transfert, selon la même méthode que celle décrite précédemment pour le détecteur de fluorescence (voir Figure II-26). A. Grâce à l'arrangement linéaire des gouttes, il est donc possible de connaître la position de la goutte cible recherchée, dans notre cas la goutte 20 (pour les deux tubes). Les pressions aux extrémités de chaque tube sont alors automatiquement ajustées de façon à amener la goutte cible devant la caméra. Dans cet exemple, les gouttes 2 et 3 étant présentes au niveau de la caméra dans le tube 1, une pression supérieure est employée en amont du train ($P_{1_fwd} > P_{1_rev}$) de façon à amener la goutte 20. Dans le tube 2, le cas contraire ($P_{2_fwd} < P_{2_rev}$) est illustré. B. Une fois la goutte cible visible par la caméra, il est nécessaire de la stabiliser au niveau du canal de transfert pour procéder à la propagation. Sa position est alors contrôlée par un algorithme PID (proportionnel, intégral, dérivé), ajustant en temps réel la différence de pression au sein du tube par rapport à la position de la goutte cible. Durant toutes ces opérations, le tube donneur est manipulé à plus haute pression que le tube receveur de manière à ce que, lorsque le canal est ouvert, le transfert d'échantillon est lieu.

Logiquement, si la goutte recherchée est du côté gauche du module de transfert (coté « fwd »), une pression supérieure est appliquée en amont du train ($P_{fwd} > P_{rev}$) afin d'amener la goutte au niveau de la camera. Au contraire, si la goutte est du côté droit (coté « rev »), une pression supérieure est appliquée en aval du train ($P_{fwd} < P_{rev}$). Une fois la goutte dans le champ de vision de la camera, sa position peut alors être contrôlée précisément par ajustement automatisé des pressions via un algorithme PID (proportionnel, intégral, dérivé) (Figure III-10).

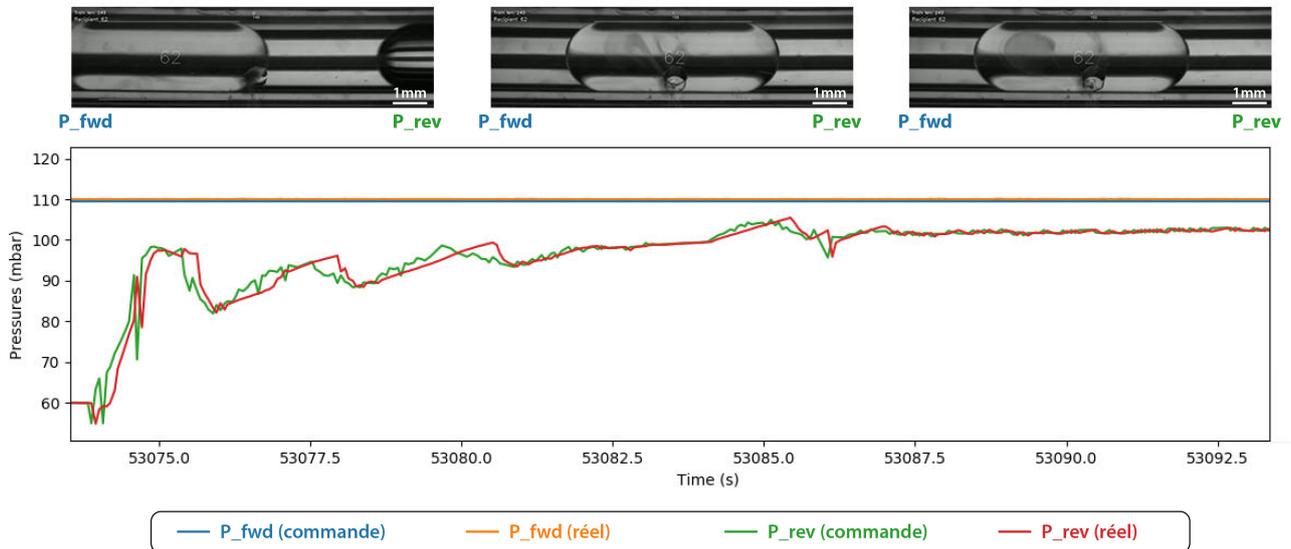


Figure III-10 : Contrôle de la position de la goutte par algorithme PID

Exemple de positionnement d'une goutte fille en face du canal de transfert par contrôle PID (proportionnel, intégral, dérivé). Le graphique montre l'évolution des pressions commandées par l'algorithme, et de celles réellement appliquées par le contrôleur de pression en fonction du temps. Alors que la pression en amont du train (P_{fwd}) est maintenue constante, la pression en aval du train (P_{rev}) est ajustée en temps réel et de manière automatisée afin de positionner et stabiliser la goutte cible à la position souhaitée (ici, en face du canal de transfert). Dans les deux cas, les pressions appliquées par le contrôleur suivent celles commandées par l'algorithme avec précision et rapidité.

Les paramètres de l'algorithme PID utilisé ne sont pas fixes mais dépendent de la longueur du train, et de la position de la goutte cible dans le train. En effet, la rétroaction à appliquer entre pression et position varie fortement en fonction de la quantité d'air présente entre la goutte cible et le réservoir où la pression est ajustée. Des comportements différents sont ainsi observés entre début et fin du train (Figure III-11).

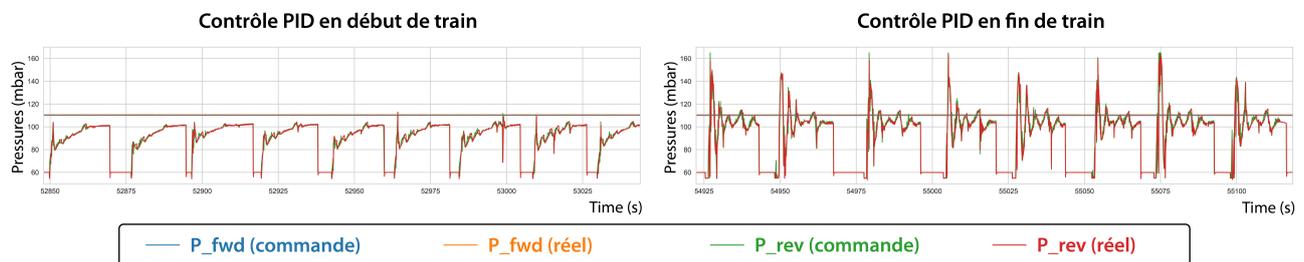


Figure III-11 : Contrôle PID paramétré

Ce schéma présente l'évolution des pressions commandées par l'algorithme, et de celles réellement appliquées par le contrôleur de pression en fonction du temps lors de l'étape de transfert. Comme l'illustre ces deux graphes, le comportement de l'algorithme PID varie selon que la goutte cible se trouve au début ou à la fin du train, mais quelle que soit sa position, le transfert a toujours lieu en 15-20 secondes.

Avec ce niveau de contrôle sur la position des gouttes, le transfert d'échantillon entre deux gouttes peut désormais être réalisé. Il consiste en une succession d'étapes, toutes automatisées, et présentées Figure III-12.

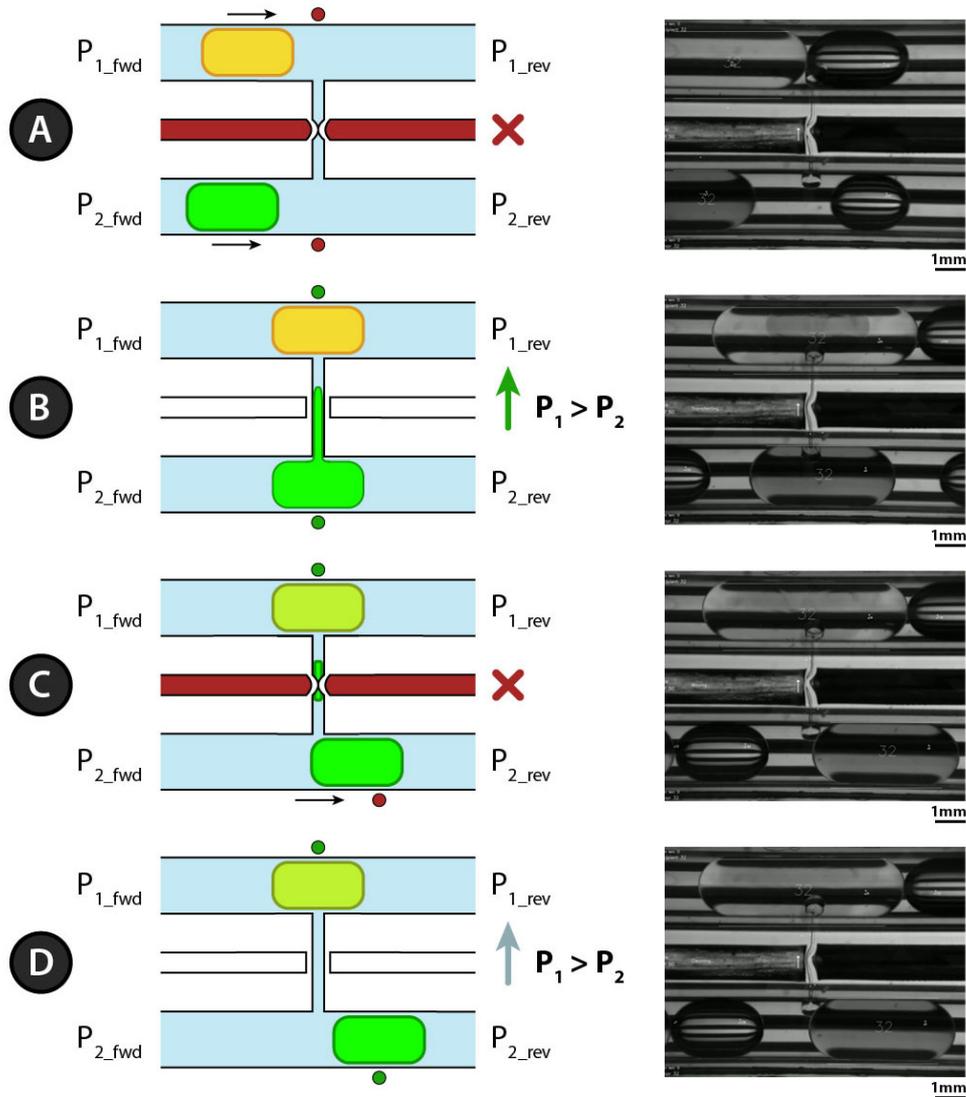


Figure III-12 : Étapes de transfert

Schéma représentant les différentes étapes conduites pour propager un échantillon d'une goutte mère vers une goutte fille. A- Positionnement des gouttes mère et fille en face du canal de transfert, et stabilisation. B- Ouverture du canal, maintien des gouttes en position et contrôle du volume transféré. C- Fermeture du canal et décalage de la goutte mère pour libération du canal de transfert. D- Nettoyage du canal par transfert d'huile.

Afin de procéder au transfert d'un échantillon d'une goutte mère vers une goutte fille, les deux gouttes sont identifiées (grâce à l'algorithme de détection), puis positionnées (par rétroaction entre détection et pression) en face du canal de transfert (Figure III-12-A). Lorsque positionnées et stabilisées, le canal est ouvert afin de procéder au transfert (Figure III-12-B). Le volume transféré est alors contrôlé par mesure de l'augmentation de la taille des gouttes, car, comme nous le verrons plus tard (Chapitre IV), le débit de transfert n'est pas constant. La mesure en temps réel de la taille des gouttes permet de suivre l'évolution de leur volume durant le transfert, et d'appliquer une rétroaction

sur cette mesure pour que, une fois le volume souhaité atteint, le transfert soit automatiquement arrêté par fermeture du canal de transfert (Figure III-13).

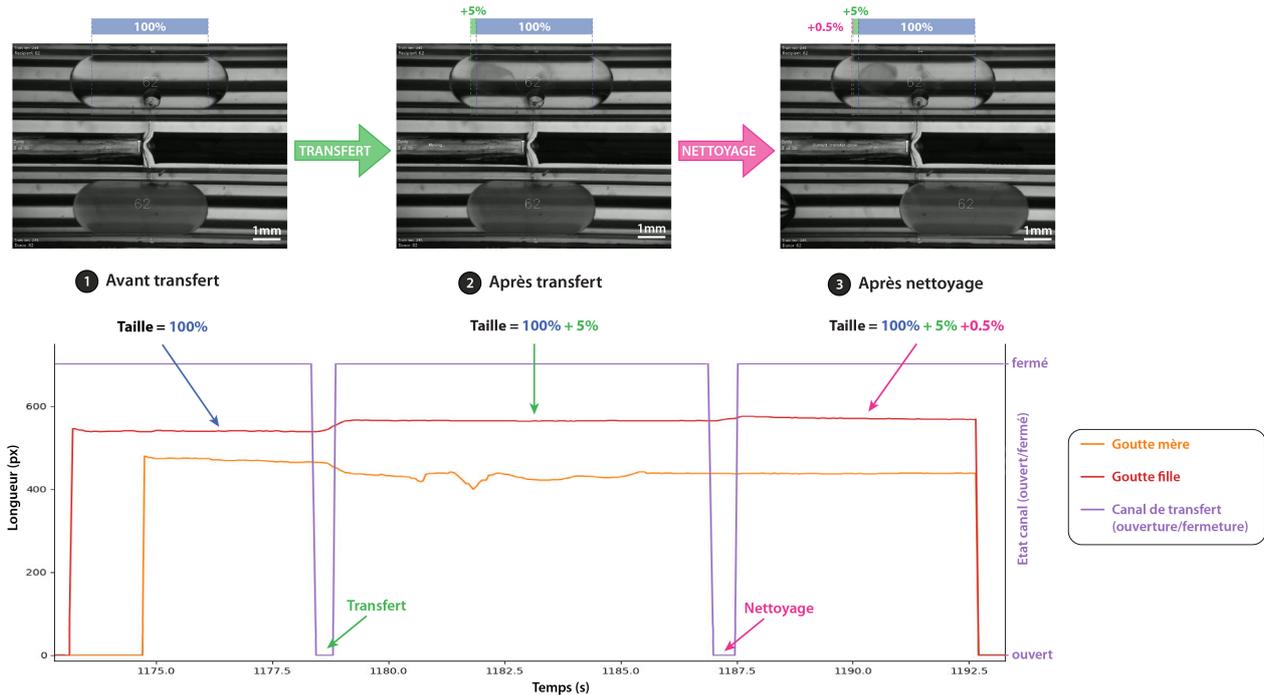


Figure III-13 : Contrôle du volume transféré

Schéma représentant le contrôle du volume durant l'étape de transfert. 1- Une fois les gouttes mère et fille positionnées et stabilisées en face du canal, et avant que ce dernier ne soit ouvert pour procéder au transfert, la taille « initiale » de la goutte fille est enregistrée. 2- Après ouverture du canal, le contenu de la goutte mère commence à être transféré vers la goutte fille grâce à la différence de pression préétablie entre les deux tubes. La taille des gouttes étant mesurée en permanence, le canal est automatiquement fermé lorsque le pourcentage d'augmentation souhaité est atteint (ici 5%). 3- Suite à l'étape de transfert vient l'étape de nettoyage, qui vise à pousser de l'huile au travers du canal pour récupérer le fluide résiduel et qui conduit à une légère augmentation du volume transféré (10% du volume transféré, soit 0.5% ici). Toutes ces données sont enregistrées et permettent d'évaluer de manière automatisée (à l'aide d'un programme informatique développé à cet effet), le volume (l'inoculum) transféré dans chaque goutte. Nous reviendrons sur ces données dans le prochain chapitre (Chapitre IV), lorsque nous aborderons les caractéristiques de la machine d'évolution.

Pendant tout le temps du transfert, le contrôle dynamique des pressions (PID) permet de maintenir les gouttes en position. Une fois le transfert terminé, le canal est fermé, et la goutte mère est décalée de manière à aligner le canal avec la phase continue (Figure III-12-C). Le canal est alors une nouvelle fois ouvert durant un certain temps, afin de permettre son nettoyage par la phase continue et ainsi limiter les contaminations entre transferts (Figure III-12-D).

III.1.B.3. Un module au design spécifique

Par souci de simplicité, nous avons présenté le processus de transfert en considérant uniquement les gouttes, comme si elles étaient seules dans leur tube, sans prendre en compte les bulles d'air. Cependant, en réalité, ces gouttes cibles font partie d'un train, contenant un certain nombre de gouttes séparées par des bulles d'air. Là où l'air ne présentait pas de réelle limitation dans le MDA, et pouvait être utilisé en grande quantité (comme vu en II.2.C.1.3), sa présence est ici source de limites.

Sa compressibilité diminue grandement la réactivité du train à tout changement de pression. En effet, chaque bulle d'air peut être assimilée à un ressort en mécanique (ou une capacité en électronique) qui doit se charger avant de pouvoir transmettre son énergie à la bulle suivante. Or, la réactivité du train

est à la base d'un contrôle rapide et précis de la position des gouttes. Pour maximiser la réactivité du train il est donc impératif de diminuer la taille des séparateurs. Dans le cadre de cette thèse, et bien que la machine soit conçue pour manipuler un millier de gouttes, nous avons également réduit leur nombre à environ deux cent, de manière à augmenter la réactivité du train, et à gagner en temps de transfert. Deux cent gouttes sont suffisantes pour établir une première preuve de concept. Passer au-delà demande un effort de développement technologique supplémentaire, non requis à l'heure actuelle ; l'objectif de cette thèse étant de développer et construire une machine d'évolution, la caractériser, et réaliser une preuve de concept prouvant son fonctionnement, et son habilité à diriger l'évolution de populations microbiennes.

En plus d'être nécessaire pour augmenter la réactivité du train, cette réduction des séparateurs d'air se trouve être essentielle pour effectuer un transfert. La présence de bulles d'air autour des gouttes présente un risque de transfert d'air, lors de l'étape de rinçage du canal, qui ne doit en aucun cas arriver. En effet, l'air étant très peu visqueux, s'il est mis en contact avec le canal durant un transfert, il sera aspiré à très grande vitesse et conduira nécessairement à la division de la goutte fille. Pour s'affranchir de cela, nous mettons à profit l'effet de la gravité, qui, comme nous l'avons vu au Chapitre II (II.2.C.1.1), se fait ressentir à notre échelle. En utilisant des séparateurs d'air suffisamment petit, dans un train relaxé (contenant suffisamment d'huile entre les gouttes), on peut s'assurer que ces derniers ne remplissent pas totalement la section du tube mais plutôt qu'ils « flottent » au-dessus d'un « lit » de phase continue (Figure III-14-A).

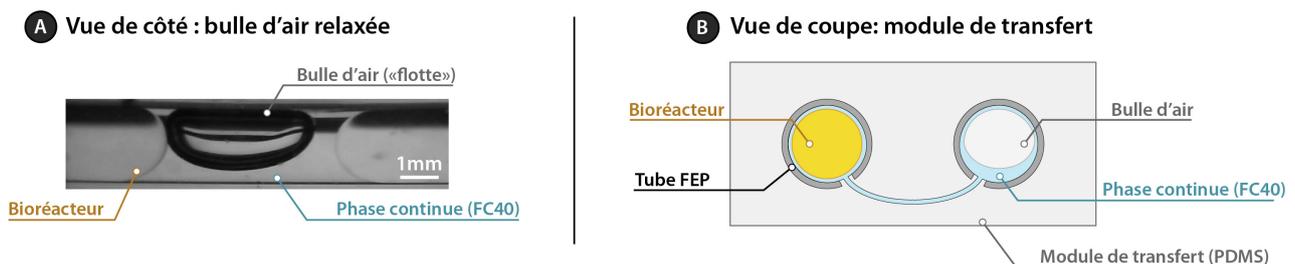


Figure III-14 : Air relaxé et position du canal de transfert

A - Photo d'une bulle d'air relaxée. B – Schématisation du module de transfert vue en coupe dans la longueur du canal de transfert. Cette coupe permet la mise en évidence de la position basse du canal de transfert connectant les deux tubes principaux.

L'utilisation de séparateurs d'air de petite taille a aussi une conséquence majeure sur le design du module de transfert. Elle justifie la position du canal de transfert connectant les deux tubes, qui se trouve en position basse plutôt que centrée, de manière à défavoriser autant que possible le transfert d'air (Figure III-14-B).

Bien que simple dans son concept, ce module n'en est pas moins complexe dans sa réalisation. Si la vanne est mal réalisée, son actionnement peut conduire à des fuites dans le module. Si les trous sont mal effectués, ils vont créer des contaminations conséquentes entre les gouttes au sein d'un même tube. Si le canal est mal situé, il va conduire au transfert d'air, non souhaité. Nous ne fournirons pas ici une liste exhaustive de tous les paramètres à prendre en compte, mais nous souhaitons donner au lecteur un aperçu de la complexité sous-jacente la réalisation de ce module. Réaliser une telle structure en trois dimensions, en un seul bloc, en assurant étanchéité, fonctionnalité de la vanne et précision des dimensions, relève d'un processus très complexe. Aujourd'hui, la fabrication de ces modules est faite à la main, et demande plusieurs jours de travail manuel de haute précision. Ce processus repose sur un

réel savoir-faire dont nous ne sommes que deux à avoir la maîtrise car il demande un contrôle parfait des gestes à exécuter, qui ne s'acquiert que par la pratique et l'expérience. Pour s'affranchir de cela, et également améliorer les caractéristiques de ce module (qui seront discutées au Chapitre IV), nous travaillons, en parallèle, à développer une méthode industrielle pour réaliser ces modules de manière reproductible. Mais la route reste encore longue, car il est difficile de développer une solution industrielle intégrant toutes nos exigences, avec un matériau transparent, super-hydrophobe et biocompatible.

III.1.C. Conclusion

Cette première partie nous a permis de voir comment ce module, au cœur de la machine d'évolution, permet la sélection et la propagation des populations cultivées. Nous avons vu que bien que le concept de ce module soit simple, la réalisation en est très complexe, et demande un niveau de robustesse, de précision et de fiabilité sans précédent. A force de persévérance et de travail sur plus de trois ans, nous sommes parvenus à développer un module d'un tel niveau d'exigence. Ses performances ne sont ici pas abordées, mais elles le seront dans le prochain chapitre (Chapitre IV), quand nous traiterons des caractéristiques de l'instrument développé au cours de cette thèse, dans son ensemble.

Désormais, nous avons un mécanisme permettant d'instaurer une démographie au niveau des populations, avec ou sans sélection artificielle, et reposant sur l'échantillonnage aléatoire d'individus d'une population mère pour fonder une population fille. Cependant, ce module, bien qu'au cœur de la technologie, ne suffit pas, à lui seul, à réaliser des cycles d'évolution. La réalisation de cycles est possible par la mise en œuvre de plusieurs fonctions (toutes automatisées) autour de ce module, que nous souhaitons à présent aborder.

III.2. Automatisation des cycles d'évolution

Grace au module de transfert, nous venons de montrer qu'il était possible de sélectionner, et de propager des populations microbiennes. Cependant, l'utilisation unique d'un tel module n'est pas suffisante pour réaliser des cycles d'évolution. En effet, la technologie doit être en mesure de générer des trains, de les incuber, de les analyser, de les transférer, de les évacuer, et de nettoyer le système, le tout de manière automatisée. La réalisation de cycles d'évolution repose donc sur la mise en place d'une routine autour du module de transfert. Cette routine est conduite par un ensemble de modules, développés au cours de ces trois dernières années pour assurer une automatisation sans faille, et permettre la réalisation d'expériences sur du long terme (plusieurs semaines, voire plusieurs mois).

Dans cette partie, une vue d'ensemble sur la technologie d'évolution sera premièrement donnée, afin de comprendre son fonctionnement, de saisir l'enjeu de son automatisation et d'en évaluer sa complexité. Elle permettra également de mieux appréhender la présentation des différents modules employés dans cette technologie.

III.2.A. Réalisation de cycles d'évolution : une vue d'ensemble sur la technologie

III.2.A.1. Fonctionnement général de la machine d'évolution

Afin de permettre au lecteur d'acquiescer une bonne compréhension du fonctionnement général de la machine d'évolution, les différentes étapes d'un cycle d'évolution sont représentées Figure III-15, et accompagnées d'une description détaillée.

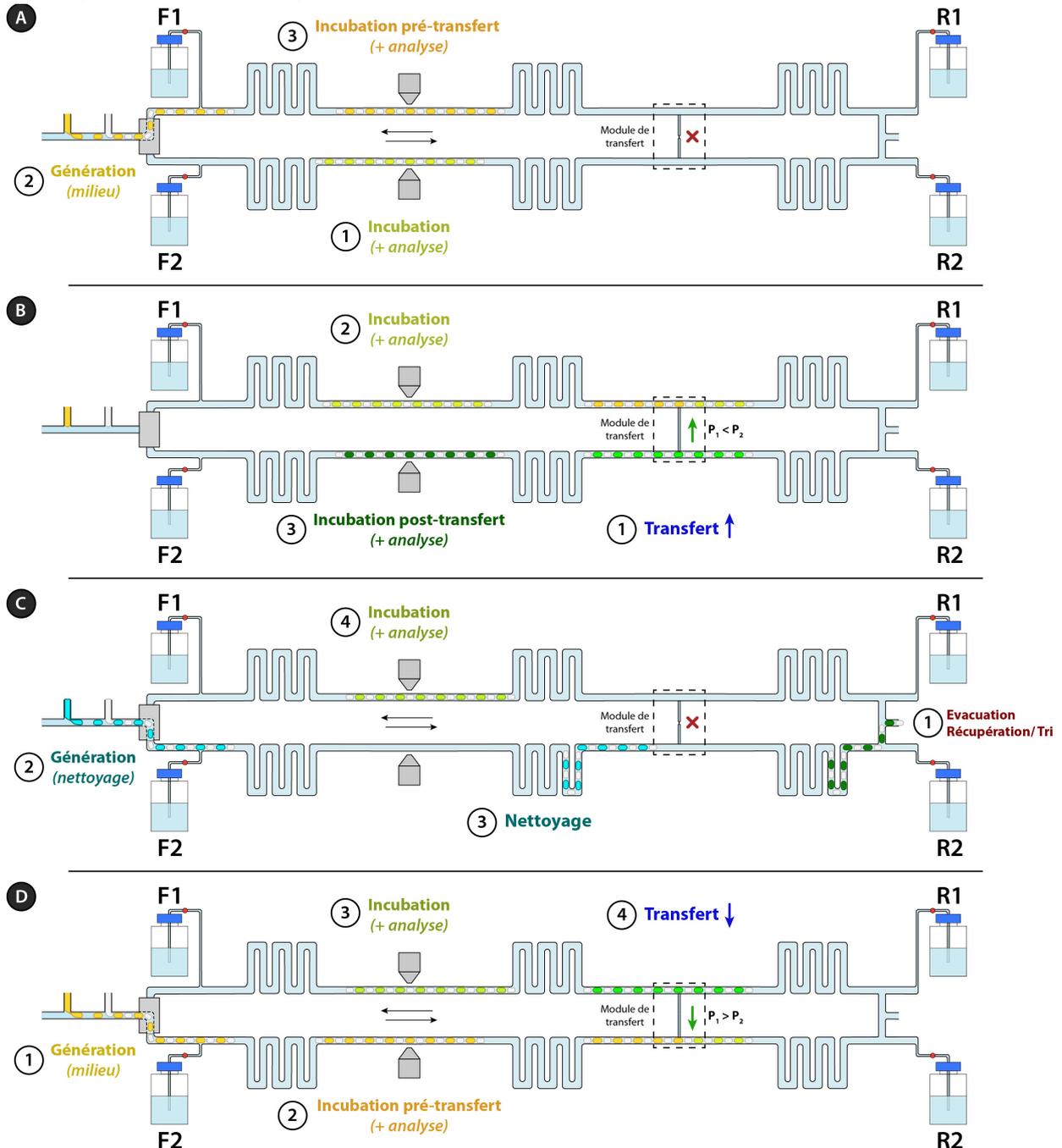


Figure III-15 : Machine d'évolution – Fonctionnement général

Ce schéma représente la routine mise en œuvre dans la machine d'évolution pour conduire des cycles d'évolution. La réalisation de cette routine passe par l'automatisation de fonctions principales que sont : la génération, l'incubation, le transfert, le nivellement, l'évacuation, toutes réalisées grâce à un ensemble de modules permettant d'acquiescer, de monitorer, de sauvegarder et de traiter l'ensemble des informations pertinentes en continu. Une description de chacune de ces fonctions, et des modules sous-jacents, sera donnée dans la suite de ce chapitre. Photo de la MEM en Annexe III.

Dans la machine d'évolution, comme dans le MDA, la première étape vise à charger les populations microbiennes dans l'instrument, en générant un train de gouttes à partir d'une plaque multi-puits (à l'aide du sipper, présenté en II.2.C.2). Elle constitue l'unique étape externe à la machine et qui requiert l'intervention d'un expérimentateur, car, une fois le premier train chargé, le but est qu'elle réalise les cycles d'évolution de manière autonome. Après chargement du train, la machine réalise son incubation (A-1 : incubation), en lui imposant un mouvement de va-et-vient en face du module d'analyse. Cette étape est nécessaire afin de permettre aux populations microbiennes qu'il contient de croître, mais également afin de conduire leur analyse. C'est sur cette dernière que pourra être appliqué un critère de sélection, qui, au moment du transfert, permettra de ne propager que les populations y répondant. En parallèle, et avant que l'incubation de ce premier train arrive à son terme, un train de milieu de culture frais est automatiquement généré (A-2 : génération - milieu) dans l'autre tube (grâce au module de génération inclus dans la machine, qui sera présenté en III.2.B). Ce train connaît alors, lui aussi, une phase d'incubation (A-3 : incubation pré-trans.), appelée incubation « pré-transfert » (car elle est réalisée avant le transfert). Elle vise à acquérir le signal du train avant le transfert. Lorsque les deux incubations sont terminées, la machine passe à l'étape de transfert (B-1 : transfert). Elle amène alors les deux trains au module de transfert, puis procède à la propagation des populations répondant au critère de sélection, comme décrit précédemment (III.1.B.2). Une fois l'étape de transfert terminée, les deux trains repartent en incubation : le train receveur pour conduire la culture et l'analyse des populations fraîchement inoculées (B-2 : incubation), l'ancien train donneur pour compléter l'acquisition des données après transfert (B-3 : incubation pst-trans.), on appelle cette étape l'incubation « post-transfert ». Lorsque cette dernière arrive à son terme, l'ancien train donneur doit être évacué de la machine pour permettre la continuation du cycle (C-1 : évacuation). Il est alors envoyé à la poubelle, où récupéré et trié à l'aide du sorter (module présenté en II.2.E). Suite à cette succession d'étapes, les niveaux d'huile au sein des réservoirs ne sont plus les mêmes qu'en début de cycle. Avant de procéder à la génération d'un nouveau train il faut donc s'assurer de les remettre dans leur état initial, pour que les réservoirs ne se retrouvent pas vides ou pleins. La machine procède alors au nivellement des réservoirs d'huile. Après cette étape, et avant qu'un nouveau train de milieu de culture frais soit généré (pour propagation des échantillons), il est préférable de nettoyer le système fluidique, pour éviter toute contamination entre les cycles. Pour cela, un train de nettoyage est généré dans ce tube (C-2 : génération - nettoyage), et transporté jusqu'au bout du circuit fluidique (C-3 : nettoyage), où il est évacué (C-1 : évacuation). Cette évacuation, comme la précédente, est ensuite suivie d'une étape de nivellement d'huile, requise avant la prochaine génération. Le tube est alors prêt à recevoir un train de milieu de culture frais, pour propagation des populations microbiennes dans la direction opposée. Pendant tout ce temps, le train inoculé lors du transfert continue son incubation (C-4 : incubation) et permet aux populations microbiennes qu'il contient de croître. Peu avant que l'incubation de ce dernier ne se termine, un train de milieu de culture frais est généré dans le tube libre (D-1 : génération - milieu), puis maintenu en incubation pré-transfert (D-2 : incubation pré-trans.) jusqu'à la fin de l'incubation du train inoculé (D-3 : incubation). Une fois celle-ci terminée, les deux trains partent pour le transfert (D-4 : transfert), qui sera cette fois ci effectué dans l'autre direction, et le cycle continue.

Cet ensemble de fonctions réalisées par la machine dans une séquence bien précise, constitue la routine permettant la réalisation de cycles d'évolution (Figure III-16).

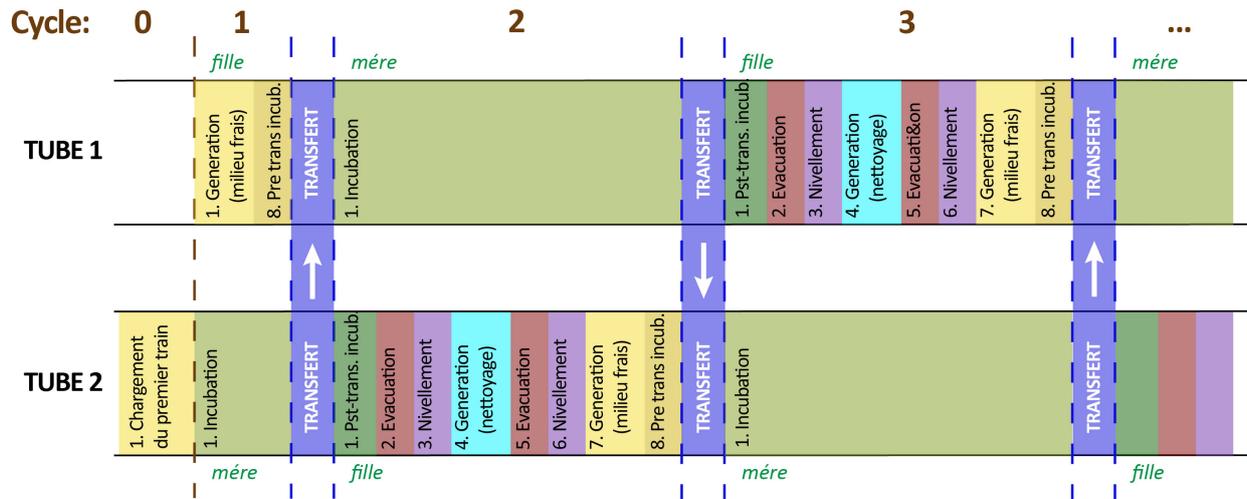


Figure III-16 : Routine des cycles d'évolution

Ce schéma présente l'ensemble des fonctions automatiquement réalisées par la machine d'évolution dans chacun des tubes au cours du temps.

L'automatisation de cette routine passe par l'emploi d'un logiciel, conçu et développé au cours de cette thèse, et permettant le contrôle des différents modules mis en œuvre dans la technologie. Aucune part ne peut être laissée au hasard dans l'automatisation de cette technologie pour qu'elle fonctionne, et c'est pourquoi de nombreuses précautions sont prises pour assurer robustesse et fiabilité sur un fonctionnement autonome sur des semaines, voire des mois d'expérience.

III.2.A.2. Sécurité pour l'automatisation

Dans ce paragraphe, nous souhaitons présenter comment l'automatisation est rendue fiable et robuste dans la machine d'évolution. Ceci passe par deux types de sécurité : la détection des gouttes à des positions stratégiques, et la mesure des niveaux d'huile en continue.

III.2.A.2.1. Modules de détection de gouttes

La détection, à la base du fonctionnement du module de transfert, se trouve également être primordiale pour le fonctionnement général de la machine d'évolution. Nous avons vu précédemment comment, dans un tube exposé à l'air, la détection, l'identification et le suivi des gouttes pouvait être réalisé par la méthode de la ligne de détection (III.1.B.2.1). Bien qu'elle ne soit pas applicable dans le module de transfert, cette méthode reste utile dans la technologie d'évolution. Elle est mise en œuvre à de nombreuses positions stratégiques dans la machine d'évolution, de manière à pouvoir localiser le train au cours des différentes étapes du cycle, et le manipuler en conséquence (Figure III-17).

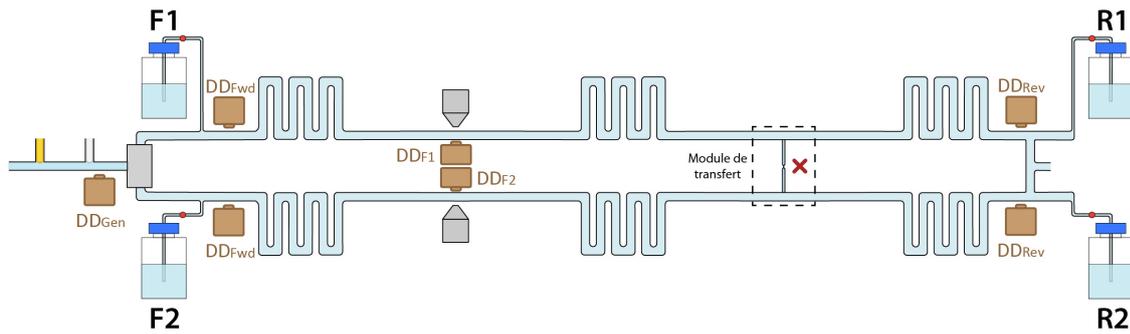


Figure III-17 : Répartition des modules de détection de gouttes

Ce schéma présente le positionnement stratégique des différents détecteurs de gouttes utilisés pour assurer l'automatisation de la machine d'évolution.

Le premier détecteur employé, nommé « DD_Gen », est celui de la génération. Il permet de compter le nombre de gouttes formées au cours de la génération afin d'en contrôler précisément le nombre. Le détecteur placé au début du tube principal, « DD_Fwd », permet de savoir quand le train généré est entré dans la machine, pour isoler le module de génération (par fermeture de la vanne rotative, voir III.2.B.4), et débiter l'incubation. Une fois le train ayant passé ce détecteur, il sert aussi de sécurité pour s'assurer que le train de revienne jamais en amont de ce dernier et n'aille dans un des réservoirs Fwd. Le détecteur placé à la fin du tube, « DD_Rev », est employé pour détecter le train lors de son évacuation de la machine, que ce soit pour être jeté à la poubelle, ou récupéré et trié. En d'autres circonstances, il sert, au même titre que le détecteur « DD_Fwd » placé en amont du système, de sécurité pour s'assurer que le train n'aille jamais en aval du détecteur et ne finisse dans un des réservoirs Rev (R1 et R2). Enfin, les derniers détecteurs, « DD_F1 » et « DD_F2 » sont employés pour effectuer la détection des gouttes durant l'incubation, pour leur analyse, mais également pour leur manipulation. Nous reviendrons sur ces détecteurs en particulier dans la suite de cette partie (III.2.C.1).

La détection à ces différentes positions est réalisée grâce à des modules optiques similaires à celui développé pour le module de transfert. Ne nécessitant pas un grand champ de vision, ces modules sont néanmoins beaucoup plus compacts, et peuvent de plus être utilisés pour effectuer la détection sur deux tubes à la fois (Figure III-18).

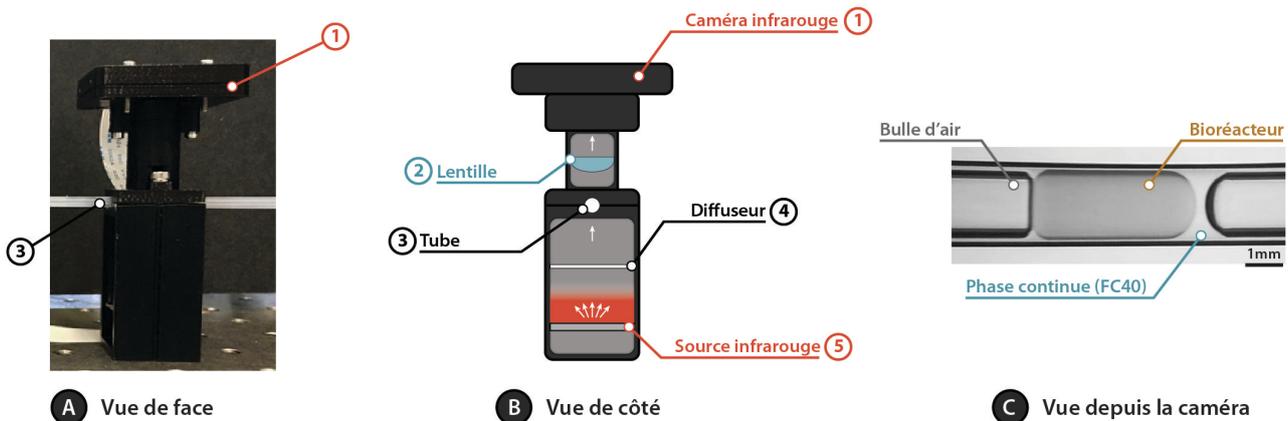


Figure III-18 : Détecteur de gouttes

A- Photo d'un détecteur de goutte, vue de face. B- Schéma détaillé d'un détecteur de goutte, vue de côté. C- Photo prise depuis la caméra.

Plus que nécessaire dans le module de transfert, la détection est au cœur de notre machine d'évolution et de son automatisation. Une attention toute particulière a été portée à cette détection durant ma thèse, pour la rendre fiable et robuste. Mais, pour s'assurer de la fiabilité de l'automatisation, et ce même en cas de défaillance d'un des détecteurs, un niveau de sécurité supplémentaire a également été instauré dans la machine d'évolution, et repose sur le contrôle des niveaux d'huile dans les réservoirs en temps réel.

III.2.A.2.2. Mesure du niveau d'huile et nivellement

Chacun des réservoirs contient une quantité d'huile initiale, qui va fluctuer au cours du temps, suite à la manipulation du train. A la génération, le système gagne de l'huile, mais à l'évacuation du train, il en perd, et de ceci peut résulter un changement de quantité d'huile dans le système. Le niveau d'huile dans les réservoirs n'étant pas fixe au cours du temps, il est nécessaire, après chaque évacuation d'un train, de remettre à niveau chacun des réservoirs avant la prochaine génération. Pour ce faire, des modules permettant de détecter les niveaux d'huile dans nos bouteilles ont été développés afin de pouvoir les monitorer en temps réel.

Ce niveau d'huile est également utilisé en tant que détecteur. En effet, le niveau d'huile donne une indication de l'endroit où se trouve le train au cours du temps. Certains niveaux seuils sont ainsi établis pour s'assurer que, durant l'incubation, le train reste dans la zone définie, en cas de non fonctionnement d'un des détecteurs de gouttes, par exemple. De même, ces détecteurs de niveau permettent d'instaurer des sécurités globales, et de s'assurer que les bouteilles ne soient jamais trop vides ou trop pleines, en cas d'erreur de fonctionnement dans la machine.

Le rôle de toutes ces sécurités est d'assurer, en premier lieu, le fonctionnement autonome de la machine sur du long terme, et d'autre part d'éviter que toute erreur de fonctionnement n'engendre de dommages matériels.

Le fonctionnement général de la machine désormais explicité, nous souhaitons à présent présenter comment les trains sont automatiquement générés dans la machine d'évolution.

III.2.B. Génération automatisée d'un train de gouttes

La génération est une des fonctions primordiales de cette technologie. Présente deux fois par cycle (pour le train de milieu frais, puis le train de nettoyage), elle se doit d'être robuste pour un fonctionnement pérenne de la machine d'évolution.

Comme nous l'avons vu précédemment, pour charger un premier train de gouttes contenant une diversité de microorganismes dans la machine, il est nécessaire de passer par une étape externe, avec l'utilisation d'une plaque multi-puits et du « sipper » (bras robotisé présenté en II.2.C.2). Cependant, une fois les échantillons biologiques chargés dans l'instrument, des trains de milieu de culture frais (permettant la propagation des échantillons issus de la sélection), ou des trains de nettoyage (assurant la propreté du tube entre cycles) doivent être automatiquement générés. Contrairement au premier train généré par le sipper, ces trains sont toujours identiques et ne demandent pas de générer

de la diversité inter-gouttes. La monodispersité y est par contre plus importante, et c'est pourquoi des jonctions en T sont ici utilisées.

III.2.B.1. Jonction en T

Dans une jonction en T, la phase dispersée (phase aqueuse) est poussée perpendiculairement à la phase continue (l'huile). A la jonction entre les deux canaux, la compétition entre forces de cisaillement et tension de surface conduisent à l'émulsification de la phase dispersée en gouttes. Dans notre cas, le nombre capillaire étant faible ($C_a = 3,3 \cdot 10^{-4} \ll 1$), les gouttes sont formées par obstruction de la jonction. Ce mode, appelé « régime de compression » (ou « squeezing regime » en anglais), est représenté par la Figure III-19.

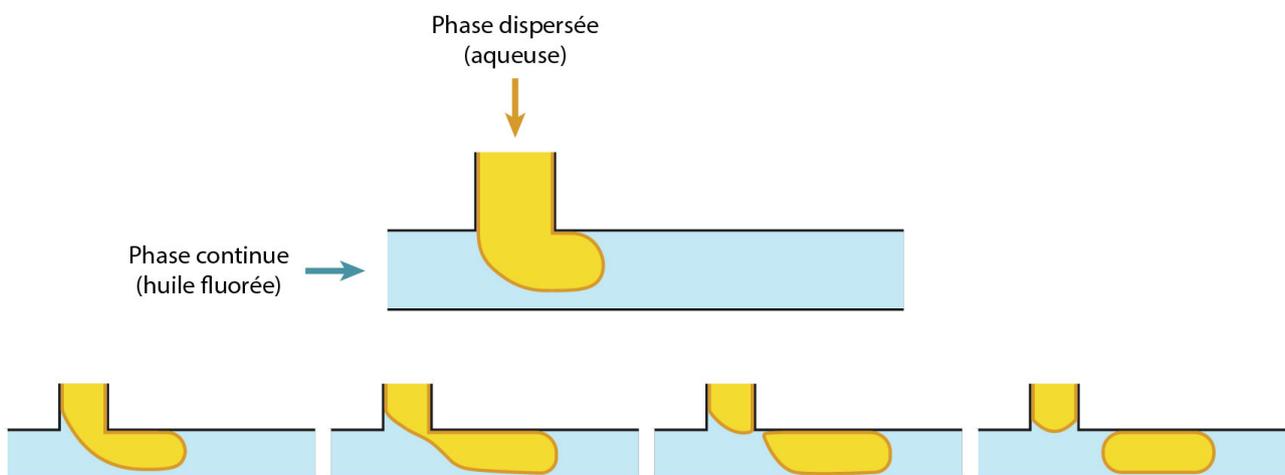


Figure III-19 : Génération en régime de compression dans une jonction en T

Schéma présentant la génération de gouttes micro ou millifluidiques dans une jonction en T, en régime de compression (souvent nommé « squeezing regime », de l'anglais).

Les gouttes, confinées par les parois du canal, obstruent la jonction au fur et à mesure de leur formation, réduisant ainsi le flux de phase continue pouvant s'écouler dans le canal. Or, les débits des phases continues et dispersées étant maintenus constants, cela conduit à une augmentation de la pression en amont de la goutte en formation. Lorsque cette pression dépasse la pression à l'intérieur de la goutte en formation, l'interface est « comprimée » jusqu'à formation d'une goutte. En jouant sur la géométrie de la jonction et sur les débits employés, il est alors possible de conditionner la taille des gouttes générées.

Ce dispositif est parfaitement adapté à la génération automatisée des bioréacteurs dans notre technologie car elle permet à la fois d'assurer la monodispersité, et de contrôler la taille des gouttes. Cependant, un train de gouttes se compose également de séparateurs d'air, et une simple jonction en T ne permet pas de créer ce genre de structure triphasique. Les jonctions en T présentent néanmoins l'avantage de pouvoir être combinées, et ainsi permettre la génération de structures plus complexes. C'est donc la solution que nous avons choisi de mettre en œuvre dans notre technologie.

III.2.B.2. Jonction en croix

La première solution choisie pour générer des trains triphasiques a été d'utiliser une jonction en croix, car elles présentent l'avantage d'être disponibles sur le marché. Cette jonction peut en fait être considérée comme une superposition de deux jonctions en T au même endroit (Figure III-20).

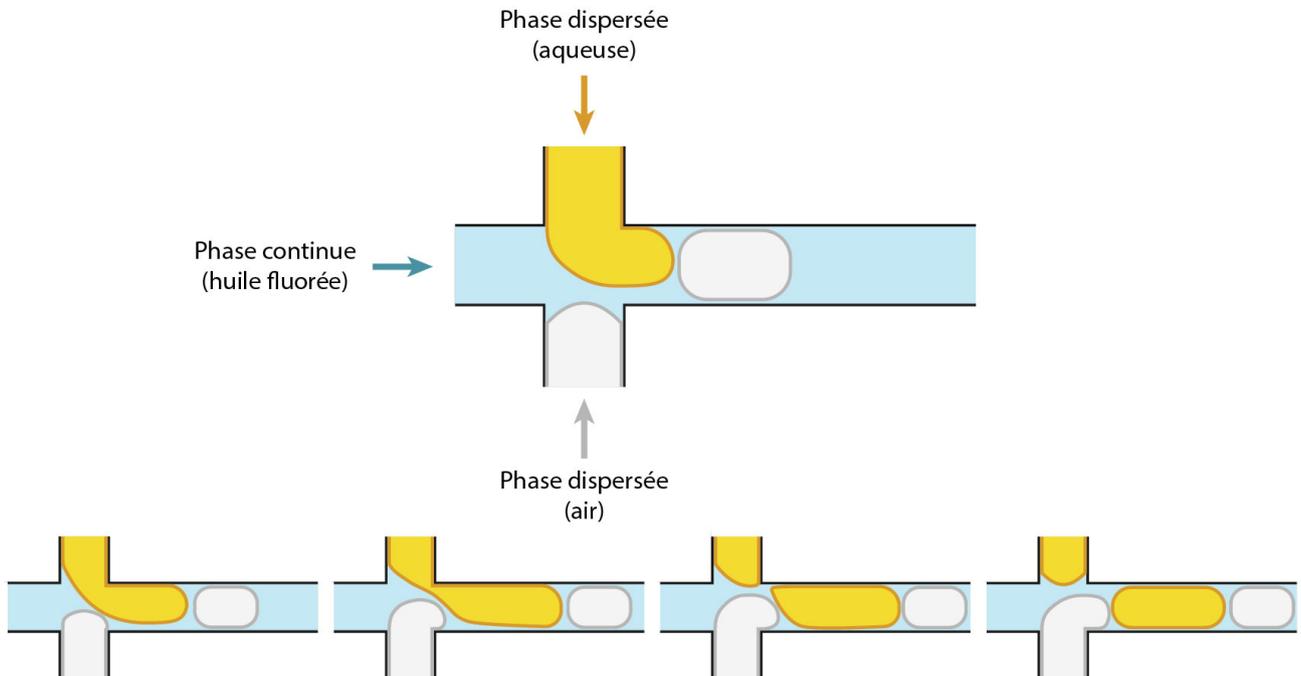


Figure III-20 : Jonction en croix

Schéma présentant la génération d'un train de gouttes triphasique, composé de deux phases dispersées : les gouttes de phase aqueuse et les séparateurs d'air, le tout porté par la phase continue : de l'huile fluorée (FC40), grâce à une jonction en croix.

Dans cette jonction, chaque canal est porteur d'une des trois phases : le canal principal impose un débit constant de phase continue (l'huile fluorée), tandis que les deux canaux transversaux amènent les phases dispersées à débit constant (la phase aqueuse et l'air). A l'intersection des trois canaux, le même phénomène de « squeezing » que dans une jonction simple va pousser les phases dispersées à être émulsifiées sous forme de gouttes, ou de bulles, qui vont alors être alternées.

Une fois la géométrie fixée, c'est le contrôle des débits qui est au cœur de la génération des gouttes. Or, dans notre technologie, tous les fluides sont manipulés par pression, à l'aide de contrôleurs de pression (Elveflow® ou Fluigent®), et non pas par débit. Cependant, nous savons que le débit est relié à la pression par l'Équation II-1 (b) rappelée ici :

$$\Delta P = Q \times R_h \Leftrightarrow Q = \frac{\Delta P}{R_h}$$

Ainsi, afin d'imposer et de maintenir un débit constant sur chacune des phases lors de la génération, il faut s'assurer que toute fluctuation de pression, issue de la génération du train, ou du contrôleur, ne vienne pas perturber le débit. En effet, nous savons que, durant la formation d'un train de gouttes, la pression hydrostatique varie au niveau de la jonction. Mais le débit dépend aussi de la résistance hydraulique, et, à mesure que le train est formé, la résistance en aval du module de génération

varie également. Pour s'assurer que ces variations soient négligeables et ne viennent pas perturber les débits entrants, la solution est d'employer de fortes résistances dans chacun des canaux (Figure III-21).

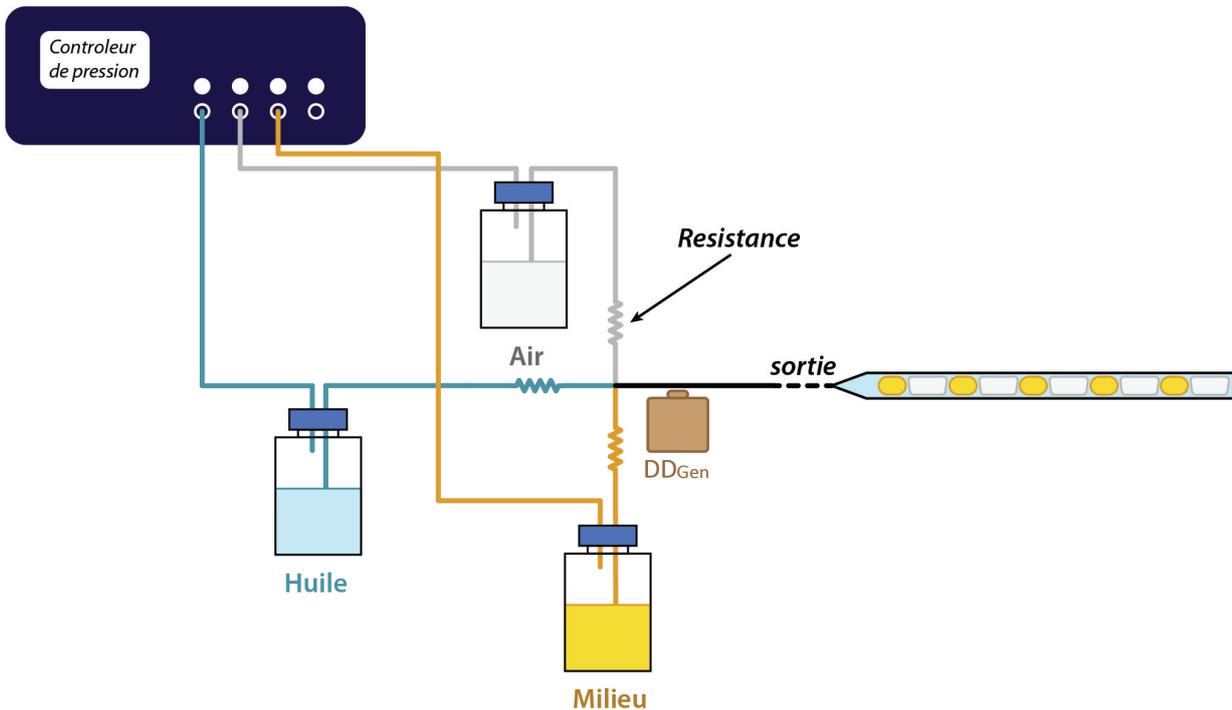


Figure III-21 : Schématisation du module de génération en croix

Schéma représentant, de manière simplifiée, le système fluide mis en œuvre dans le module de génération. Le moyen d'imposer de fortes résistances dans la technologie millifluidique est d'employer des tubes de très petit diamètre (ex : $100\mu\text{m}$). En effet nous avons vu au Chapitre II (Équation II-2) que la résistance hydraulique dépend principalement du rayon du canal (qui présente un exposant 4), et il est donc facile de jouer sur cette valeur.

Dans notre système, nos pressions étant limitées à $3 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ (soit 3Bar) et les résistances utilisées étant plutôt fortes (pour compenser la résistance de l'ensemble du système), la génération des gouttes est plutôt lente (3 à 8 secondes par gouttes). Cette fréquence de génération ($f = 125 \cdot 10^{-3} - 330 \cdot 10^{-3} \text{ Hz}$) peut paraître faible par rapport aux fréquences de génération en microfluidique (jusqu'à $\sim 2\text{kHz}$), mais ne représente pas une limite pour nous. En effet, au cours d'un cycle, nous avons suffisamment de temps pour générer les 200 gouttes souhaitées : seulement 30 min sont nécessaires, tandis que l'incubation dure plusieurs heures.

Ce système de jonction en croix, permettant la génération de trains triphasiques monodisperses, a été longuement utilisé pour générer des trains de gouttes d'eau dans la phase de conception et développement de la machine. Cependant, il s'est avéré présenter des limitations lors du passage au milieu de culture. Des problèmes de mouillage sont alors apparus, à cause des mauvaises propriétés de surface des croix utilisées (mauvaise hydrophobicité), conduisant à des problèmes d'instabilité à la génération des trains. De plus, les jonctions en croix ne présentent pas la possibilité de pouvoir contrôler la taille des gouttes et des bulles indépendamment. Or, les trains que nous souhaitons générer présentent une géométrie bien particulière : des gouttes d'une vingtaine de microlitres, des bulles de plus petit diamètre que celui du tube, et suffisamment d'huile pour que le train ne soit pas compact. Un module de génération nouveau, répondant à tous nos critères a alors été imaginé et développé au cours de ma thèse.

III.2.B.3. Double jonction en T en parallèle

Pour être en mesure de contrôler indépendamment la taille des gouttes et des bulles d'air, une double jonction en T en parallèle peut être utilisée (Figure III-22).

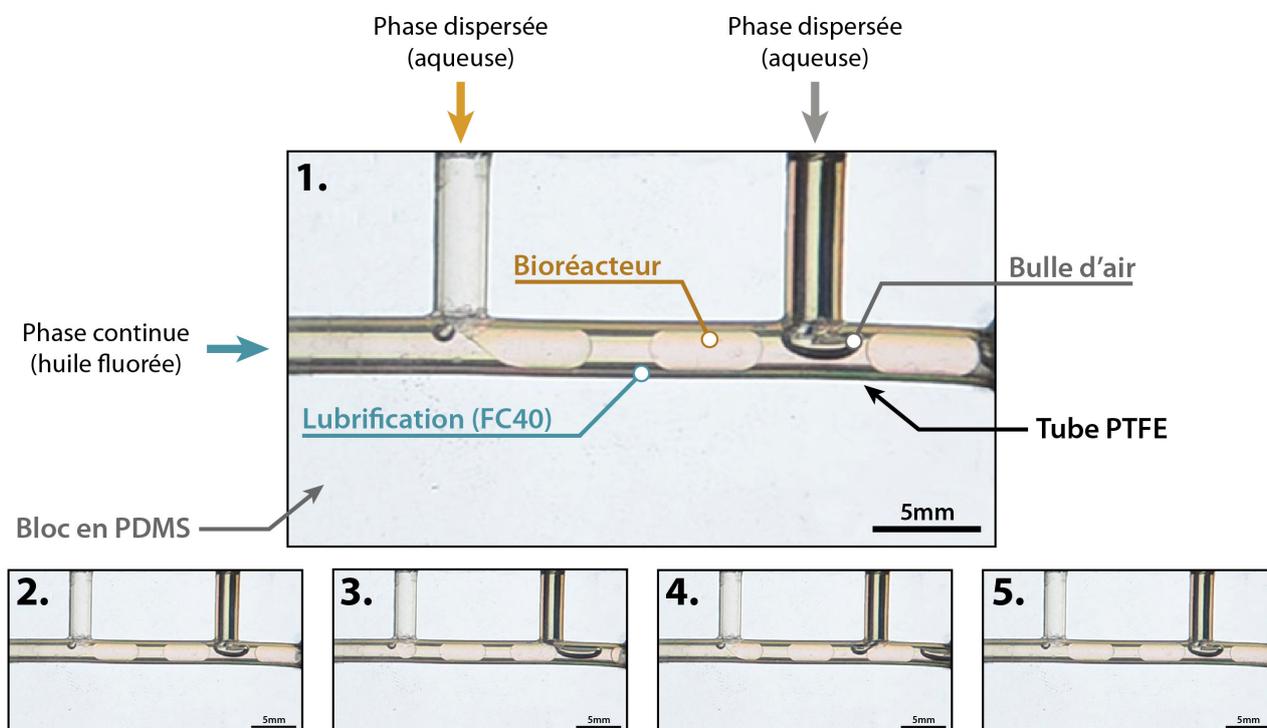


Figure III-22 : Double jonction en T en parallèle

Photos du module de génération imaginé et développé au cours de ma thèse pour pouvoir contrôler la géométrie des trains de gouttes triphasique générés. En découplant la génération des gouttes de celle des bulles d'air (par l'utilisation de deux jonctions en T en parallèle), ce module permet de conserver le régime « squeezing » pour la formation des gouttes, tout en permettant de jouer sur la taille des poches (la quantité d'huile entre deux gouttes), et en venant ajuster la taille des séparateurs d'air.

Dans cette jonction, la génération des gouttes et des bulles est découplée. La première jonction en T permet la génération des gouttes de phase aqueuse, tout en maintenant le régime « squeezing » de manière à ce que les gouttes restent confinées. De plus, le contrôle indépendant de chacun des débits permet la maîtrise de la taille des poches d'huiles générées entre les gouttes. La seconde jonction permet alors de venir ajuster, à postériori, la quantité d'air à ajouter entre les gouttes.

Ce module est réalisé en utilisant trois tubes millifluidiques. Le premier ($d=2,3\text{mm}$), possède deux trous de diamètre $d_i=1,5\text{mm}$ à une distance de 1cm, et sert de canal principal. Ici, et contrairement aux trous réalisés dans les tubes du module de transfert, la précision requise est bien moindre, car il ne peut y avoir de contamination entre gouttes à cette étape, les gouttes étant toutes de même phase et ne contenant pas encore de microorganismes. Les deux autres tubes ($d=2,15\text{mm}$) lui sont connectés orthogonalement et permettent l'apport des phases dispersées. Le tout est maintenu grâce à un bloc de PDMS, conçu sur mesure, de manière à assurer l'étanchéité. Toutes ces dimensions ont été choisies pour favoriser la génération de grosses gouttes, de bulles d'air non confinées et de grandes poches d'huile, en diminuant les forces de cisaillement s'exerçant aux intersections.

Ce module, de notre conception, permet donc de générer la structure de train souhaitée avec précision. Il permet également de résoudre le problème de mouillage que nous avons avec les pièces

commerciales. Le canal principal de ce module est réalisé avec un tube millifluidique en PTFE, afin d'assurer la super-hydrophobicité nécessaire à l'utilisation de milieu de culture.

Pour une meilleure reproductibilité lors de la génération des trains, ce module de génération est isolé dans une enceinte à température contrôlée (autour de 15°C). Aussi, afin de générer des trains identiques dans les deux tubes, un unique module de génération est employé et les trains sont ensuite aiguillés dans le tube souhaité grâce à une vanne rotative.

III.2.B.4. Aiguillage des trains

Manipuler des fluides monophasiques à l'aide de vannes est aisé. Mais, ici, nous travaillons avec un fluide triphasique, dont la structure est capitale, et il faut donc s'assurer que son passage au travers d'une vanne ne vienne pas la modifier. Deux types de vannes ont alors été mises en œuvre (Figure III-23).

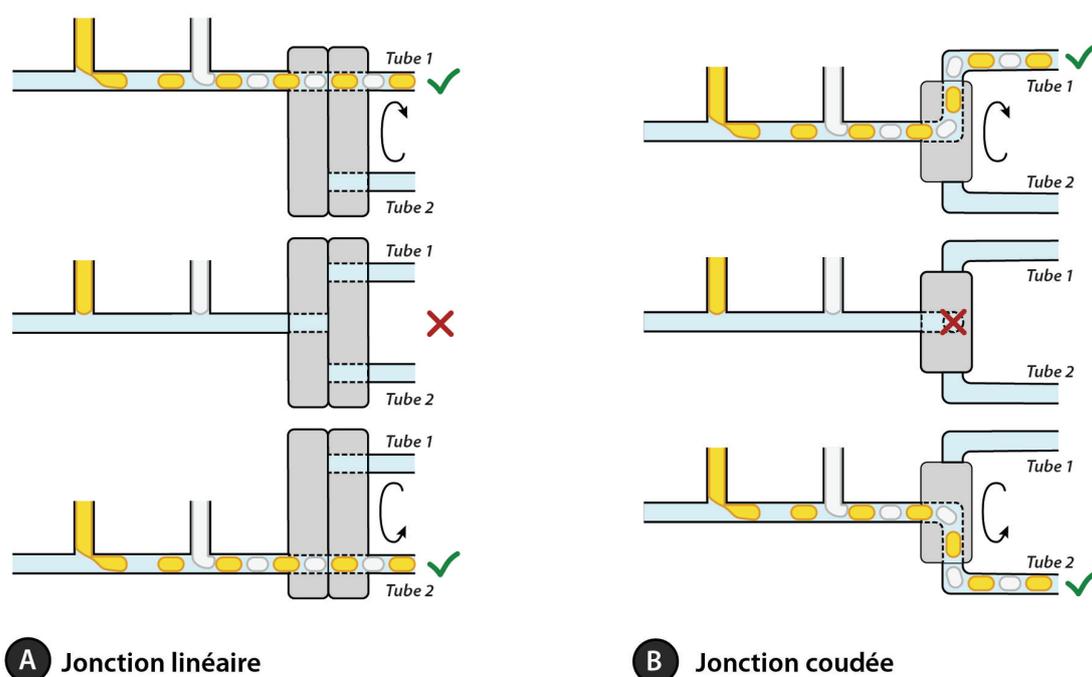


Figure III-23 : Vannes rotatives – aiguillage des trains

Ce schéma présente le fonctionnement des vannes rotatives utilisées, permettant l'aiguillage de nos trains de gouttes tout en conservant leur structure. A- La première permet d'aligner le tube de la génération au tube voulu tout en conservant une connexion linéaire, et représente la solution idéale en termes de manipulation et d'aiguillage de train. Cependant, elle requiert le mouvement du tube de génération, qui peut causer son endommagement. B- La seconde permet d'aligner le tube de la génération au tube voulu à l'aide d'une jonction coudée. Elle ne nécessite donc plus le mouvement du tube, mais la « non linéarité » du chemin fluide entraîne parfois un endommagement de la géométrie des trains générés, avec possibilité de coupure de gouttes, ou de coalescence, induisant des variations dans la taille des bioréacteurs.

Dans un premier temps, ne trouvant pas de produit commercial répondant à nos exigences, un prototype de vanne a été conçu et développé au cours de ma thèse pour permettre une connexion linéaire entre les deux tubes (Figure III-23-A), sans changement de géométrie (diamètre de tuyau identique), et avec un matériau super hydrophobe et biocompatible (PEEK). Automatisée avec un moteur et un détecteur de position, cette dernière répondait à nos attentes en termes d'aiguillage du train. Cependant, elle présentait également des risques d'endommagement de la machine, en cas de

mauvais fonctionnement d'un des composants (car nécessitant la mise en mouvement du tube de la génération). Nous sommes alors passés au second type de vanne (Figure III-23-B), un modèle commercial, plus robuste sur cet aspect-là (les tubes restants immobiles). Ce modèle permet également une connexion entre les tubes avec un matériau super-hydrophobe et biocompatible (PTFE), sans changement diamètre, mais présente une connexion non linéaire, due à l'utilisation d'un coude. Actuellement, et bien que ce coude affecte parfois la géométrie des trains générés, elle reste la solution employée dans la machine d'évolution, car elle est plus fiable qu'un prototype, réalisé à la main. A terme, il serait judicieux de faire industrialiser un modèle sur mesure, similaire au prototype développé au cours de ma thèse.

Maintenant capable de générer des trains dans le tube voulu et en contrôlant la quantité des trois phases le composant, nous souhaitons présenter plus en détail les deux types de trains que nous utilisons dans la machine d'évolution.

III.2.B.5. Modes de génération : train de nettoyage et train de culture

Durant la réalisation de cycles d'évolution, la machine doit pouvoir alterner la génération de trains de milieu de culture, et de trains de nettoyage. Quel que soit le type de train généré au sein de la machine, sa composition peut être divisée en trois parties : la partie avant, le corps du train, et la partie arrière (Figure III-24).

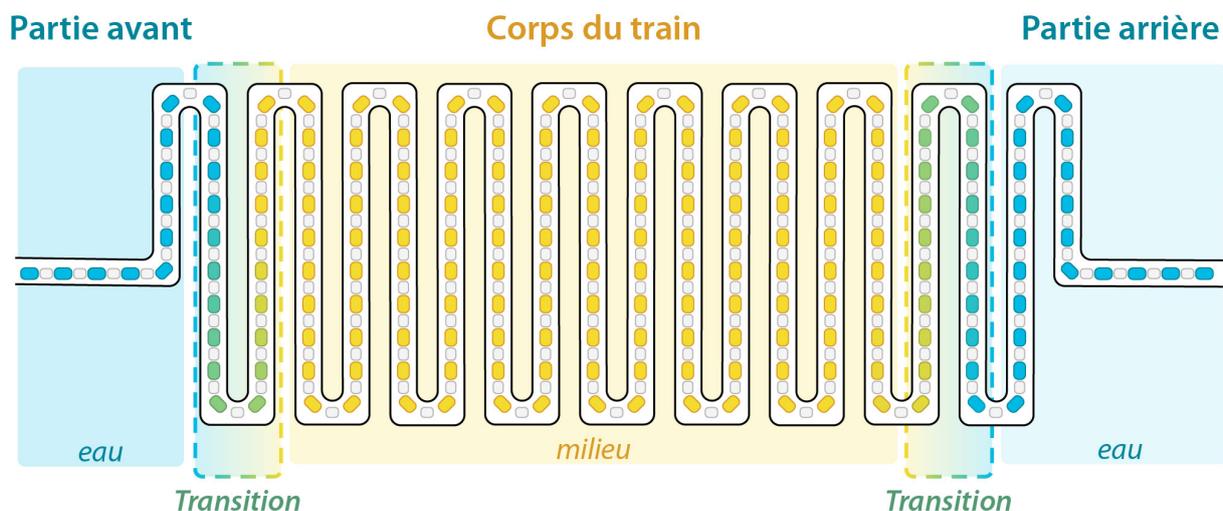


Figure III-24 : Composition d'un train de gouttes

Ce schéma représente la composition d'un train de deux cents gouttes à la génération. Ce dernier comporte une partie avant et une partie arrière, composées d'eau, servant de « tampon », et une partie centrale, le « corps du train », contenant du milieu (dans le cas d'un train de culture) ou de l'éthanol à 70% (dans le cas d'un train de nettoyage). Entre chacune des parties se trouve une zone de transition présentant un gradient entre les deux phases en présence.

Les parties avant et arrière, d'une vingtaine de gouttes chacune, sont toujours des gouttes d'eau, qui servent comme « tampon » et permettent de réduire les risques de contaminations en récupérant les éventuelles microgouttes qu'il pourrait y avoir dans le tube. Aussi, plus sujettes à des instabilités (coalescence, isolement du reste du train), ces gouttes ne sont pas considérées comme « aptes » à héberger une population microbienne. Peu importe la taille du train, on considère donc toujours que quarante gouttes ne sont pas exploitables (les vingt premières et les vingt dernières). Sur un train de 240

gouttes, par exemple, on considère ainsi que seules 200 gouttes sont réellement exploitables. Ces gouttes constituent donc ce que l'on appelle le « corps du train », qui peut contenir du milieu de culture (si le train est destiné à la propagation des populations), ou de l'éthanol à 70% (si le train est destiné au nettoyage). Dans ce dernier cas, le train est aussi généré sans huile, de manière à favoriser le contact entre les gouttes d'alcool et les parois du tube, et ainsi nettoyer au mieux le système fluïdique.

Comme illustré Figure III-24, il existe, lors du changement de phase continue, une zone de transition créant un gradient entre l'avant/l'arrière du train, et le corps du train. Grâce à l'auto-fluorescence du milieu de culture (ici, du LB Broth), nous pouvons, par mesure de fluorescence, estimer le nombre de gouttes purement d'eau, celles purement de milieu/éthanol, et les gouttes intermédiaires du gradient (Figure III-25).

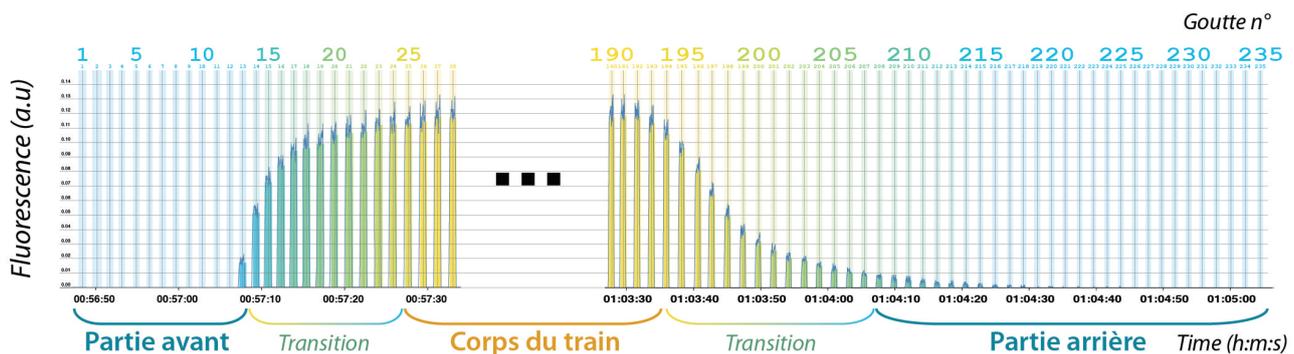


Figure III-25 : Fluorescence d'un train de gouttes auto-généré

Ce graphe présente le signal de fluorescence mesuré sur un train de culture (contenant du LB Broth) après génération. Il permet de mettre en évidence les différentes zones précédemment présentées avec : une partie avant de 12 gouttes d'eau pure, puis 14 gouttes de transition avant le corps du train composé de 166 gouttes de milieu pur, puis une nouvelle zone de transition de 24 gouttes avant la partie arrière composée des 20 dernières gouttes d'eau pure.

III.2.B.6. Conclusion

Avec ce module, la génération de nos trains à chaque cycle est désormais réalisable. L'automatisation est assurée par le programme informatique développé au cours de ma thèse, qui pilote, dans une séquence bien spécifique, l'ouverture/la fermeture des électrovannes, l'application des pressions sur chaque réservoir, l'alignement de la vanne rotative, etc. Une fois le train du nombre voulu de gouttes généré (grâce au détecteur DD_Gen), le train est introduit dans le circuit principal et la vanne rotative est fermée pour isolation du module de génération. L'incubation peut alors être réalisée.

III.2.C. Incubation d'un train de goutte et acquisition des données

L'incubation est une des fonctions principales de la machine d'évolution. Nous en avons présenté le fonctionnement dans le MDA au Chapitre II (II.2.D), mais cette fonction a nettement évolué au cours de cette thèse. En plus des précautions instaurées pour assurer l'automatisation fiable (détecteurs de gouttes et la mesure continue des niveaux d'huile, voir III.2.A.2), d'autres éléments d'amélioration ont été apportés à l'incubation au cours de cette thèse.

III.2.C.1. Acquisition du signal de fluorescence et détection des gouttes

Contrairement au MDA, où le signal fluorescent, servant à l'analyse, est aussi utilisé pour effectuer la détection des gouttes (comme vu en II.2.D.2), dans notre technologie un détecteur de gouttes (DD_F1 ou DD_F2) est utilisé, et les raisons en sont multiples.

Il s'avère que le signal de fluorescence n'est pas toujours stable, et qu'il peut fluctuer selon la structure du train de gouttes (espacement entre goutte et bulle d'air), où la composition des gouttes (agrégats, particules...). En revanche, l'utilisation de détecteurs de gouttes, reposant sur la méthode de la ligne de détection, est quant à elle bien plus fiable et robuste (Figure III-26).

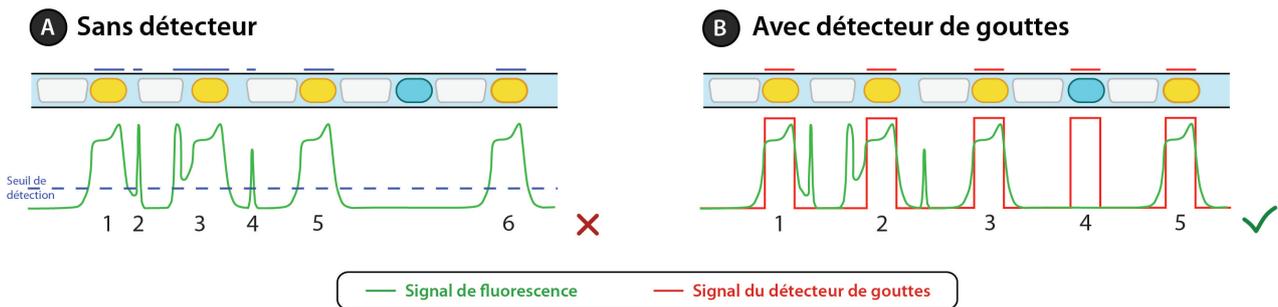


Figure III-26 : Acquisition du signal de fluorescence et détection des gouttes

Schéma présentant l'avantage d'utiliser un détecteur de gouttes au niveau du module de fluorescence. A- La détection des gouttes effectuée à partir du signal de fluorescence (comme dans le MDA, voir II.2.D.2) n'est pas toujours fiable et peut conduire à de fausses détections. En effet, les interfaces des séparateurs d'air, ou encore la présence d'agrégats dans les bioréacteurs peuvent conduire à des artefacts mettant en péril la détection. De plus, les gouttes non fluorescentes (ex : eau) ne peuvent pas être détectées sans addition d'un colorant fluorescent. B- L'ajout d'un détecteur de gouttes, basé sur la méthode de la ligne de détection, permet quant à lui de découpler acquisition du signal de fluorescence et détection des gouttes. La détection par ligne de détection étant fiable et robuste, il est possible d'évaluer la fluorescence de chaque goutte aisément, et de s'affranchir des artefacts.

Le détecteur de gouttes, placé au niveau du module de fluorescence (Figure III-27) permet ainsi de s'affranchir du signal de fluorescence et de s'assurer que les gouttes sont toujours détectées proprement. De plus, ce détecteur ne contraint plus la technologie à la manipulation de gouttes fluorescentes, et permet d'étendre les champs d'applications de notre instrument.

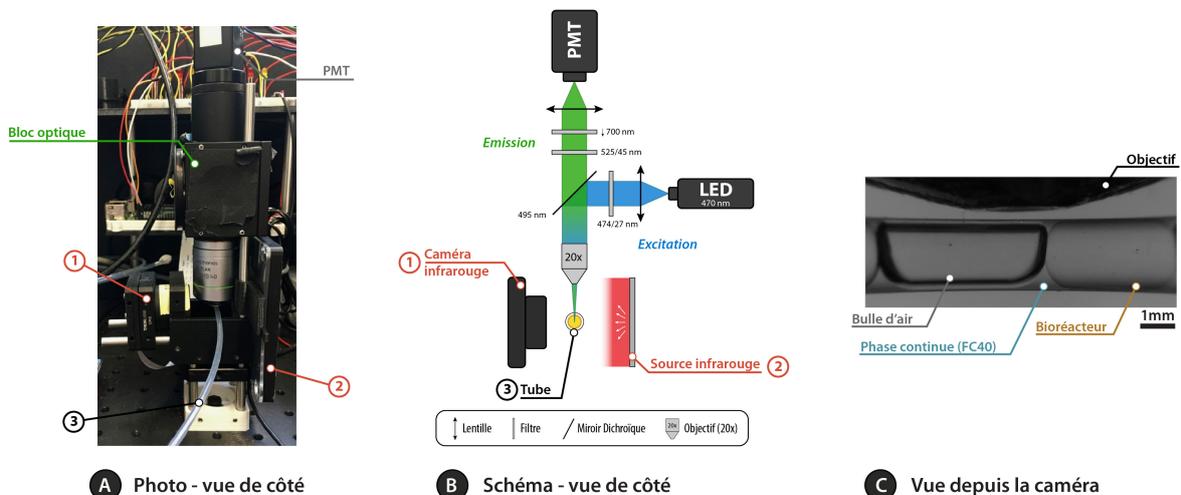


Figure III-27 : Module de fluorescence et détecteur de gouttes

A- Photo du module de fluorescence agrémenté du détecteur de gouttes. B- Schéma de ce même module. C- Photo prise depuis la caméra du détecteur de gouttes.

Grâce au détecteur de goutte et à la méthode de la ligne de détection, la détection n'est plus un problème dans la machine d'évolution. Cependant, une autre limitation existe dans notre technologie. Elle concerne les bulles d'air, qui, étant de petite taille pour permettre la propagation de nos échantillons (III.1.B.2.2), ne sont pas viables sur une manipulation des trains à long terme. Il est donc d'une importance capitale de savoir gérer leur volume de manière précise dans la technologie d'évolution, et ce tout au long d'un cycle.

Une solution technologique a été conçue et développée au cours de cette thèse pour répondre à ce besoin, et nous souhaitons désormais la présenter.

III.2.C.2. Réinjection d'air : une solution pour maintenir le volume d'air constant

Dans la machine d'évolution, les bulles d'air doivent être conservées de petite taille pour permettre la propagation des échantillons. Mais cette petite taille n'est pas compatible avec de longues incubations. En effet, le problème avec une si faible quantité d'air est que la bulle d'air disparaît trop rapidement (en quelques heures seulement 4-6h) pour permettre l'incubation de nos trains sur une longue période de temps, par dissolution dans l'huile ou consommation des microorganismes. Bien que, grâce à notre module de génération (III.2.B.3), de grosses bulles d'air pourraient être générées pour constituer une réserve suffisante durant l'incubation, il serait alors difficile de contrôler leur taille avant transfert. En effet, la taille des bulles d'air au moment du transfert dépendrait du temps d'incubation, de la consommation des microorganismes, de leur position dans le train, de la température, et ceci constituerait une variable trop difficile à contrôler.

Pour pallier à ce problème, et permettre de réaliser de longues incubations (de 48h, par exemple) tout en s'assurant que le volume des bulles d'air soit suffisamment petit pour le transfert, la bonne solution est de maintenir les bulles d'air de taille constante, et donc petites. Une solution technologique répondant à ce besoin a été inventée et développée au cours de ma thèse. Il s'agit d'un module de réinjection d'air « intelligent » (Figure III-28), capable détecter les bulles d'air, de mesurer leur taille au cours du temps, et de réinjecter de l'air dans les bulles ne présentant pas un volume suffisant.

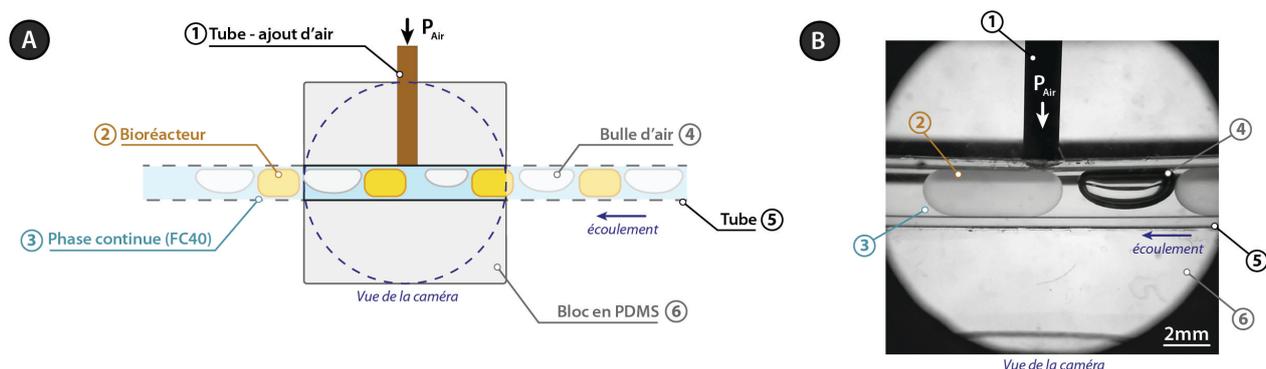


Figure III-28 : Injecteur d'air

Le module permettant d'injecter de l'air dans les bulles peut être assimilé à une jonction en T dans laquelle le tube principal permet la manipulation du train de goutte, et le tube auxiliaire (perpendiculaire) permet l'ajout d'air. Pour ce faire un tout petit trou est réalisé dans le tube principal, et les deux tubes sont maintenus grâce à un bloc de PDMS conçu sur mesure, et assurant l'étanchéité. A- Schématisation du module d'injection d'air. Ce schéma s'attache à présenter le système fluide et ne montre pas le montage optique assemblé autour du module, qui s'apparente à celui d'un détecteur de gouttes (caméra, lentille, diffuseur, source lumineuse) auquel est agrémenté une bande de détection (pour la détection dans le PDMS). B- Photo prise depuis la caméra de l'injecteur d'air.

Pour pouvoir procéder à l'ajout d'air, il est nécessaire de réaliser un trou dans le tube principal. Un second tube, permettant l'apport de l'air y est ensuite connecté orthogonalement à l'aide d'un bloc en PDMS, conçu sur mesure pour assurer l'étanchéité du système. L'autre extrémité du tube est connectée à un contrôleur de pression, via une forte résistance, de manière à pouvoir contrôler le débit d'air, très peu visqueux. Sur le chemin, une électrovanne est également employée et permet d'isoler le système lors des phases où l'on ne souhaite pas ajouter d'air. Enfin, pour permettre la détection, la mesure et le suivi des bulles d'air de manière robuste et précise, un système optique similaire à celui employé pour le module de transfert, est assemblé autour de ce bloc de PDMS (avec la mise en œuvre de bandes noires). En effet, pour procéder à l'ajout d'air, ce module doit pouvoir détecter les bulles d'air, mesurer leur taille, et si elles sont trop petites, y injecter de l'air pour réajuster leur volume, le tout de manière automatisée (Figure III-29). L'air ne pouvant être ajouté en permanence, lorsque cette opération est réalisée, une forte vélocité est employée. La détection et le suivi des bulles doivent être précis et robustes, car, en cas d'injection dans une goutte (au lieu d'une bulle) ceci présente un risque de coupure des gouttes, situation qui ne doit en aucun cas arriver.

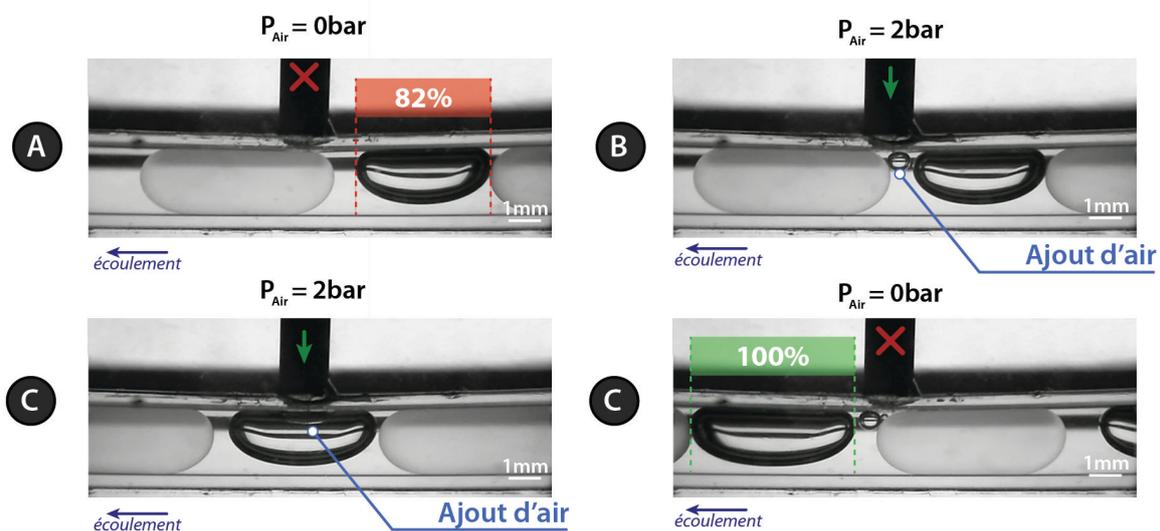


Figure III-29 : Injection d'air

Ce schéma présente les différentes étapes de l'injection d'air. Le tube étant entouré de PDMS, la méthode de la ligne de détection n'est pas applicable ici, et c'est la technique mettant en œuvre les bandes qui est employée, et qui permet de détecter, d'identifier et de mesurer les gouttes et bulles d'air. Alors que le train défile dans le tube principal (de la droite vers la gauche) la taille des bulles d'air est vérifiée avant qu'elles arrivent au niveau de l'injecteur. A- Lorsqu'une goutte de petite taille est détectée, et dès qu'elle se trouve en face du tube injecteur d'air B- une pression de 2bar est appliquée dans ce dernier afin de commencer l'injection. C- L'injection continue tout le temps que la goutte passe devant le tube injecteur et D- s'arrête aussitôt qu'une quantité suffisante d'air a été ajoutée ou qu'une goutte arrive, par mise à zéro de la pression.

Avec un tel module, il est désormais possible de maintenir une taille d'air constante. Étant donné que la phase la plus longue d'un cycle est l'incubation, l'injecteur d'air est installé dans la zone d'incubation, à côté du module de fluorescence. L'ajout d'air n'étant pas requis à chaque run, il est activé tous les deux runs et alterne entre les deux tubes. Ce module s'est montré efficace et robuste, en permettant de réaliser des incubations de 48h sans coalescence de gouttes (synonyme d'aucune disparition de bulles). En termes de contamination, nous reviendrons sur sa caractérisation dans le prochain chapitre (Chapitre IV).

En plus d'être nécessaire pour dans la réinjection d'air, il se trouve que la camera mise en œuvre peut également être mise à profit pour l'analyse.

III.2.C.3. Enrichissement de l'analyse

La sélection des populations dans la machine d'évolution repose sur l'analyse des gouttes que nous pouvons faire. La seule utilisation de la fluorescence limite les possibilités d'une telle technologie, et c'est pourquoi nous avons travaillé, au cours de ma thèse, à développer un nouveau module d'analyse. En effet, la camera du module d'injection d'air représente un nouveau détecteur qui, donnant accès à une image des gouttes durant toute la période d'incubation, peut être exploité pour acquérir des données. Il peut en effet être mis à profit pour mesurer la densité optique (DO) à l'intérieur de notre système (Figure III-30), et ainsi suivre l'évolution de la biomasse par une méthode plus générale que la fluorescence.

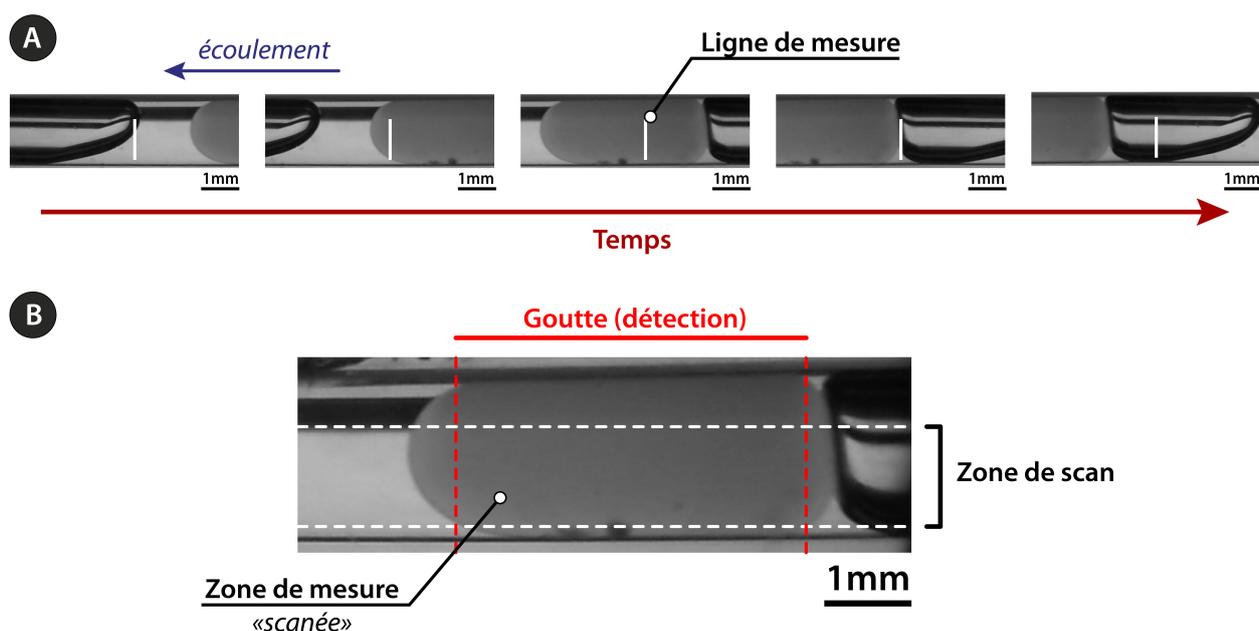


Figure III-30 : Méthode d'acquisition du signal (lumière transmise) pour mesure de la densité optique

Schéma présentant la méthode utilisée pour suivre l'évolution de la biomasse dans nos bioréacteurs par mesure de densité optique, à partir des images acquises par la caméra de l'injecteur d'air. A- L'acquisition du signal (lumière transmise) sur l'ensemble du train est réalisée à l'aide d'une ligne fixe (ici représentée en blanc) sur laquelle les valeurs des pixels (en niveau de gris) sont mesurées pendant toute la durée de l'incubation. A chaque run, le train défilant devant cette ligne, l'ensemble des gouttes se retrouvent scannées. B- La détection de ces dernières ayant lieu au même endroit que l'acquisition du signal, une zone de mesure (intersection de la zone de scan et de la détection) est définie pour chaque goutte. Cette « zone de mesure » est la zone sur laquelle la mesure de densité optique est réalisée pour chaque bioréacteur (voir Figure III-31 ci-après).

A chaque run, l'ensemble du train est scanné à l'aide d'une ligne de mesure (Figure III-30-A) sur laquelle la valeur des pixels, traduisant l'intensité de la lumière transmise, va être mesurée. A ce même point, la détection des gouttes est également effectuée et permet de définir, pour chaque bioréacteur, la zone sur laquelle sera réalisée la mesure de densité optique (« zone de mesure » - Figure III-30-B). Ces deux signaux permettent de suivre l'intensité de la lumière transmise au cours du temps (en niveau de gris) et ainsi de fournir une mesure de transmission de la lumière pour chaque bioréacteur (Figure III-31).

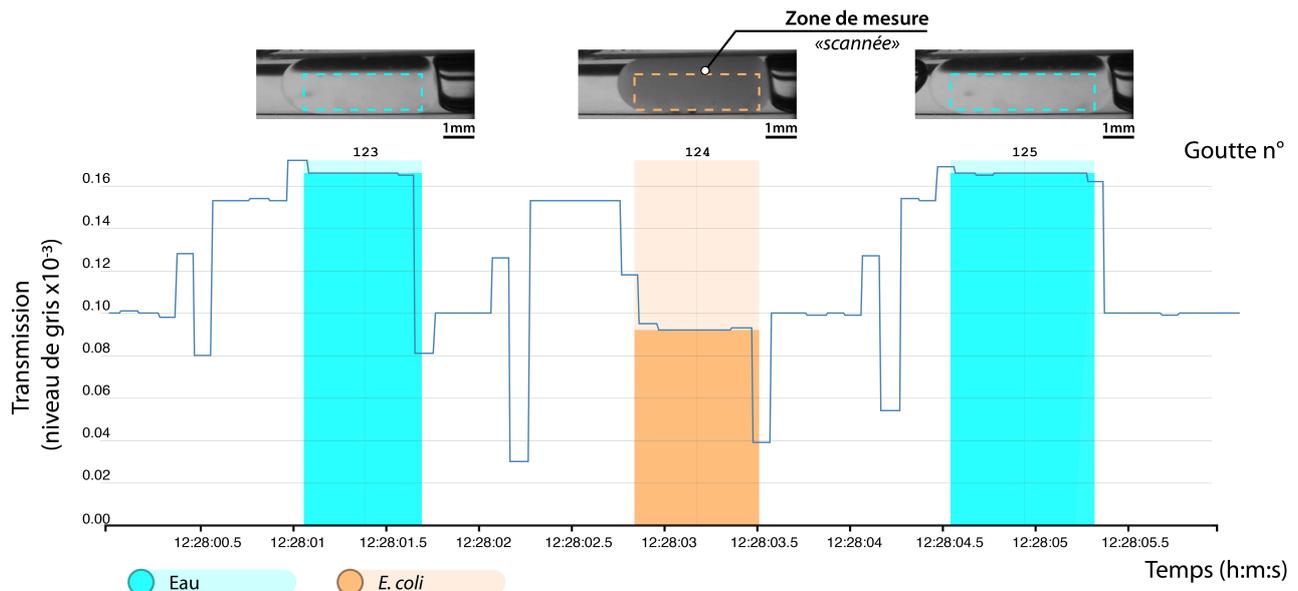


Figure III-31 : Mesure de la densité optique au sein des bioréacteurs

Ce schéma représente le signal acquis (lumière transmise) sur l’injecteur d’air lors du passage d’un train de gouttes (ici 3 gouttes). Les photos des gouttes (haut) permettent au lecteur d’établir la correspondance entre gouttes et signal mesuré (transmission de la lumière en niveau de gris) pour des gouttes d’eau, et une goutte contenant des bactéries *E. coli*. Sur le graphique, les rectangles en transparence représentent la détection des gouttes, tandis que les rectangles opaques représentent le signal mesuré pour chaque bioréacteur. Les hauteurs de ces derniers correspondent à la moyenne du signal mesuré sur l’ensemble de la « zone de mesure », et donnent une mesure de l’intensité de la lumière transmise pour chaque bioréacteur. En cas de croissance microbienne, l’intensité de la lumière transmise diminue, ce qui explique la baisse du signal pour les gouttes contenant des microorganismes. Ici, par exemple, la mesure de transmission dans les gouttes d’eau (gouttes 123 et 125) est de 165.8 tandis que celle de la goutte contenant des bactéries (goutte 124) est de 90.8.

En moyennant le signal mesuré pour chaque goutte, à chaque run, on obtient donc un point de mesure par goutte par run. Ensuite, à partir de cette mesure d’intensité lumineuse transmise peut être calculé la densité optique DO (ou absorbance A) de chaque bioréacteur grâce à relation suivante (Équation III-2).

$$DO = A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon \cdot l \cdot C$$

Équation III-2 : Densité optique (ou absorbance) – Loi de Beer-Lambert

La densité optique DO (ou absorbance A) d’une solution est définie comme le logarithme de l’intensité lumineuse initiale I_0 sur l’intensité de la lumière transmise I. Cette relation est aussi égale au produit de ϵ le coefficient d’extinction molaire, rendant compte de la capacité de la substance absorbante (ici les microorganismes) à absorber la lumière, par l la longueur du trajet optique, et C la concentration de la substance absorbante (ici les microorganismes, soit C leur biomasse). ϵ et l étant deux constantes, on retrouve bien que la densité optique est proportionnelle à la concentration. Dans notre système, I correspond au signal acquis (mesuré en permanence) tandis que I_0 correspond à la mesure de l’intensité lumineuse dans une goutte « vide », c’est à dire une goutte d’eau (ou une goutte de milieu ne contenant pas de microorganismes). En appliquant cette formule à l’exemple de la Figure III-31, on obtient ainsi des densités optiques égales à 0 pour les gouttes d’eau (gouttes 123 et 125), et 0.256 pour la goutte contenant des bactéries (goutte 124).

Cette mesure de densité optique étant réalisée sur l’ensemble du train à chaque run, il est ensuite possible, à partir des mesures obtenues pour toutes les gouttes sur l’ensemble des runs, de reconstituer l’évolution de la biomasse (par mesure de densité optique) pour chaque goutte au fil des runs, et donc au cours du temps (Figure III-32).

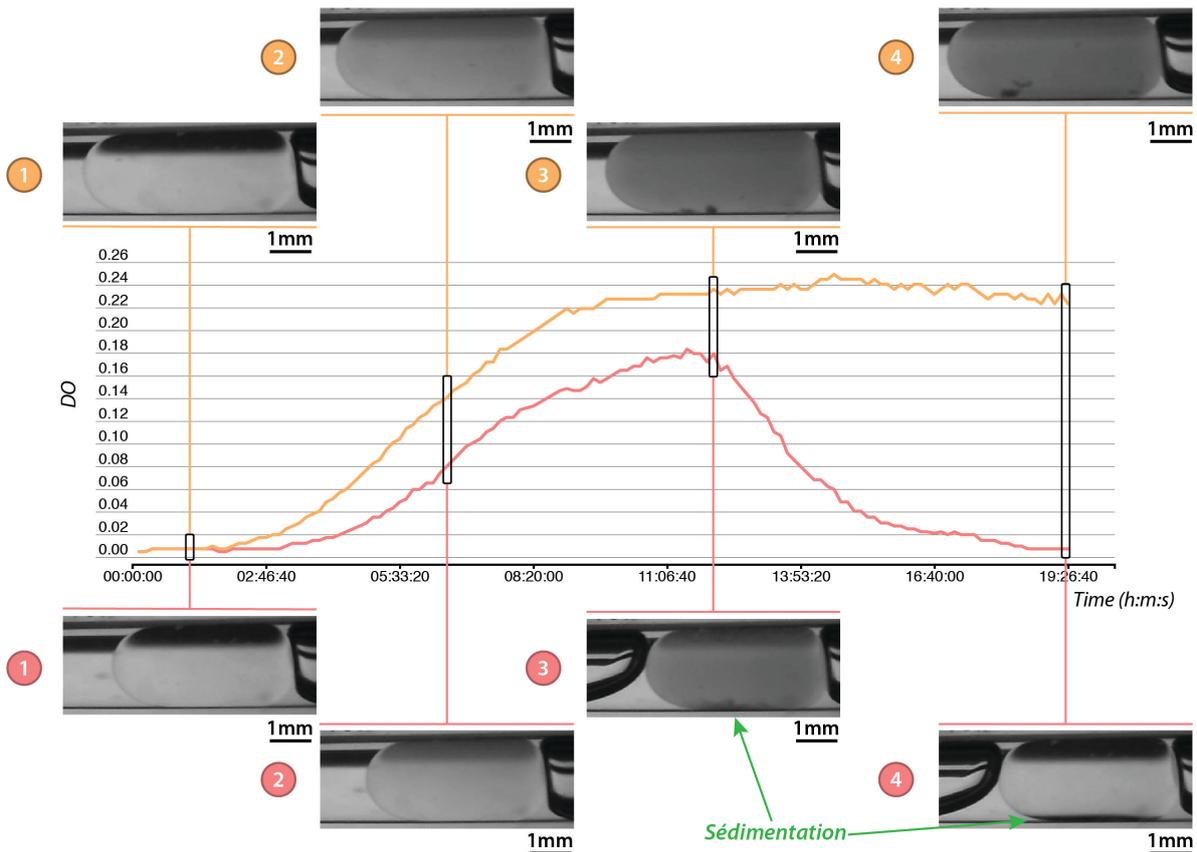


Figure III-32 : Évolution du signal de densité optique (biomasse) au cours du temps

Grâce à la mesure de la densité optique dans chaque goutte au cours des runs (et donc du temps), il est possible (par traitement informatique) de reconstruire l'évolution temporelle des niveaux de DO dans chacune des gouttes, et donc de suivre la croissance microbienne. Ici, deux situations différentes sont présentées : le cas d'une croissance bactérienne typique (courbe orange), et le cas d'une croissance où les bactéries vont s'agréger et sédimenter face à un stress antibiotique (courbe rose).

Grâce à l'imagerie des gouttes en temps réel, nous exploitons la densité optique (moyennée au sein de la goutte), pour suivre l'évolution de la biomasse dans chacun des bioréacteurs. Mais cette mesure permet également d'accéder à plus d'informations sur le comportement phénotypique des populations lors de leur croissance. Elle permet ici, par exemple, de mettre en évidence un comportement planctonique (courbe orange), ainsi que de la sédimentation face à un stress antibiotique (courbe rose). L'imagerie en temps réel donne accès à un grand nombre d'informations sur le comportement phénotypique des populations lors de leur croissance, qu'il est intéressant d'analyser. En effet, plus on possède d'informations sur l'activité des microorganismes au sein des gouttes, plus on a de critères de sélection pour diriger l'évolution, et il est donc dans notre intérêt de les maximiser. Toutes les informations ne sont aujourd'hui pas analysées automatiquement, mais nous travaillons à réaliser une analyse par traitement d'image plus poussée, afin de récupérer un maximum d'informations. Chaque goutte étant automatiquement prise en photo de manière régulière, il est possible de réaliser une analyse d'image plus poussée que le « simple » scan que nous avons actuellement implémenté. Cette prise de photo automatisée nous permet néanmoins déjà d'accéder à un suivi visuel à posteriori de la croissance microbienne au sein de nos bioréacteurs, d'identifier différents comportements phénotypiques et de pouvoir avoir un contrôle « visuel » de ce que nous mesurons.

III.3. Conclusion

Avec le module de transfert, permettant la sélection et la propagation de populations microbiennes, et l'ensemble des autres modules, permettant d'assurer une automatisation fiable et robuste, cette machine est complète. Elle permet la réalisation de cycles d'évolution de populations microbiennes, en assurant compartimentation, parallélisation, maximisation des diversités, et gestion des pressions de sélections, comme imaginé dans le modèle expérimental. Ici, nous avons vu tous les besoins d'une telle technologie, et avons expliqué comment, par la recherche et le développement sur ces trois dernières années, nous sommes parvenus à trouver et mettre en œuvre des solutions.

Chapitre IV :

Caractéristiques de la machine d'évolution

IV. Caractéristiques de la machine d'évolution

Cette nouvelle technologie, développée au cours de ma thèse, permet la réalisation de cycles pour conduire l'évolution tout en respectant les prérequis du modèle expérimental : compartimentation, parallélisation, maximisation des diversités, gestion des pressions de sélections. Cependant, et avant d'envisager de conduire des expériences d'évolution avec des microorganismes, il est important de caractériser la machine pour savoir dans quelles limites nous travaillons. La majorité des capacités actuelles de la machine d'évolution ont déjà été évoquées au cours du chapitre précédent. Nous avons alors abordé le nombre d'échantillons manipulables (~200 bioréacteurs), les différents critères d'analyse et de sélection (fluorescence, densité optique), la durée d'incubation (non limité grâce à l'injecteur d'air, mais généralement $\leq 48h$), etc. Néanmoins, le fonctionnement de la machine d'évolution gravite autour du module de transfert (qui permet la propagation des échantillons), et ce dernier n'a pas encore été caractérisé.

Un travail de caractérisation autour du module de transfert a donc été réalisé au cours de cette thèse, et ce quatrième chapitre s'attache à en présenter les résultats. En premier lieu les capacités actuelles du module de transfert seront évaluées dans sa capacité à propager les échantillons : contrôle du volume transféré (c.-à-d. de l'inoculum), temps de transfert, fiabilité, et les perspectives d'évolution de ces capacités seront abordées. En second lieu, les résultats de la caractérisation en termes de contamination chimique et biologique dans la machine d'évolution seront présentés. Il sera ainsi démontré que cette technologie, bien que présentant de grandes perspectives d'évolution, possède déjà des capacités suffisantes pour conduire des expériences d'évolution dirigée sur des populations bactériennes.

IV.1. Caractérisation du module de transfert

L'étape de transfert est une étape complexe, dans laquelle détection et manipulation sont au cœur de la propagation automatique des échantillons entre gouttes. Lors de cette étape le contrôle du volume transféré passe, comme nous l'avons vu précédemment (III.1.B.2.2), par la mesure de l'augmentation de la taille des gouttes en temps réel. Néanmoins, ce contrôle a des limites qu'il est important de quantifier pour pouvoir conduire des expériences dans la machine d'évolution. En effet, l'inoculum joue un rôle majeur dans le processus d'évolution et dans la gestion de la diversité, comme nous l'avons vu précédemment (II.1.A.2). Son contrôle permet la gestion de la pression de sélection aléatoire, et il est donc important d'en avoir la maîtrise au sein de notre dispositif ainsi que de savoir dans quelles limites il peut être contrôlé.

De même, il est important de s'assurer, lors du transfert d'échantillon, que les deux gouttes sélectionnées sont bien les gouttes souhaitées, mais également que le transfert soit bien réalisé.

Dans un premier temps, et en vue de caractériser le contrôle du volume transféré, des trains d'eau ont été utilisés. Ces derniers ont permis de s'assurer de la fiabilité du module, ainsi que d'évaluer les caractéristiques de notre dispositif, à savoir le volume minimal transférable, et les marges d'erreurs sur le volume transféré (Figure IV-1).

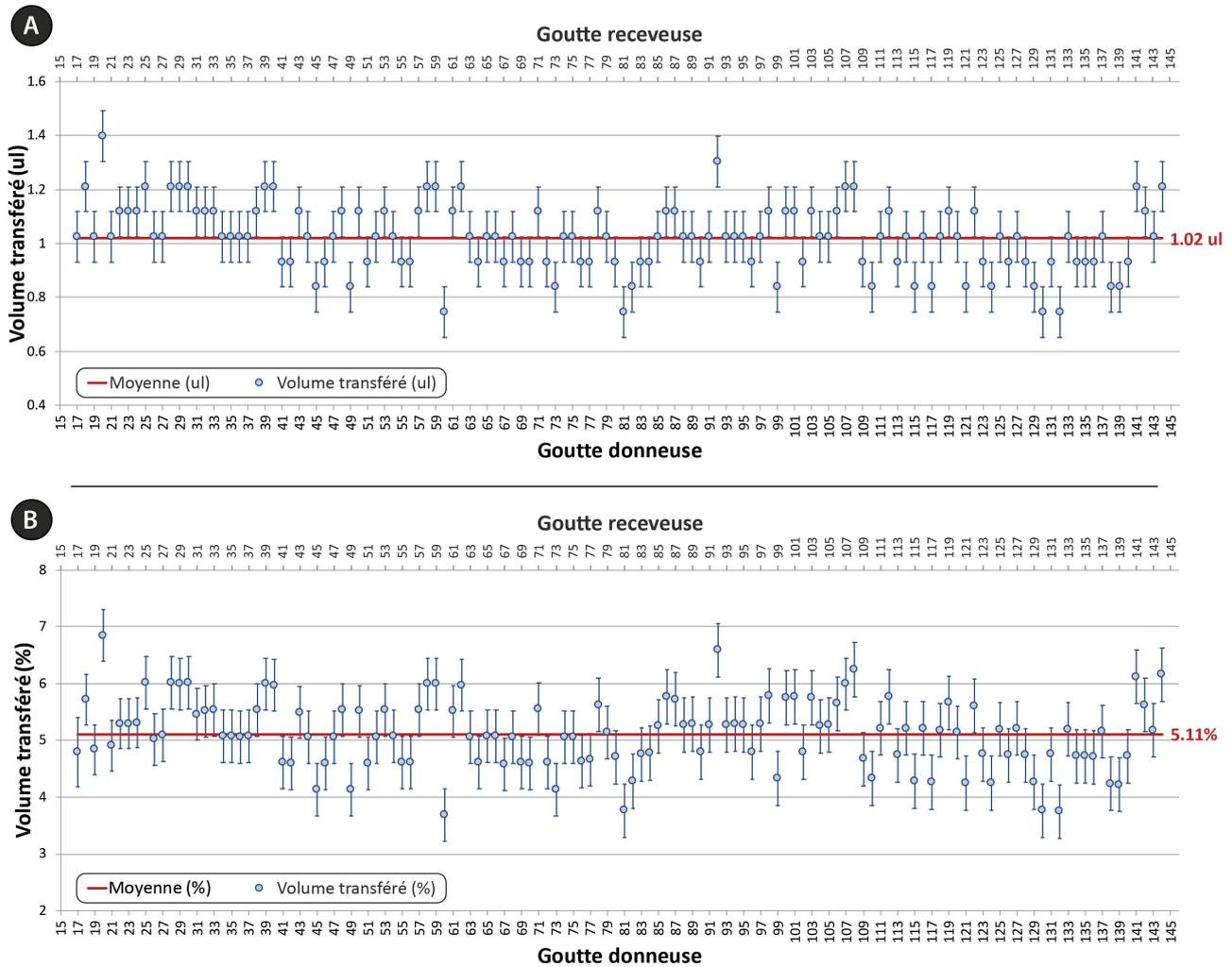


Figure IV-1 : Caractérisation du module de transfert avec des gouttes d'eau

Graphiques présentant le volume transféré A- en microlitres (μL) et B- en pourcentage (%) d'une goutte donneuse vers une goutte receveuse sur l'ensemble d'un train de gouttes d'eau. Les résultats sont ici présentés pour le transfert en série de 127 gouttes (de la goutte 17 à la goutte 144) sur un train de 160 gouttes.

IV.1.A. Volume minimal transférable

Dans notre dispositif, le volume minimal qui peut être transféré est d'environ $1\mu\text{L}$, ce qui correspond, pour des gouttes d'une vingtaine de microlitres à une dilution par vingt, soit $\sim 5\%$ du volume final (Figure IV-1). Cette limite peut être liée à différents paramètres : la limite de détection, le temps de réponse du logiciel (conditionné par la vitesse d'acquisition de la caméra) et le temps de réponse du mécanisme de fermeture (l'actuateur). En analysant les données enregistrées lors du transfert à partir desquelles les volumes sont calculés (à savoir l'évolution de la taille des gouttes donneuses et receveuses en fonction du temps), nous pouvons identifier lequel de ces paramètres est limitant (Figure IV-2).

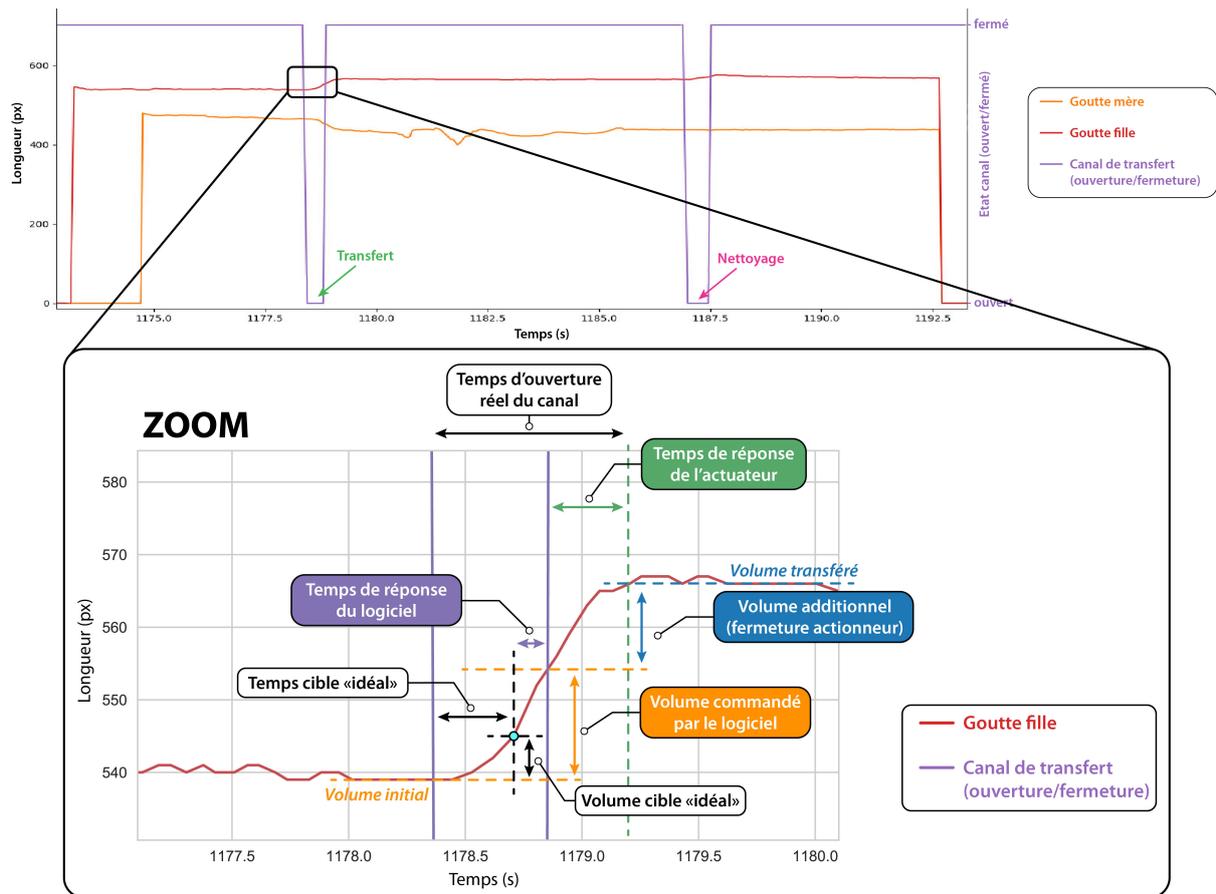


Figure IV-2 : Impact du temps de réponse du mécanisme d'ouverture/fermeture sur le contrôle du volume

Ce schéma montre une décomposition du volume transféré et des temps de réponse au cours d'un transfert d'échantillons. Dans cet exemple, le volume cible idéal est de 1% et le canal devrait donc se fermer après un temps cible idéal de 350ms. A ce temps vient s'ajouter le temps de réponse du logiciel (ici de 140ms), temps nécessaire pour s'assurer que le volume mesuré plus ou moins l'erreur de détection, est supérieur au volume cible demandé. Après 140ms, l'ordre de fermer le canal de transfert est donc envoyé à l'actuateur, qui à son tour possède un temps de réponse de plusieurs millisecondes (ici 350ms). Ce temps de réponse, quasi égal au temps de transfert cible idéal, est actuellement le plus conséquent, et représente la limite majeure du contrôle que nous avons sur la taille de l'inoculum. Finalement, bien que le volume minimal dû à la détection des gouttes pourrait être de 1% (en conditions optimales), il est augmenté à 2.8% par le temps de réponse du logiciel (qui pourrait être minimisé), puis à 5% par le temps de réponse de l'actionneur.

Pour obtenir le volume transféré le plus faible possible, on se place au-dessus de la limite de détection en demandant un transfert de 1% (valeur fixée par l'erreur faite au niveau de la détection qui est de +/- 1px, soit ~90nL, ce qui représente 0.45% d'une goutte de 20µL) de manière à ce que le volume transféré soit suffisant pour être détecté. Bien que le programme informatique ordonne la fermeture du canal dès la détection d'un volume transféré suffisant, après 350ms dans le cas présent, le transfert se poursuit durant plusieurs dixièmes de secondes, ici 490ms, le temps que le canal soit effectivement fermé. Ce laps de temps, principalement due au temps de réponse de l'actuateur, conduit au transfert du double du volume escompté (allant parfois jusqu'à trois fois cette valeur) et représente la principale limitation sur le volume minimal transférable.

La valeur minimale transférable est donc principalement conditionnée par le mécanisme d'ouverture/fermeture du canal de transfert qui possède un temps de réponse bien plus de deux fois plus lent que celui du logiciel ($\tau_{O/F} = 340ms \gg \tau_{logiciel} = 140ms$). En remplaçant l'actuateur par un autre, possédant un temps de réponse plus faible, on pourrait donc à la fois diminuer le volume transféré et rendre son contrôle plus précis, jusqu'à la limite fixée par la détection. A l'avenir, on pourrait également changer la caméra employée (meilleure résolution, acquisition rapide) pour diminuer

d'autant plus le volume minimum transférable, augmenter la précision du transfert mais également réduire le temps de stabilisation des gouttes et donc le temps de transfert, qui est actuellement ~2h pour le transfert de 200 gouttes.

IV.1.B. Fluctuations du volume transféré

Les fluctuations observables sur le volume transféré d'une goutte à une autre (Figure IV-1) ont quant à elles plusieurs origines. D'une part, elles sont liées à une erreur de mesure due à la résolution de la caméra et au mouvement des gouttes, qui peut induire des fluctuations de l'ordre de quelques dizaines de microlitres (~90nL) sur la mesure du volume transféré (représenté par les barres d'erreur dans la Figure IV-1). D'autre part, elles sont également liées au temps de réponse de l'actuateur, car, le débit lors du transfert n'est pas constant (Figure IV-3).

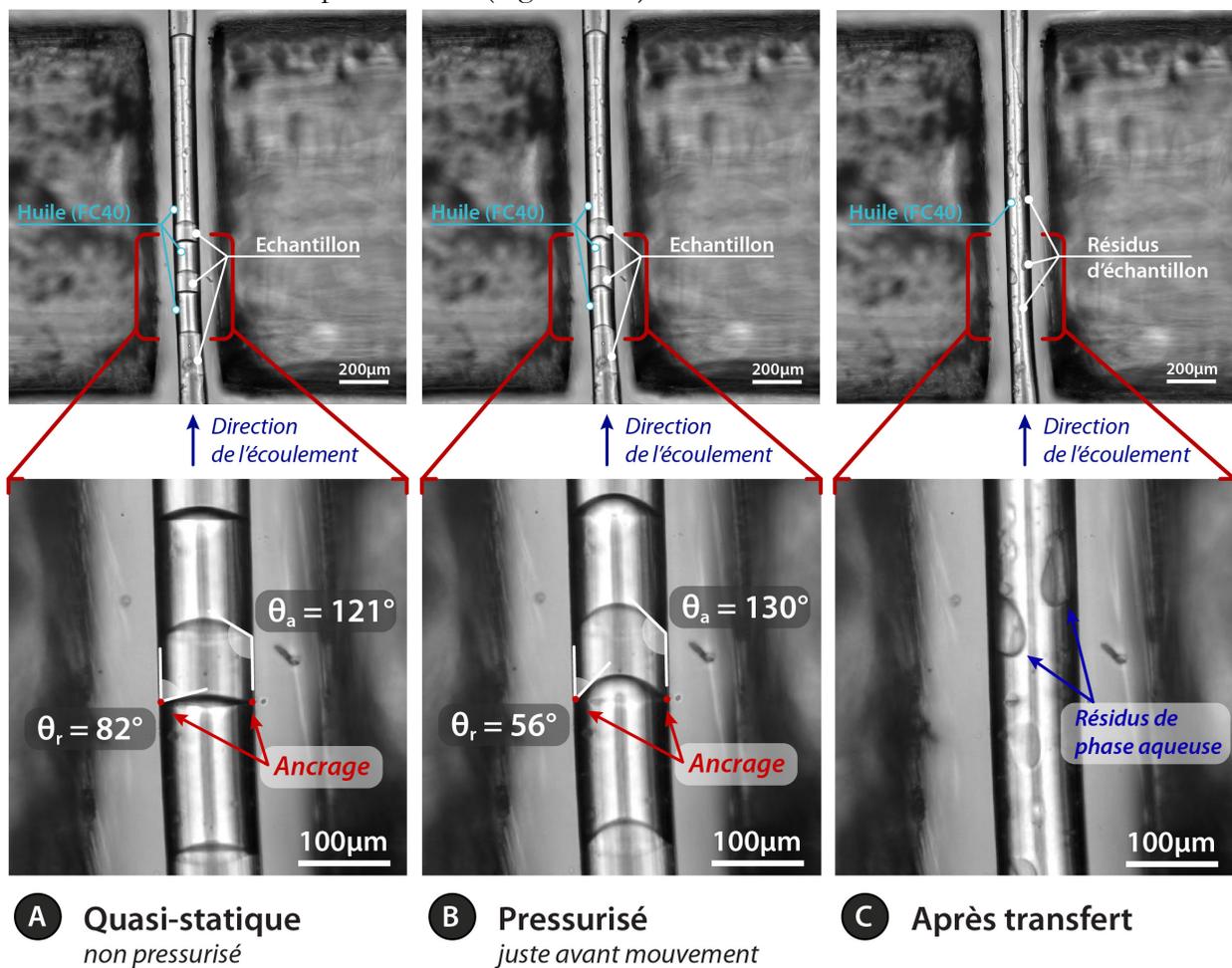


Figure IV-3 : Mouillage au sein du canal de transfert

Lors du transfert d'échantillons, le débit n'est pas constant, et ceci s'explique par le phénomène de mouillage ayant lieu en son sein. Ce schéma présente l'évolution du transfert d'un échantillon en trois étapes. A- Lorsque le fluide est à l'arrêt, la phase continue forme généralement un angle de 90° avec la surface du canal. Ici, le fluide est soumis à une légère pression en amont du canal, ce pourquoi nous observons une différence entre l'angle d'avancée $\theta_a=121^\circ$ ($>90^\circ$), et l'angle de reculée $\theta_r=82^\circ$ ($<90^\circ$). Cette différence d'angle entre l'interface qui avance et celle qui recule, mais également entre position statique et dynamique est signe de mouillage. On parle dans ce cas-là d'hystérèse de l'angle de contact. B- Lorsqu'une plus grande pression est appliquée en amont du canal, les interfaces continuent de se déformer, sans pour autant mettre le fluide en mouvement (on obtient alors les angles $\theta_a=130^\circ$ et $\theta_r=56^\circ$). On parle alors d'ancrage des lignes de contacts, phénomène amplifié/aidé par la succession de plugs de phases aqueuse et continue. C- Après passage de l'échantillon, on peut également observer des résidus de phase continue mouillant la paroi du canal.

Bien que l'ensemble des tubes de la machine d'évolution soient super-hydrophobes, le canal de transfert, lui, ne possède pas ces propriétés (car étant fait de PDMS). Ainsi, lors du passage des échantillons dans le canal de transfert, au lieu que le film de lubrification d'huile soit maintenu autour de ces derniers, ils vont mouiller les parois du canal, et affecter le débit de transfert. Dans le cas présent (Figure IV-3), par exemple, on observe que l'échantillon s'est fractionné en plusieurs morceaux sous l'effet de la pression appliquée en amont du canal. La formation d'une succession de « plugs » d'huile et d'eau conduit à l'ancrage des lignes de contacts avec hystérèse des angles de contact ($\theta_a > \theta_r$), et rend le déplacement difficile. Ainsi, pour un même temps de transfert, le volume transféré ne sera pas le même (car le débit n'est pas constant), et c'est ce qui nous a motivé notre choix de contrôler le volume par mesure de la taille plutôt que par temps de transfert.

Dans le cas des gouttes d'eau, ce mouillage engendre des fluctuations de quelques dixièmes de microlitres, soit de +/-1.5% par rapport au volume transféré dans notre cas (observables Figure IV-1) mais n'empêche généralement pas le transfert (100% des gouttes sont transférées). Cependant, lors du transfert de gouttes de milieu (contenant ou non des microorganismes), ce mouillage peut conduire au blocage du canal de transfert (Figure IV-4), phénomène qu'il faut à tout prix éviter car synonyme de la perte d'une population.

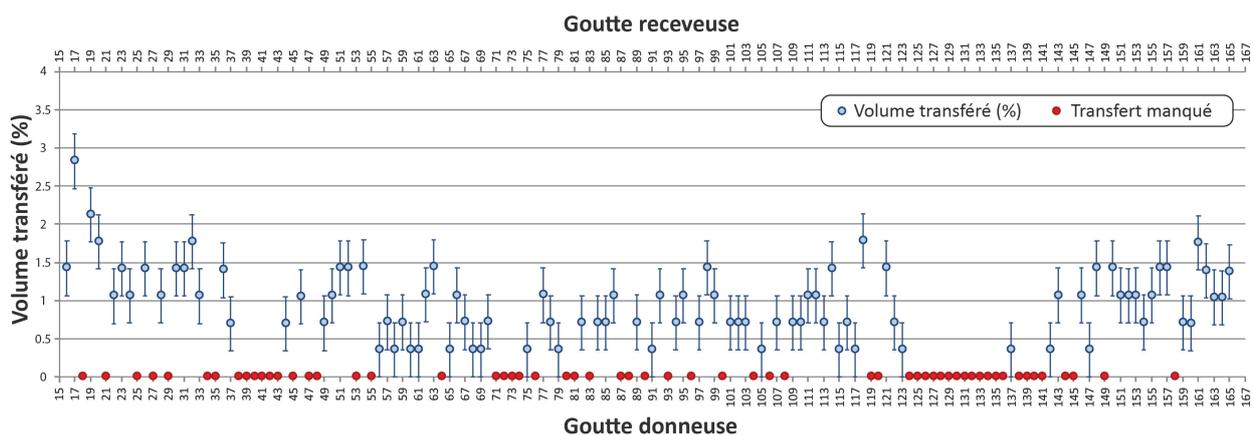


Figure IV-4 : Caractérisation du module de transfert avec des gouttes de milieu

Graphique présentant le volume transféré (en pourcentage) d'une goutte donneuse vers une goutte receveuse sur l'ensemble d'un train de gouttes de milieu de culture (LB, train de 200 gouttes, transfert en série des gouttes 16 à 166). On voit ici que le mouillage dans le canal de transfert a parfois conduit à son obturation, ne permettant ainsi pas le transfert d'échantillons.

Pour pallier à ce problème, nous nous sommes inspirés d'une méthode d'hydrophobisation du PDMS couramment utilisée en microfluidique : la silanisation, qui consiste à créer une couche de silane fluoré à la surface du PDMS. Cette couche est réalisée par activation de la surface du PDMS (création de groupements silanols Si-OH par plasma O_2) puis mise en contact de ce dernier avec la solution de silane, pour création d'une liaison covalente Si-O-Si [72], [73]. Dans notre système, le canal de transfert est difficilement accessible au plasma (car non exposé) et nous avons dû adapter le protocole (temps d'exposition, concentration en silane, temps de mise en contact) de manière à pouvoir réaliser un traitement présentant les propriétés hydrophobes souhaitées. Le résultat du traitement employé est présenté Figure IV-5.

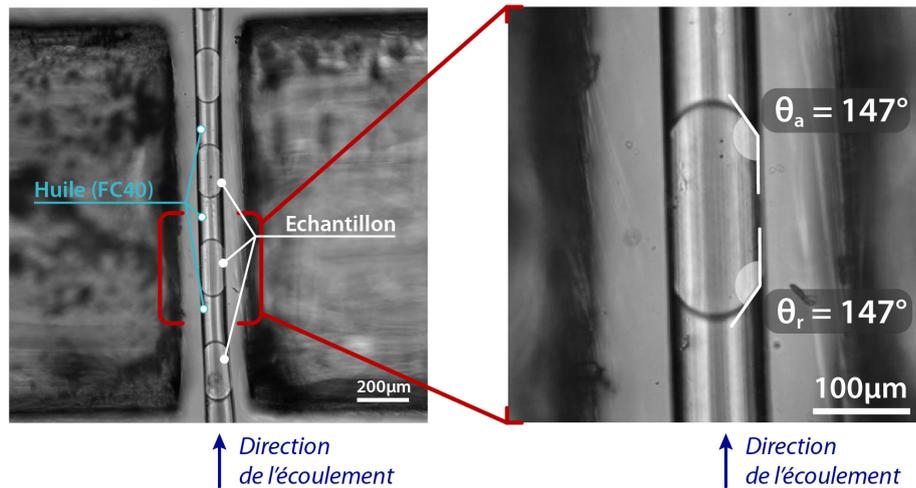


Figure IV-5 : Évaluation de l'hydrophobicité du canal de transfert après silanisation

Après traitement du canal, son hydrophobicité a été évaluée en réalisant la même expérience que celle conduite précédemment dans un canal non traité (présenté Figure IV-3). On voit alors que le comportement de la phase aqueuse n'est plus du tout le même, car cette dernière ne mouille plus les parois du canal. On peut ainsi qualifier le canal d'hydrophobe car l'angle d'avancée et de reculée sont égaux et supérieurs à 130° ($\theta_a = \theta_r = 147^\circ > 130^\circ$). La succession de plugs d'huile et de phase aqueuse n'affecte plus le passage de l'échantillon car un film de lubrification est maintenu : les phénomènes d'ancrage des lignes de contact et d'hystérésis ne sont plus présents.

Ce traitement permet ainsi de supprimer les problèmes de mouillage, d'ancrage des lignes de contacts et d'hystérésis, avec augmentation de l'angle de contact qui passe de $\theta \approx 90^\circ$ (en statique) à $\theta = 147^\circ$ (en statique, comme en dynamique). Après traitement du canal, le transfert a lieu facilement et le nettoyage est beaucoup plus efficace car le mouillage est considérablement réduit. Il permet alors de faire en sorte que la propagation de tous les échantillons microbiens ait bien lieu, malgré que les fluctuations liées aux différents temps de réponses persistent dans le volume transféré d'une goutte à une autre.

Néanmoins, ce type de traitement présente un inconvénient, car il n'est pas stable dans le temps (s'estompe en quelques jours) [72], [73]. Ce phénomène n'est généralement pas limitant en microfluidique, car les puces en PDMS ne sont pas destinées à durer dans le temps, mais sont plutôt utilisées comme des « consommables », car facilement reproductibles et remplaçables. Or notre technologie est destinée à fonctionner en continue, sur le long terme (plusieurs mois). Dans notre système, le passage répété des différents fluides lors du processus de transfert n'aide pas à la stabilité du traitement du canal, qui perd alors de son hydrophobicité et peut conduire, à nouveau, au mouillage. Après dégradation, le passage d'échantillons semble tout de même être facilité en comparaison à du PDMS non traité. Cependant, une fois dégradé, il présente à nouveau des risques de contaminations inter-échantillons (comme nous le verrons par la suite, IV.2.C.2), voire des risques de blocage du canal (suite à la formation d'une succession de « plugs » d'huile et de phase aqueuse). Une solution logicielle simple a donc été implémentée pour s'assurer que le transfert ait lieu, et ce, quel que soit l'état du canal. S'il s'avère que le transfert est « bloqué », la différence de pression entre les deux tubes est légèrement augmentée jusqu'à ce que le transfert puisse avoir lieu. Ainsi, on s'assure que la propagation de nos échantillons ait toujours lieu, et ce même si le volume transféré n'est pas précisément contrôlé. La fiabilité du transfert d'échantillon prédomine sur sa précision.

En parallèle de l'utilisation de la machine d'évolution (qui doit fonctionner avec le module de transfert actuel), nous travaillons à développer de nouvelles solutions pour rendre le canal de transfert

super-hydrophobe de manière stable sur le long terme. Les premiers résultats semblent prometteurs mais ne seront pas présentés dans ces travaux.

IV.1.C. Conclusion

Actuellement, nous pouvons donc transférer un volume minimal de $\sim 5\%$ des gouttes, mais ce volume fluctue généralement entre 2.5% et 7.5% . Mais le volume inoculé pourrait également être augmenté, avec une limite maximale qui se trouve autour de 50% (et pour laquelle l'erreur serait minimisée). Au-delà d'un tel volume transféré, la taille des gouttes se rapproche de la taille limite à partir de laquelle elles commenceraient à se rompre lors de leur manipulation ($V > 30\mu\text{L}$, soit une goutte plus de trois fois plus longue que large).

Lors des expériences conduites avec la technologie actuelle, nous nous limiterons donc à travailler avec des inoculums compris dans cette gamme ($5-50\%$) et en tenant compte des fluctuations pouvant avoir lieu ($\pm 2.5\%$). Bien que ces caractéristiques gagneraient à être améliorées, nous verrons qu'elles permettent déjà de prouver le bon fonctionnement de la machine d'évolution, et sa capacité à faire évoluer des microorganismes (voir Chapitre V).

IV.2. Étude des contaminations

Dans l'évaluation de notre technologie à pouvoir conduire des expériences d'évolution dirigées sur des populations (ou communautés) microbiennes, un aspect fondamental de sa caractérisation de reste en demeure : la contamination.

Jusqu'à présent nous avons considéré les gouttes comme étant totalement indépendantes les unes des autres. Il se trouve, néanmoins, que des échanges non souhaités entre gouttes peuvent survenir lors de leur manipulation : c'est ce que l'on appelle des contaminations. Dans notre technologie, il est important de pouvoir les quantifier, afin de connaître le poids du flux génétique entre les populations. Si cet effet est trop important, il peut mettre en péril le fonctionnement de notre technologie dans sa capacité à diriger l'évolution, car il tendra à homogénéiser la diversité inter-populations. Cependant, s'il est faible, son impact pourra être considéré comme négligeable sur les diversités intra et inter populations.

Dans la machine d'évolution, les contaminations sont nécessairement liées à des étapes de manipulation d'un train de gouttes aux conditions non homogènes, présentant de la diversité dans sa composition (diversité qui peut être biologique, ou chimique). Dans le déroulement d'une expérience d'évolution effectuée avec la machine, ces contaminations peuvent donc être liées à la génération du premier train de gouttes (étape « semi-manuelle », effectuée en dehors de la machine), à l'incubation des trains, à la propagation des échantillons (via le module de transfert) ou encore à la récupération et le tri des bioréacteurs en dehors de la machine (le « sorting »). Excepté l'étape de propagation des échantillons, rupture technologique portée par la machine d'évolution, toutes les autres sont également présentes dans le MDA, et ont déjà fait l'objet d'une étude approfondie [54]. Nous ne souhaitons pas, ici, revenir en détail sur toute cette étude, mais seulement en donner une synthèse, qui nous a permis de

prendre des précautions dans la conception de la machine d'évolution, puis dans celle de nos protocoles expérimentaux. Nous réaliserons néanmoins, dans un second temps, l'étude complète des contaminations lors de l'étape de propagation des échantillons, nouvelle fonction de la machine d'évolution qu'il est important de caractériser.

Ainsi, cette partie s'attachera à présenter la méthode expérimentale mise en œuvre pour quantifier les contaminations dans notre système, puis à présenter les résultats de l'étude passée, et enfin ceux concernant le module de transfert et la propagation des échantillons.

IV.2.A. Méthode expérimentale d'évaluation des contaminations

Afin de quantifier les échanges de matière non souhaités (les contaminations) entre bioréacteurs dans notre technologie, la solution choisie est d'utiliser la fluorescence. En effet, grâce au module de fluorescence présent dans la machine, il nous est possible de suivre en temps réel l'évolution du signal de fluorescence dans chacun des bioréacteurs. En manipulant un train hétérogène, comportant des gouttes fluorescentes (gouttes « source ») mais également des gouttes non fluorescentes (gouttes « puits »), il est ainsi possible, lors des différentes étapes de manipulation, d'évaluer si du matériel fluorescent a été transféré d'une goutte « source » vers une « puits » grâce au module de fluorescence présent dans la machine (Figure IV-6).

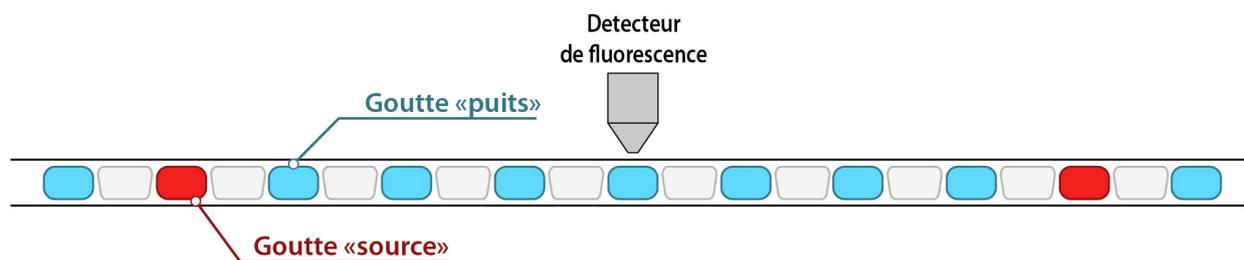


Figure IV-6 : Protocole d'évaluation des contaminations

Afin d'évaluer les contaminations lors des différentes étapes de manipulation d'un train dans la technologie millifluidique, des gouttes fluorescentes (gouttes « source ») sont placés à intervalles réguliers (généralement toutes les 8 gouttes) dans un train d'eau (identifiées comme gouttes « puits »). De cette manière, si un échantillon d'une goutte source vient contaminer une goutte puits, le volume de cet échantillon peut directement être quantifié par mesure de fluorescence. Le protocole consiste donc à manipuler de tels trains et à mesurer à chaque étape la fluorescence dans l'ensemble des bioréacteurs de manière à voir si l'étape en question est source de contaminations, et si oui, dans quelles proportions.

Pour mettre en œuvre ce protocole, il a donc été choisi d'utiliser la fluorescéine (ou fluorescéinate de sodium, FS), agent chimique fluorescent présentant de nombreux avantages pour notre application. Très soluble dans l'eau, insoluble dans l'huile fluorée et adapté à notre système optique (FITC, excitation : 490nm, émission 525nm) ce fluorochrome présente un profil de fluorescence intéressant (Figure IV-7).

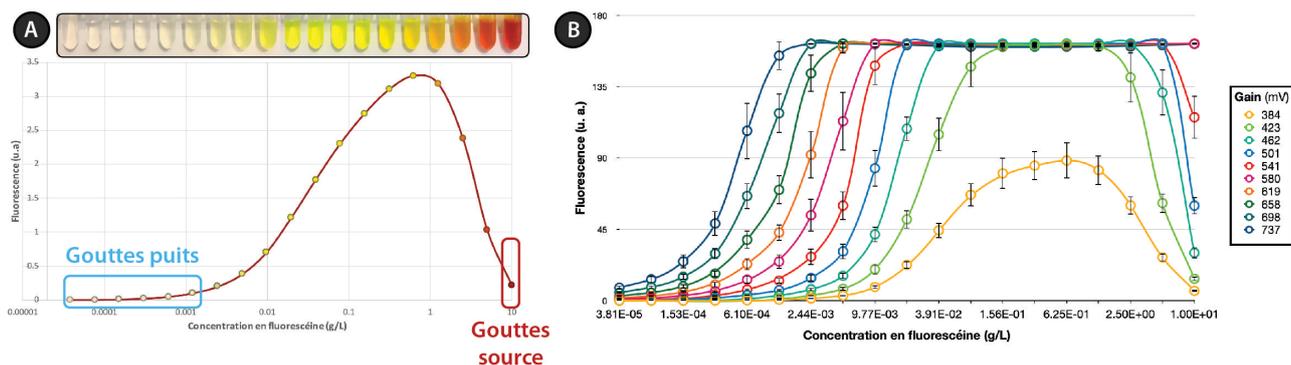


Figure IV-7 : Fluorescence d'une solution de fluorescéine en fonction de sa concentration

Ces graphiques présentent le profil de fluorescence du fluorochrome utilisé à savoir le fluorescéinate de sodium (FS) en fonction de sa concentration. A- Mesure effectuée en plaque 96-puits au Tecan et photo du gradient de couleur en tube à essai. B- Mesure effectuée dans la machine d'évolution, à différents gains. En établissant la correspondance entre signal de fluorescence et concentration en FS pour chacun des gains, il est ensuite possible de mesurer directement la concentration en FS dans chaque bioréacteur au sein de la machine d'évolution.

L'intensité de fluorescence de la fluorescéine ne varie pas linéairement avec sa concentration et diminue après une concentration critique autour de 1g/L. Ce phénomène, expliqué par l'auto-absorption du colorant [54], [74], est intéressant pour notre application car il nous permet d'utiliser une forte concentration en fluorescéine dans nos gouttes puits, sans saturer notre détecteur et sans affecter la mesure de la fluorescence des gouttes voisines. Afin d'augmenter la précision de la mesure, il est également possible, dans la machine d'évolution, de jouer avec le gain du PMT. Ainsi, et même si cela conduit à la saturation des gouttes sources à de forts gains, cela permet la détection de plus faibles quantités de fluorochrome.

Dans le protocole d'évaluation des contaminations, il a alors été choisi d'utiliser une concentration initiale de 10g/L. Avec une telle concentration dans les gouttes « source », même une contamination due au transfert d'un très petit volume sera ainsi détectée (volume inférieur au millionième d'une goutte source). De plus, nous souhaitons que notre modèle chimique soit représentatif des contaminations biologiques pouvant avoir lieu dans la machine, et la concentration de 10g/L est parfaitement adaptée à cet effet car elle possède des interactions avec l'huile et l'air très similaires à celles d'une goutte de milieu (M9) contenant des bactéries à saturation (*E. coli* 10^9 bac/mL) (Figure IV-8).

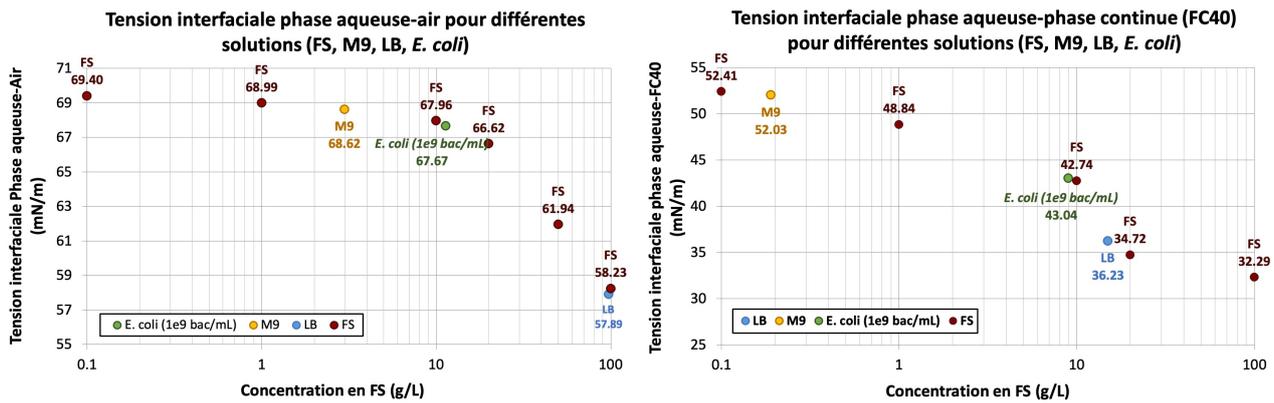


Figure IV-8 : Tensions interfaciales biologiques (M9, LB, *E. coli*) et correspondances chimiques (FS)

Ces deux graphiques représentent A- l'évolution de la tension interfaciale entre FS et Air en fonction de la concentration en FS, ainsi que la correspondance avec les fluides biologiques utilisés, à savoir : M9, LB, bactéries *E. coli* à saturation (dans du M9) et B- les mêmes mesures effectuées dans de l'huile fluorée (FC40). Ces mesures permettent d'évaluer l'affinité entre les différentes phases utilisées dans la technologie millifluidique. L'augmentation de la concentration en FS conduit à une diminution de sa tension interfaciale avec l'air comme avec l'huile : l'utilisation de fortes concentrations en FS conduiront plus facilement à l'atomisation du liquide sous formes de gouttelettes, phénomène également observé avec le LB. On note également qu'une solution de FS à 10g/L et une solution saturée en bactérie (M9+*E. coli*) possèdent une affinité similaire avec l'huile (FC40) et l'air.

En effet, les contaminations dépendent des interactions entre phase aqueuse et phase continue (et phase aqueuse-air), et plus la tension interfaciale entre ces deux fluides diminue, plus les risques de contamination augmentent. Avec des gouttes de fluorescéine à 10g/L nous nous attendons donc à observer des contaminations du même ordre que lors de la manipulation de populations saturées en microorganismes, et une corrélation directe entre modèle chimique et biologique pourra être établie.

Le modèle chimique est préférable au modèle biologique car il est plus simple à mettre en œuvre (manipulation de concentrations constantes dans les gouttes sources), et qu'il permet la détection de plus faibles échanges de matière entre bioréacteurs (dans le cas biologique, il faudrait attendre plusieurs heures que les microorganismes se divisent avant de pouvoir les détecter).

Afin de quantifier les contaminations dans la technologie millifluidique de manière simple et standardisée, un modèle a été établi dans les travaux précédents [54] : le modèle du « volume satellite équivalent » (Figure IV-9).

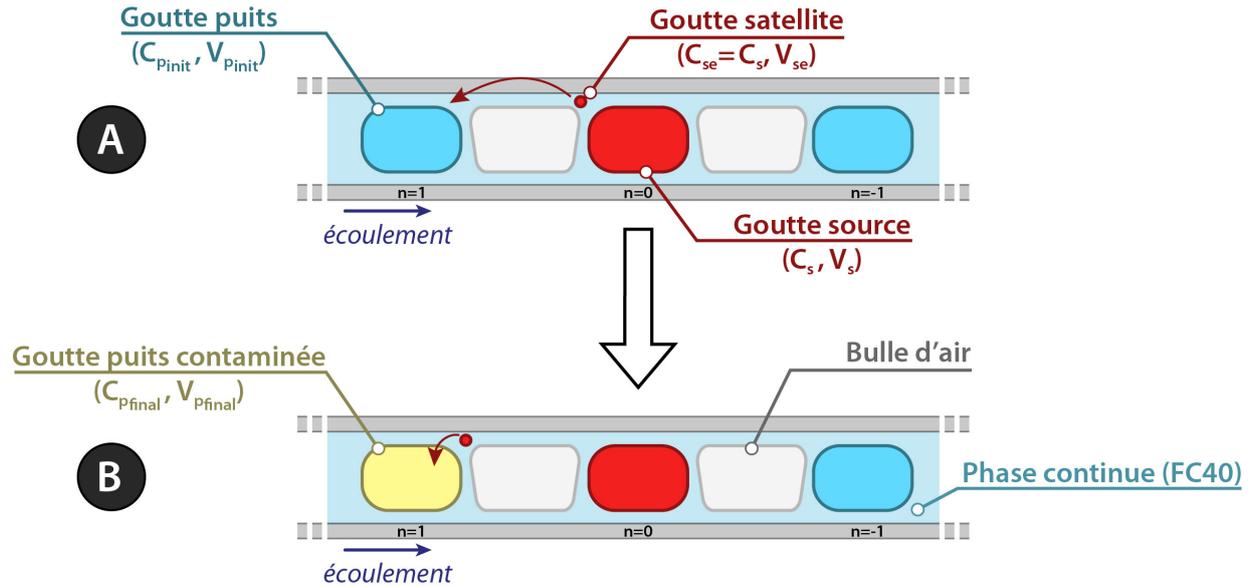


Figure IV-9 : Modèle du volume satellite équivalent

Le modèle satellite équivalent permet de quantifier le volume des contaminations en considérant qu'une contamination a lieu par transfert d'une petite goutte satellite d'une goutte source vers une goutte puits. Cette goutte satellite est donc de même concentration que la goutte source ($C_{se} = C_s$) et c'est son volume V_{se} (« volume satellite équivalent ») qui permet d'effectuer la quantification grâce à l'Équation IV-1 ci-après.

$$C_{P_{final}} * V_{P_{final}} = C_{P_{init}} * V_{P_{init}} + C_s * V_{se} \quad \Leftrightarrow \quad V_{se} = \frac{C_{P_{final}} * V_{P_{final}} - C_{P_{init}} * V_{P_{init}}}{C_s}$$

Équation IV-1 : Quantification des contaminations par volume satellite équivalent

Cette équation présente la relation entre concentrations et volumes au sein notre système et permettant d'évaluer le volume satellite équivalent d'une contamination. Concentration et volume de la goutte puits sont donnés par $C_{P_{init}}$ et $V_{P_{init}}$ avant contamination par la goutte satellite, et par $C_{P_{final}}$ et $V_{P_{final}}$ après contamination. La goutte satellite, quant à elle, possède une concentration $C_{se} = C_s$ (concentration de la goutte source) et son volume est défini par V_{se} .

Bien que toutes les contaminations n'aient pas forcément lieu par création de gouttes satellites (comme nous le verrons par la suite), ce modèle est pratique car il permet de standardiser l'étude des contaminations et de pouvoir facilement les comparer dans l'ensemble de la technologie microfluidique.

IV.2.B. Évaluation des contaminations lors des étapes de génération, d'incubation et de récupération d'un train de gouttes

Comme mentionné précédemment, avant ce travail de thèse une étude approfondie autour des contaminations a déjà été réalisée dans un système microfluidique du type du MDA, employant le même tube que celui de la machine d'évolution [54]. Cette étude a permis d'identifier les sources de contaminations inter-gouttes, ainsi que de les quantifier indépendamment lors des étapes de préparation/génération du premier train de gouttes, d'incubation, et de récupération/tri des bioréacteurs. Nous souhaitons ici en présenter les principaux résultats.

IV.2.B.1. Contaminations lors de la création du premier train

La création du premier train de gouttes peut être divisée en trois étapes :

- Préparation de la plaque à puits : étape réalisée manuellement par l'expérimentateur (en dehors de la machine)
- Génération du train à l'aide du sipper : étape semi-automatisée visant à générer le train à partir de la plaque à puits (en dehors de la machine)
- Chargement du train de gouttes dans la machine : traversée d'une jonction fluide pour permettre au train de passer du tube du sipper au tube de la machine, et entrer en circuit fermé.

La contamination lors de chacune de ces étapes a été indépendamment évaluée [54] et les résultats de cette étude sont présentés ci-dessous.

IV.2.B.1.1. Préparation de la plaque à puits

Lors du remplissage des plaques à puits, des contaminations durant le pipetage peuvent avoir lieu. Ces contaminations surviennent généralement par création de gouttes satellites suite à l'atomisation du liquide sous forme de petites gouttelettes ($V_{sc} \approx 1\text{nL}$), et les risques de contamination augmentent donc avec la diminution de la tension superficielle entre le fluide en question et l'air. Les contaminations lors de la préparation de la plaque à puits ont principalement été observées avec des solutions concentrées en fluorescéine ($C > 100\text{g/L}$) [54], dont la tension superficielle avec l'air chute ($\sigma_{FS100} \approx 58\text{ mN/m}$, voir Figure IV-8). Dans ces conditions, la proportion de puits sources induisant une contamination a été évaluée à 5%. Cependant, dès lors que la tension superficielle

augmente ($\sigma > 55\text{mN/m}$), cette probabilité chute en dessous de 0.5% [54]. Si l'on applique cette étude à la préparation de plaques biologiques, on en déduit donc que l'on aura un plus grand risque de contamination dans le cas de l'utilisation de LB ($\sigma_{LB} = 57.89\text{ mN/m}$), que de M9 ($\sigma_{M9} = 68.6\text{ mN/m}$). Ce risque dépend néanmoins de la concentration en bactérie employée, et diminuer cette concentration initiale peut être une bonne solution pour minimiser les risques de contaminations à la préparation de la plaque. La probabilité qu'un puits inoculé contamine un autre puits (lors de la préparation de la plaque) en fonction de la concentration initial en bactérie a été évaluée [54] et est représentée Figure IV-10.

Durant cette première étape de préparation de la plaque multipuits, il est donc rare que des contaminations biologiques aient lieu. Il reste tout de même intéressant, durant cette étape, de travailler avec de faibles concentrations en bactérie ($C < C_{crit} = 1\text{bactérie/nL}$), de manière à limiter ces contaminations.

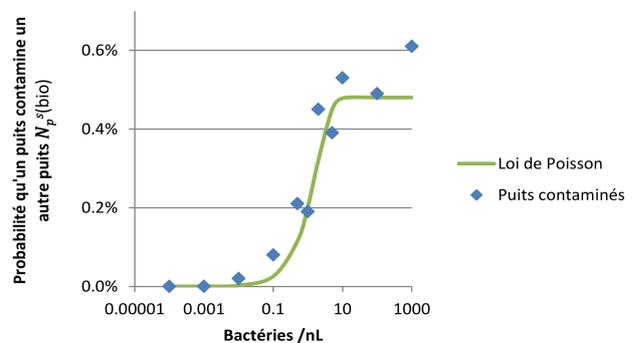


Figure IV-10 : Probabilité de contamination biologique des puits lors de la préparation d'une plaque

La probabilité qu'un puits inoculé avec des bactéries contamine un autre puits suit une loi de Poisson (dont les paramètres ont été déterminés à partir des résultats obtenus avec la fluorescéine) [54]. Dans le cas où les gouttes inoculées sont fortement concentrées, ce sont le nombre de satellites qui détermineront le nombre de contaminations. Cependant, dans le cas de gouttes peu concentrées ($C < 2\text{bactéries/nL}$), tous les satellites ne contiendront pas forcément de bactérie [54].

IV.2.B.1.2. Génération du train à l'aide du sipper

Lors de la génération du premier train, le déplacement de la tête du sipper de puits en puits (détaillé en II.2.C.2) conduit généralement à des contaminations inter-gouttes suite au mouillage de la phase aqueuse sur le tube, et ce malgré sa lubrification (qui peut être externe ou de surface, comme vu en II.2.C.2). Les différents facteurs pouvant affecter ce mouillage ont alors été identifiés puis évalués [54], à savoir : la méthode de lubrification, les dimensions du tuyau employé et de son extrémité étirée, son matériau, la taille des gouttes générées, le temps de résidence et la profondeur de pénétration dans les puits. Parmi ces différents facteurs, les seuls ayant réellement montré un impact significatif sur les contaminations sont liés au tube et à sa lubrification. Il est cependant apparu que les contaminations étaient indépendantes des autres paramètres.

A l'origine de ces contaminations, deux phénomènes ont été observés : l'un par formation de gouttes satellites ($\sim 1\text{nL}$), piégées au sein du film de lubrification (uniquement lors de la lubrification externe), et un autre lié au mouillage ($\sim 10\text{-}30\text{pL}$), mais non observable à l'œil nu (présent dans les deux cas). Ces contaminations concernent dans la majorité des cas (98%) uniquement la goutte se trouvant directement après la goutte source ($n=1$), et sont systématiques. La lubrification de surface (utilisée au cours de cette thèse) est préférable à la lubrification externe car elle permet à la fois de supprimer la formation de satellites, mais car elle est également source de contaminations plus faibles (avec un $V_{se} \approx 19\text{pL}$, contre $V_{se} \approx 31\text{pL}$ en lubrification externe). L'épaisseur du film de surface n'a cependant pas d'effet sur les contaminations.

Concernant le tuyau, il s'est avéré que l'étirement de son extrémité jouait effectivement un rôle dans le mouillage, qui serait lié à l'altération de sa surface interne (« microfissures »). L'épaisseur de sa paroi ne semble cependant pas affecter la contamination. Des tubes de différents matériaux ont été testés (FEP, PTFE, ETFE, PFA). Le FEP s'est avéré être le meilleur candidat pour cette étape [54], ce pourquoi nous l'avons également employé dans la machine d'évolution (nous verrons néanmoins que dans cette dernière ce matériau présente des inconvénients, voir IV.2.C.3)

Durant cette étape de génération du train à l'aide du sipper, les contaminations dans les gouttes suivant la goutte source sont donc systématiques, mais plus faibles que celles pouvant être induites lors de la préparation de la plaque. Utiliser de faibles concentrations en bactérie à la génération aidera toujours à réduire les contaminations, mais la bonne solution pour palier à ce problème est d'utiliser des gouttes tampons (des gouttes d'eau) entre chaque goutte inoculée. Cette stratégie peut être adoptée si l'expérience conduite est sensible aux contaminations et qu'aucun transfert de matière entre bioréacteurs n'est souhaité. Cependant, le volume transféré restant faible devant le volume des gouttes ($1/10^6$) elle n'est pas nécessaire en toutes circonstances (ex : conditions homogènes, communautés, stress suffisant).

IV.2.B.1.3. Chargement du train de gouttes : traversée d'une jonction

La génération du train de gouttes a lieu dans un premier tube, celui du sipper, qui est connecté à la machine à l'aide d'une jonction fluïdique. Pour entrer dans la machine, le train doit donc traverser cette jonction, que nous pouvons voir comme une « discontinuité » dans le chemin fluïdique (Figure IV-11), et qui peut être source de contaminations.

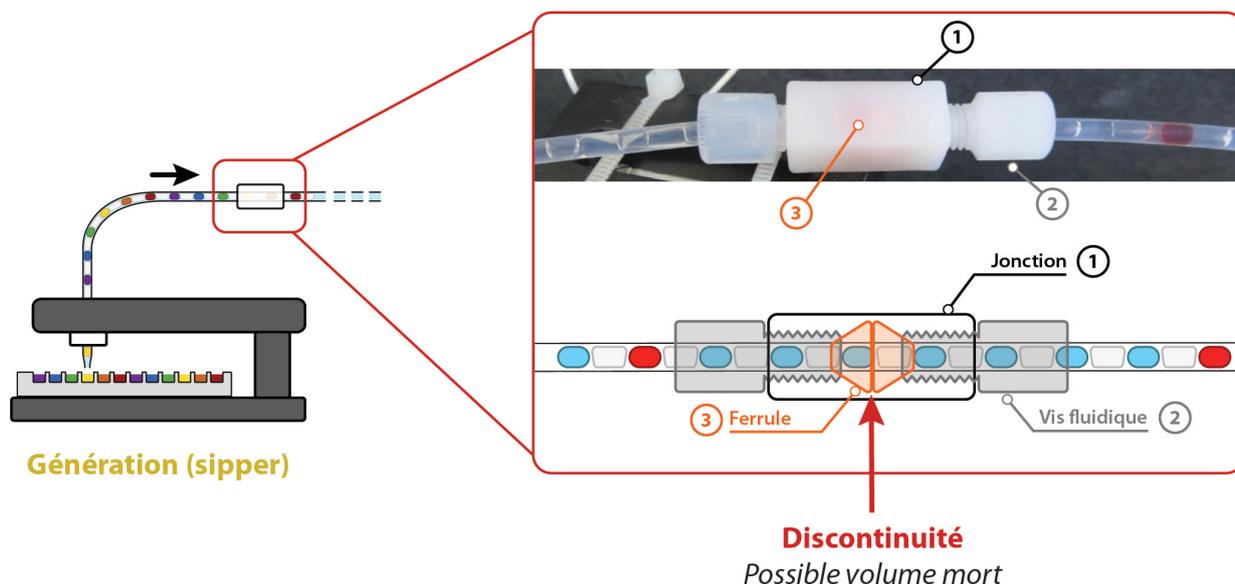


Figure IV-11 : Jonction fluïdique

Couramment utilisée en millifluïdique, ces jonctions permettent de raccorder deux circuits fluïdiques distincts. Elles permettent de mettre en contact les extrémités de deux tubes à l'aide de ferrules, qui vont se resserrer autour de l'extrémité du tube sous l'effet du vissage des vis fluïdiques dans la jonction. Le serrage conduit à l'alignement des deux tubes, et peut également conduire à une petite déformation du tube qui n'impacte généralement pas les contaminations. Cependant, le risque de contaminations vient plutôt de la coupe du tube (voir Figure IV-12 ci-après), qui, si mal réalisée, peut conduire à la présence de fibres ou à la création d'un volume mort, synonyme de discontinuité (photo [54]).

Pour évaluer les contaminations dues au passage du train au travers de ce type de jonction, la fluorescence des bioréacteurs a été mesurée juste avant la jonction, puis après un aller-retour au travers de cette dernière. La différence de fluorescence entre le signal initial (pouvant contenir des contaminations dues à la génération) et le signal final permet d'évaluer le volume satellite équivalent (V_{se}) causé par la jonction. Il s'est avéré que les contaminations sur ce type de jonctions dépendent du matériau des tubes utilisés avec, une nouvelle fois, de meilleures performances pour les tubes en FEP ($V_{se} \approx 10\text{pL}$, contre des contaminations 50x, 100x et 1000x supérieures pour le PFA, le PTFE et le ETFE)[54]. Il a également été montré que d'une jonction à une autre, le taux de contamination n'était que peu reproductible et que les niveaux de contaminations étaient très dépendants de la jonction en question (pouvant aller de 1-40pL pour une jonction entre tubes en FEP).

Au cours de ma thèse nous avons qualitativement observé que ces différences semblaient plus liées à la qualité de la coupe du tube (angle de coupe, surface de coupe, bavures) (Figure IV-12) qu'au matériau utilisé, et nous avons donc amélioré notre protocole de coupe pour minimiser ces contaminations au maximum.

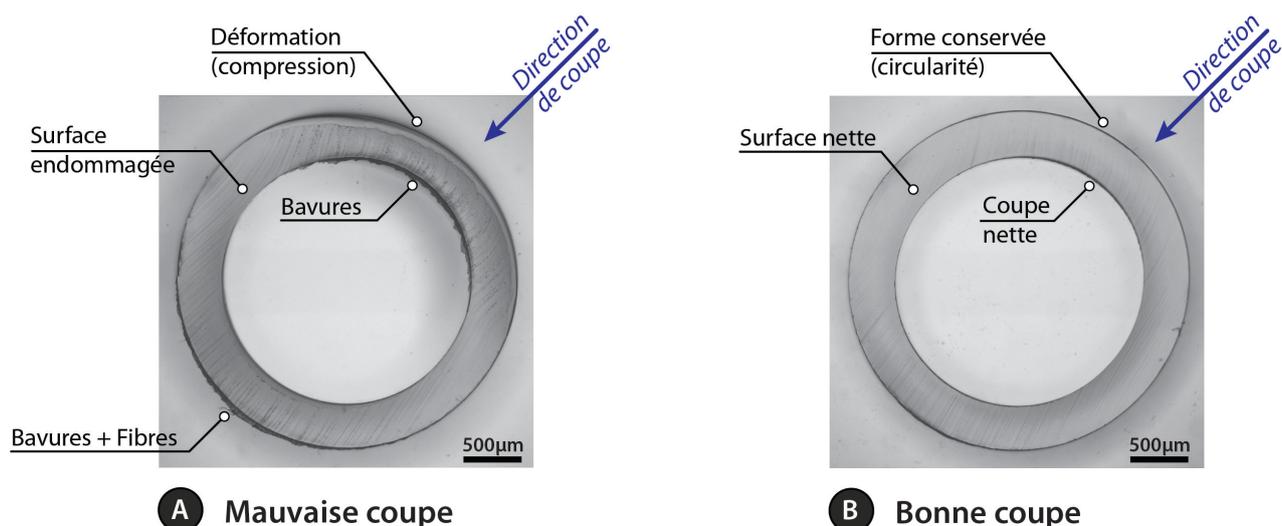


Figure IV-12 : Comparaison entre bonne et mauvaise coupe d'un tube

Ce schéma présente le résultat obtenu suite à A- une mauvaise coupe du tube, et suite à B- l'exécution du protocole mis en place au cours de cette thèse. Alors que la première méthode conduit à la déformation du tube, à l'endommagement de sa surface de coupe et à la création de bavures, la seconde permet d'obtenir une coupe nette et précise (photos A. Chaurasia).

En plus des caractéristiques de la jonction (matériau, géométrie), l'impact de la structure et la dynamique du train a également été évalué (pour une même jonction, et des tubes en FEP). Il a alors été montré que le débit imposé au train (entre 5-50mL/h) n'a pas de réel impact sur les contaminations, mais que la taille des gouttes si. A partir d'un volume critique de 25µL, le volume des contaminations est subitement multiplié 5 à 10 fois. Il est donc judicieux de manipuler des gouttes de volume inférieur à cette valeur critique, d'où le choix de manipuler des gouttes de ~20µL dans la machine d'évolution.

Les contaminations causées par la traversée d'une jonction sont donc à peu près du même ordre que celles causées à la génération par le sipper. Ce sont des contaminations affectant principalement la goutte suivant une goutte puits, et d'un volume de quelques picolitres ($V_{se} \approx 10\text{pL}$). Ce volume reste donc faible devant le volume des gouttes ($1/10^6$) mais peut affecter des gouttes vides.

La stratégie à adopter pour minimiser les contaminations lors de l'étape de création du premier train de gouttes reste alors de travailler avec de petits inoculums ($\leq 1\text{bactérie/nL}$), et, si nécessaire, de générer des gouttes tampons à la suite des gouttes inoculées.

IV.2.B.2. Contaminations lors de l'incubation d'un train

Dans la machine d'évolution (comme dans le MDA), un train passe la majeure partie de son temps en incubation. Comme décrit précédemment (voir II.2.D), ce mode consiste à la manipulation continue du train (sous forme d'aller-retour) pour permettre la croissance et l'analyse des populations microbiennes et peut durer de nombreuses heures (généralement 24-48h⁷). Étant donné l'impact des jonctions fluidiques (ou de toute autre discontinuité) sur les contaminations, la machine d'évolution (comme le MDA) a été conçu de manière à ce que l'incubation soit réalisée dans une zone ne contenant aucune discontinuité (aucune jonction, aucun changement de géométrie). Bien que, dans ces conditions,

⁷ Dans la machine d'évolution cette durée n'est en fait pas limité, grâce à l'injecteur d'air (voir III.2.C.2).

un film de lubrification soit maintenu pendant toute la durée de cette manipulation (tant que le train est en mouvement), la manipulation prolongée peut tout de même conduire à des contaminations (Figure IV-13).

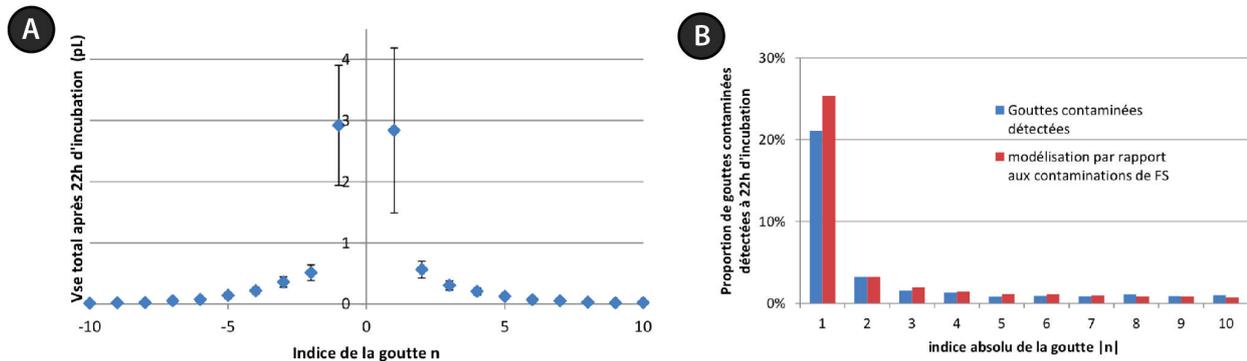


Figure IV-13 : Contaminations due à la manipulation du train lors de l'incubation

Ces deux graphes présentent les résultats des contaminations obtenues après 22h d'incubation (moyenné sur 200 mesures). Durant l'incubation, le signal de fluorescence étant suivi en continu dans l'ensemble des bioréacteurs il est aisé de pouvoir détecter et quantifier les contaminations au cours du temps A- Dans le cas de gouttes sources de FS (10g/L), les contaminations sont symétriques, et affectent principalement les gouttes directement voisines de la goutte source ($V_{se} \approx 3\text{pL}$). Des contaminations plus faibles sont néanmoins observées sur les gouttes suivantes ($V_{se} < 0.5\text{pL}$). B- Dans le cas de gouttes sources inoculées avec 100bactéries *E. coli*⁸, le même phénomène est observé. Les contaminations chimiques et biologiques semblent suivre le modèle de contamination par formation de gouttes satellites. Dans le cas de contaminations biologiques, les contaminations ne sont pas directement quantifiables, car en dessous du seuil de détection. Néanmoins, les gouttes inoculées atteignant la saturation après 6h d'incubation, il est possible de détecter les gouttes contaminées par une bactérie, qui sont, elles, détectables 5h après la contamination. Elles atteindront la saturation après 8h [54].

Les contaminations ayant lieu lors de l'incubation sont de même ordre des deux côtés des gouttes sources, et affectent principalement les gouttes voisines des gouttes sources ($n=1$ ou $n=-1$) avec des volumes de contamination plus conséquents ($V_{se} \approx 3\text{pL}$) que ceux affectant les gouttes distantes ($V_{se} < 0.5\text{pL}$). Ces contaminations peuvent donc être regroupées selon deux catégories : des contaminations de « fort » volume et de courte portée, et des contaminations de « faible » volume mais de grande portée.

Dans des conditions normales d'incubation, il a ainsi été déduit que ces contaminations sont causées par formation de gouttes satellites lors du changement de direction du train [54]. En effet, le mécanisme impliqué affecte de la même manière le transfert de molécules de fluorescéine et celui de bactéries (Figure IV-13-B), et le volume transféré correspond à celui de gouttes satellites (Figure IV-13-A). Ce phénomène pourrait être causé par les séparateurs d'air qui, se déplaçant plus rapidement que les bioréacteurs, naviguent entre ces derniers et pourraient conduire (lors du changement de direction) au détachement de microgouttes, justifiant ainsi la contamination de proche en proche. La création de ces microgouttes s'accompagnerait alors, de temps à autres, de la formation d'une goutte satellite secondaire, qui, plus petite que le film de lubrification, pourrait contaminer sur une plus grande distance que leurs ainées.

Cependant, un autre mécanisme peut également être responsable des contaminations : le mouillage. Bien que plus rare, ce phénomène peut être observé au sein d'un tube à cause, par exemple, d'une imperfection de ce dernier, ou suite à un arrêt prolongé du train (synonyme de rupture du film de lubrification). Les contaminations par mouillage possèdent généralement un impact plus important sur

⁸ Une faible concentration en bactérie est employée pour s'affranchir des contaminations dues à la génération par le sipper [54]

le transfert de matière entre bioréacteurs (volume 5-20 fois supérieur), car elles correspondent au détachement d'une partie d'un bioréacteur qui va rester attachée au tube, mais sont bien moins fréquentes. Au cours de ma thèse, ce phénomène a pu être observé lors d'incubations prolongées avec des populations bactériennes (>48h) mais n'est pas fréquent, et découle généralement d'un mauvais nettoyage du tube.

Si une contamination par mouillage survient lors d'une incubation, un nettoyage du tube suffit à se débarrasser des éléments contaminants. Ceci explique l'implémentation du nettoyage automatique des tubes à chaque cycle dans la machine d'évolution, nettoyage qui peut également récupérer d'éventuels satellites présents dans le tube.

Durant l'incubation, deux phénomènes sont donc responsables des contaminations : le changement de direction, et le mouillage (pouvant être due à une imperfection, une discontinuité, où un arrêt du train). Pour minimiser les risques de telles contaminations dans la machine d'évolution, les changements de direction ont été rendus plus souples, et le nombre de jonctions a été réduit au minimum : aucune jonction n'est présente dans la zone d'incubation. La seule « imperfection » présente dans le chemin de l'incubation est le trou réalisé pour permettre l'injection d'air (III.2.C.2) mais ce dernier s'est révélé ne pas affecter les contaminations⁹.

Les contaminations liées à l'incubation ($\sim 1/10^7$ du volume des gouttes), bien que pouvant conduire à la colonisation d'une niche vide (goutte de milieu non inoculée), n'auront pas d'impact sur une population (ou communauté) déjà présente, et peuvent donc généralement être négligées. En moyenne, une goutte voisine d'une goutte inoculée ne recevra qu'une unique bactérie lui étant étrangère au cours d'une incubation de 24h [54]. Même si l'incubation est prolongée jusqu'à 48h, cette bactérie aura du mal à affecter les millions de bactéries déjà présentes, à moins qu'elle possède une valeur adaptative bien supérieure (face à un stress donné, par exemple). L'emploi de gouttes tampon peut, encore une fois, aider à la minimisation de ces contaminations, mais n'est ici pas nécessaire.

IV.2.B.3. Contaminations lors de la récupération et du tri du train

La récupération et le tri du train sont effectués à l'aide du sipper (comme présenté en II.2.E). Le train repasse donc par le même chemin fluide qu'il a emprunté à sa génération : il traverse la jonction au travers de laquelle il est passé à son chargement, puis est évacué du tube par la tête du sipper. Les contaminations durant cette étape n'ont pas été quantifiées mais peuvent être considérées du même ordre que celles obtenues à la génération du train par le sipper, et à son chargement, à savoir un millionième du volume des gouttes, soit quelques dizaines de picolitres. Néanmoins, à cette étape, les populations seront beaucoup plus concentrées (généralement à saturation, soit $\sim 2 \cdot 10^7$ bactéries/gouttes), et le nombre d'individu transféré d'une population à une autre sera nécessairement d'un ordre bien supérieur à celui de la génération (1-2 millionièmes de la population à saturation, soit $N_{se_recup} \sim 20-40$ bactéries). La proportion de contamination reste suffisamment raisonnable pour ne pas affecter les analyses qui pourraient ensuite être conduites sur les échantillons récupérés en dehors de la machine.

⁹ Un travail de développement conséquent a été mené pour s'assurer que ce trou ne présente ni fibre, ni aspérités pouvant être source de contaminations.

IV.2.B.4. Conclusion

Pour résumer, nous pouvons retenir que les contaminations pendant l'incubation peuvent généralement être négligées ($1/10^7$ du volume des gouttes), sauf pour des niches vides sur lesquelles elles auront un réel impact. Les contaminations liées à la génération sont d'un ordre supérieur ($1/10^6$ du volume des gouttes) mais restent raisonnables et sont généralement minimisées par l'utilisation de faibles concentrations initiales, ou de gouttes tampons. Enfin, à la récupération, les contaminations sont du même ordre qu'à la génération, mais possèdent un effet plus fort dû à la présence de plus fortes concentrations. Ces niveaux restent suffisamment faibles pour que l'effet du flux génétique inter-populations soit négligeable dans une utilisation normale de la machine et n'affectent donc pas son fonctionnement. Reste maintenant à évaluer les contaminations dues au transfert des échantillons.

IV.2.C. Contaminations dues au transfert d'échantillons

Maintenant conscients des contaminations liées à la génération par le sipper, à l'incubation, et à la récupération des trains de goutte, nous souhaitons quantifier les contaminations dans le module au cœur de la technologie d'évolution : le bloc de transfert.

IV.2.C.1. Contaminations liées aux discontinuités

Comme nous venons de le voir, afin de limiter les contaminations lors de la manipulation d'un train contenant des microorganismes dans la machine d'évolution il faut minimiser le nombre de discontinuités par lequel ce dernier va passer. Dans la zone d'incubation ce nombre a été réduit à zéro, cependant, le module de transfert présente plusieurs discontinuités qui ne peuvent être retirées (Figure IV-14).

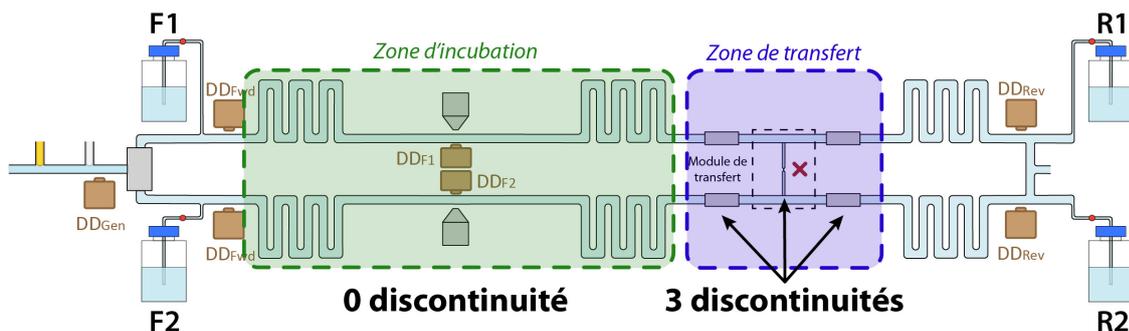


Figure IV-14 : Discontinuités dans la machine d'évolution

Lors de la réalisation d'un cycle dans la machine d'évolution, un train contenant des microorganismes n'est confronté à des discontinuités que lors de l'étape de transfert. Cependant, la complexité de ce module fait qu'il possède plusieurs discontinuités pouvant causer des contaminations (deux jonctions, et le trou du canal de transfert).

Lors de l'étape de propagation des échantillons (à l'aide du bloc de transfert), trois discontinuités dans le chemin fluide (les deux jonctions plus le trou réalisé dans le tube) peuvent donc être source de contaminations. Les jonctions vont être source de contaminations de l'ordre de celles évaluées dans les travaux passés, à savoir un millionième du volume des gouttes (dizaines de picolitres), et n'ont donc, encore une fois, que peu d'impact. Les trous réalisés dans les tubes du module de transfert peuvent, quant à eux, causer des contaminations plus conséquentes, notamment lors du

passage de population bactériennes saturées. En effet, la réalisation d'un trou dans ce genre de tube n'est pas un processus facile et conduit généralement à la présence de microfibrilles similaires à celles visibles Figure IV-12. A saturation, il n'est pas rare que les bactéries s'agrègent, sédimentent ou forment des « biofilms », et ces derniers peuvent, par contact avec les microfibrilles, conduire à la contamination inter gouttes. L'impact de ces contaminations n'a pas été évalué lors de ma thèse car ce n'est pas un phénomène reproductible et quantifiable chimiquement (il n'est pas observé lors de l'utilisation de fluorescéine, ce qui prouve qu'il est lié à un changement de structure au sein des gouttes). Il peut affecter les gouttes donneuses lors du transfert, mais n'aura qu'un faible impact lors de la propagation des échantillons.

IV.2.C.2. Contaminations liées au transfert des échantillons

En plus des discontinuités, il existe, lors de la propagation des échantillons, une nouvelle source de contamination liée au passage des échantillons dans le canal de transfert. Bien qu'un nettoyage de ce dernier soit effectué entre chaque transfert d'échantillon (par l'huile fluorée), nous avons vu que les propriétés du canal en terme de super-hydrophobicité ne sont pas aussi bonnes que celles des tubes fluorés (IV.1.B). Ces caractéristiques conduisent au mouillage des échantillons au sein du canal, et donc à la contamination inter-gouttes (un résidu du précédent échantillon transféré peut rester piégé au sein du canal, contaminant ainsi le prochain transfert, voir Figure IV-3-C).

Pour évaluer ces contaminations, tout en s'affranchissant de celles liées à la génération ou au passage dans les jonctions, un protocole équivalent à celui précédemment présenté (IV.2.A) et mettant en œuvre des gouttes sources de fluorescéine a été développé et employé (Figure IV-15).

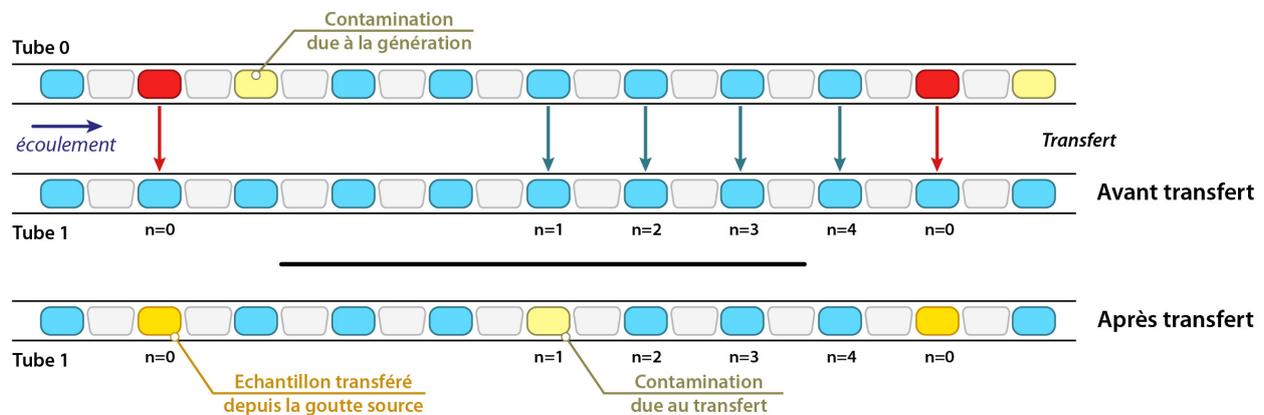


Figure IV-15 : Protocole d'évaluation des contaminations dues au transfert d'échantillons

L'évaluation des contaminations lors du transfert d'échantillons repose sur le protocole précédemment présenté (IV.2.A). Un train de 240 constitué d'une goutte source de fluorescéine ($C=10\text{g/L}$) toutes les 8 gouttes est alors employé. Ce train peut contenir de légères contaminations dans la goutte suivant la goutte source ($n=0$), et c'est pourquoi, afin de n'évaluer que les contaminations dues au transfert d'échantillons, la première goutte transférée ($n=1$) après la goutte source ($n=0$), se trouve à une distance de quatre gouttes de cette dernière. Après l'ensemble des transferts terminés, le train passe donc devant le détecteur de fluorescence pour mesure de l'ensemble des bioréacteurs et quantification des contaminations.

En ne transférant pas la goutte directement voisine de la goutte source, on s'assure que les contaminations dues à la génération ou au passage au travers des jonctions ne vont pas affecter la mesure des contaminations proprement dues au transfert d'échantillon. Après chaque transfert d'une goutte source, quatre transferts sont réalisés ($n=1-4$) afin d'évaluer la portée des contaminations issues du transfert de la goutte source (Figure IV-16).

Volumes inoculés et contaminations durant le transfert

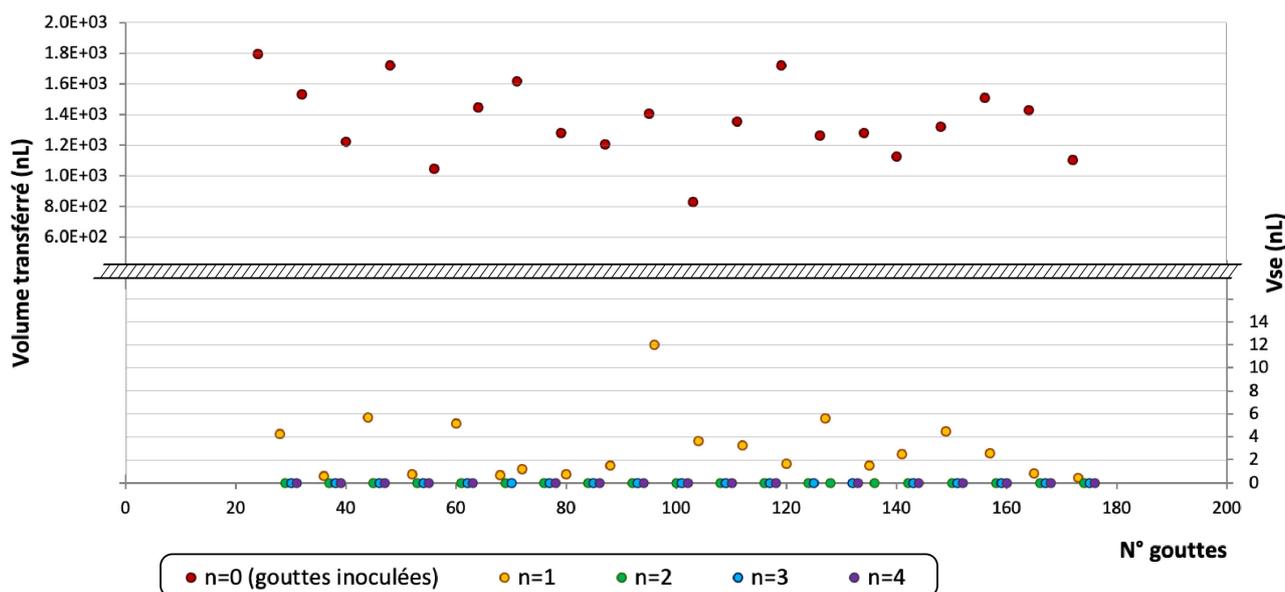


Figure IV-16 : Volumes inoculés et contaminations durant le transfert

Ce graphique représente à la fois le volume transféré depuis les gouttes sources, et le volume satellite équivalent (V_{se}) des contaminations issues de la goutte source dans les gouttes transférées suivantes ($n=1-4$), pour l'ensemble des gouttes transférées d'un train.

Cette expérience montre que, durant la propagation d'échantillons au travers du canal de transfert, il y effectivement une contamination systématique de proche en proche, d'un volume de quelques nanolitres, soit $\sim 1/10^4$ du volume de la goutte source. Les résultats des contaminations durant le transfert (en fonction de la distance à la goutte inoculée) sont résumés Figure IV-17.

Bien que le volume soit $\sim 200-2000$ fois inférieur à l'inoculum (volume typiquement transféré), l'effet du flux génétique peut se faire ressentir si une grosse diversité existe entre les deux gouttes mère transférées (exemple, transfert d'une population très adaptée face à un stress, suivi du transfert d'une goutte n'ayant pas poussé face à ce même stress). Ces contaminations n'auront donc pas d'impact dans le cas d'une expérience d'évolution dirigée (où les gouttes sélectionnées auront la même valeur sélective), mais peuvent avoir un impact lors d'une expérience de transfert en série, où il peut exister de la diversité entre gouttes donneuses. Ces contaminations étant significatives seulement de proche en proche, la diversité sur l'ensemble du train sera néanmoins maintenue.

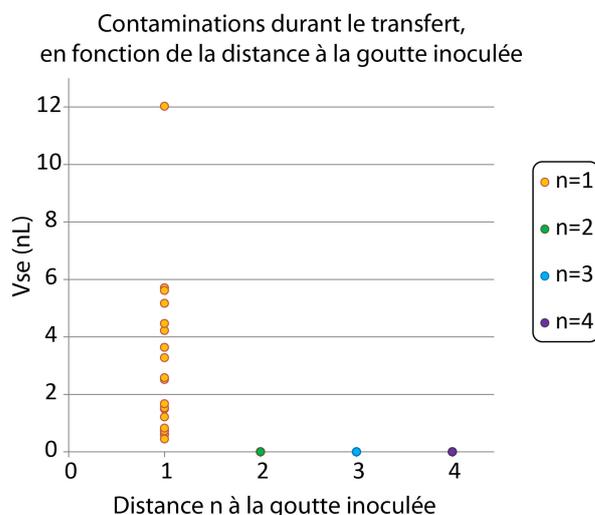


Figure IV-17 : Contaminations durant le transfert

Graphique présentant le volume satellite équivalent (V_{se}) des contaminations issues de la goutte source dans les gouttes transférées suivantes ($n=1-4$), pour l'ensemble des gouttes transférées d'un train de 200 gouttes. La propagation d'échantillon conduit à la contamination systématique des gouttes $n=1$ avec un volume de quelques nanolitres (soit $\sim 100-1000$ fois inférieur à l'inoculum), mais nous considérons qu'elle n'affecte pas les gouttes suivantes, dont la mesure est inférieure au seuil de détection (ici de 50pL).

Les résultats de cette contamination ne sont pas ici donnés pour un canal fraîchement traité mais correspondent aux résultats attendus avec un module de transfert ayant perdu de sa super-hydrophobicité. En effet, comme nous l'avons expliqué précédemment (IV.1.B), la méthode actuellement employée ne nous permet pas d'obtenir un traitement stable du canal sur le long terme. Néanmoins, dans un canal super-hydrophobique, on s'attend à voir une diminution drastique de ces contaminations, toujours dues au mouillage du canal (elles n'ont pas pu être quantifiées au cours de ma thèse, mais elles ont été qualitativement observées).

IV.2.C.3. Contaminations liées à l'arrêt des gouttes

La dernière cause pouvant être à l'origine de contaminations durant l'étape de transfert est liée à l'arrêt des gouttes. Tant que le train est en mouvement, nous avons vu qu'un film de lubrification de phase continu était maintenu entre bioréacteurs et parois du tube (II.2.C.1.1) et limitait les contaminations lors de la manipulation du train (IV.2.B.2). Cependant un arrêt des gouttes est nécessaire lors de l'étape de transfert, et ceci peut conduire, s'il est prolongé, à la rupture du film de lubrification, synonyme de mouillage du tube ou du trou réalisé dans ce dernier (où le PDMS est également exposé). Ce mouillage n'est généralement pas observé avec des gouttes d'eau, de fluorescéine ni même de milieu sans microorganismes, mais peut avoir lieu dans le cas de gouttes saturées en bactéries (d'autant plus avec le LB que le M9). Il conduira alors à la contamination inter-gouttes au sein du tube donneur, mais n'aura qu'un faible impact sur les échantillons propagés.

Bien que l'étude passée ait trouvé de meilleurs résultats pour le FEP que pour tous les autres matériaux (pour la génération au sipper, et l'incubation)[54], il a été observé (qualitativement) au cours de ma thèse que les tubes en PTFE semblaient être source de moins de contaminations lors d'une manipulation de gouttes dans la machine d'évolution. En effet, lors de l'arrêt d'un train, le FEP semble plus favoriser le mouillage que le PTFE. Une analyse quantitative n'a pas pu être conduite au cours de ma thèse et un travail global sur le mouillage dans le module de transfert devra être conduit dans l'avenir.

IV.2.D. Conclusion

Cette partie nous a permis d'identifier les différentes sources de contaminations dans la machine d'évolution ainsi que d'évaluer leur poids. L'étape de génération et de chargement du premier train peut conduire à des contaminations ($1/10^6$ du volume des gouttes) qu'il est facile de limiter (gouttes tampons, faible concentration initiale). Les contaminations liées à l'étape d'incubation ($1/10^7$ du volume des gouttes) peuvent, dans le déroulé normal d'une expérience d'évolution, généralement être négligées (elles pourront affecter des niches vides, mais cette situation généralement pas rencontrée). A la récupération des bioréacteurs (étape non systématique), des contaminations ($1/10^6$ du volume des gouttes) pourront avoir lieu de proche en proche mais n'affecteront pas le déroulé du cycle d'évolution des bioréacteurs maintenus en interne dans la machine. Finalement, de toutes les contaminations, celles induites par le transfert sont donc les plus conséquentes ($1/10^4$ du volume des gouttes), et la raison en est connue : le mouillage. Comme nous l'avons évoqué, des travaux de recherche et développement sont en cours pour palier à ce phénomène au sein de notre module mais, la présence de contaminations

n'empêche pas le fonctionnement de notre technologie, ni même le bon déroulement d'une expérience d'évolution (voir Chapitre V). Certes il serait préférable de réduire ces contaminations à zéro, et d'avoir la totale maîtrise du flux génétique dans notre système, mais si l'on travaille intelligemment, ces contaminations pourront également être minimisées. Conscients de cette limitation, il est en effet de notre devoir de concevoir les expériences d'évolution conduites dans la machine de manière à ce que ces limites n'affectent pas le bon déroulé de l'expérience. Si l'on ne travaille pas avec des conditions trop strictes, comme par exemple avec des communautés naturelles, un léger flux génétique inter-gouttes n'est pas un souci et pourrait même amener des solutions évolutives. Si l'on travaille avec différents niveaux de stress (antibiotique par exemple), une répartition intelligente des différentes conditions stressantes dans la structure du train peut également suffire à négliger ces contaminations (solution mise en œuvre dans l'expérience d'évolution conduite au cours de cette thèse, voir Chapitre V). Enfin, dans une expérience très sensible aux contaminations, il pourrait être envisagé d'utiliser des gouttes tampons (d'eau) entre toutes les gouttes inoculées à chaque cycle, pour s'affranchir des contaminations liées à notre système actuel.

IV.3. Conclusion

La caractérisation de la machine d'évolution nous a permis de montrer que le bloc de transfert - « module cœur » de cette technologie fournissant la solution pour réaliser des cycles de propagation et diriger l'évolution de populations microbiennes - présente les principales « limitations » de notre technologie actuelle, que ce soit en termes de contaminations, de contrôle de l'inoculum, ou de temps de transfert. Conscients de ces limites nous travaillons (comme nous l'avons mentionné à plusieurs reprises) à optimiser ce module, qui possède de grandes perspectives d'évolution. Il n'en demeure pas moins que, dans sa version actuelle, ce module est 100% fonctionnel et possède toutes les capacités requises pour conduire des expériences d'évolution dirigée sur des communautés microbiennes.

Le prochain chapitre s'attachera à présenter les résultats de la première expérience d'évolution dirigée conduite avec notre technologie, première preuve permettant de valider son concept, son fonctionnement, et sa capacité à diriger l'évolution.

Chapitre V :
Évolution dirigée de populations
bactériennes

V. Preuve de concept : évolution dirigée de populations bactériennes face à un stress antibiotique

La machine d'évolution fonctionne (en terme « mécanique ») et possède toutes les capacités requises pour réaliser des cycles d'évolution dirigée en assurant compartimentation, parallélisation, gestion des conditions de cultures et des pressions de sélections (aléatoire, naturelle, artificielle). Néanmoins, une application sur un cas réel (une preuve de concept) est nécessaire, afin de valider le concept de la machine et sa capacité à effectivement diriger l'évolution de populations microbiennes, finalité de cette technologie. Une telle expérience a été réalisée au cours de ma thèse, et ce cinquième et dernier chapitre vise à en présenter les résultats.

Dans un premier temps, nous présenterons le modèle expérimental (celui de l'antibiorésistance) et verrons comment, dans notre technologie, compartimentation et parallélisation peuvent être mises à profit pour cribler différentes conditions de croissance sur des centaines de populations bactériennes en parallèle. Nous verrons également le rôle primordial que jouent acquisition et analyse des données en continue dans notre technologie. Dans un second temps, nous verrons comment la propagation de nos populations par transfert en série permet d'étudier l'impact d'une première étape de stress sur l'adaptation des populations. Nous montrerons également que notre technologie est bien dimensionnée pour permettre l'apparition et la sélection de mutants. Enfin, dans un dernier temps, nous mettrons à profit la sélection artificielle pour diriger l'évolution de nos populations. L'intérêt de la compartimentation et de la parallélisation sera alors une nouvelle fois mis à l'honneur, et permettra de montrer la capacité de notre technologie à diriger l'évolution tout en explorant un maximum de chemins évolutifs possibles.

V.1. Croissance de populations bactériennes face à un stress antibiotique et mesure d'adaptabilité

Le modèle expérimental choisi pour la réalisation de cette première expérience d'évolution dirigée conduite dans notre technologie est celui de l'antibiorésistance qui, comme nous l'avons mentionné au début de ce manuscrit (I.2.C), est un problème courant de notre temps.

Avant d'entrer dans le vif de l'expérience d'évolution conduite avec notre technologie, nous souhaitons, dans un premier temps, introduire le modèle expérimental choisi (choix de l'antibiotique, de la souche, du milieu de culture...) et présenter les résultats des expériences préliminaires (mesures de MIC, de stabilité de l'antibiotique) qui, bien que conduites en dehors de la machine, sont nécessaires à la construction de notre expérience. Nous présenterons ensuite les résultats de la première étape de notre expérience d'évolution consistant à cribler la croissance de centaines de populations bactériennes soumises à différents niveaux de stress antibiotique.

V.1.A. Modèle expérimental : L'antibiorésistance

Pour la réalisation de notre preuve de concept, nous avons choisi de nous inspirer des expériences de Baym et al. [29] ainsi et de Toprak et al. [35] présentées au premier chapitre de cette thèse (I.3.B.1) et illustrant le cas de l'acquisition d'une antibio-résistance chez des populations d'*E. coli*.

Ces deux expériences étudient l'adaptabilité de bactéries *E. coli* face à un même antibiotique, la triméthoprime (TMP), et nous avons donc trouvé intéressant de baser notre modèle sur le même système, impliquant cet antibiotique dont le mécanisme d'action est bien connu [75]. La TMP est un agent bactériostatique, généralement utilisé dans le traitement de cystites causées par *E. coli*. Elle agit par inhibition de la dihydrofolate réductase, enzyme catalysant la réduction de la dihydrofolate en tétrahydrofolate (ou vitamine B9), nécessaire à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques (et donc, des bases azotées) mais également des acides aminés. La TMP stoppe donc la croissance bactérienne par inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN) ainsi que des protéines.

Dans notre application, les intérêts de l'utilisation de la TMP sont multiples. Premièrement, l'effet bactériostatique est intéressant car il va seulement inhiber la croissance des individus de nos populations et non pas les tuer comme le ferait un agent bactéricide. Ainsi, en cas de non croissance d'une population, le stress peut être relaxé (par propagation dans un milieu moins stressant, par exemple) pour lui permettre de croître à nouveau, au lieu qu'elle s'éteigne. Deuxièmement, et comme nous l'avons évoqué au premier chapitre (I.3.B.1), la TMP est très ciblée et n'affecte principalement qu'un seul gène cible, le *folA*. Ceci conduit à une acquisition d'antibiorésistance très échelonnée et reproductible, ce qui nous permettra d'identifier aisément, à partir de notre lecture phénotypique, la présence de mutants. Enfin, notre choix s'est également porté sur cet antibiotique en raison de sa grande stabilité dans le temps et de sa résistance à la température [29], [35]. Après un mois de maintien dans nos conditions expérimentales, la valeur du MIC s'est retrouvée multipliée par deux mais, l'antibiotique étant renouvelé à chaque cycle dans notre expérience d'évolution, cet effet n'a ici aucun impact.

Pour nos cultures nous avons décidé d'utiliser la même souche de *E. coli* que celle utilisée par Baym et al., à savoir *E. coli* *ΔlacA* de la collection Keio (collection issue de la souche *E. coli* K-12 BW25113)[26], souche possédant une résistance à la kanamycine. Celle-ci était alors cultivée à 37°C dans un milieu minimal (M9 + MgSO₄ + CaCl₂ + 0.4% glucose) avec kanamycine (à 25 μg/mL pour éviter les contaminations extérieures), mais sans acides casaminos, car le niveau d'inhibition de la TMP s'est révélé dépendre de la composition du milieu de culture utilisé, pouvant être une source exogène d'adaptation. En effet, il a été montré que la présence de certains métabolites (acides aminés, ...), et notamment de thymidine, inverse partiellement l'effet de la TMP en contournant son mécanisme d'inhibition, et aidant ainsi à l'adaptation des bactéries [75], [76].

Maintenant les conditions de cultures déterminées, et avant de rentrer dans la machine, il est important de procéder à une première étape de caractérisation de notre système en dehors de cette dernière. En effet, comme nous l'avons mentionné précédemment (I.2.C.2.2), le descripteur permettant d'évaluer la résistance de bactéries face à un stress antibiotique (ou l'efficacité d'un antibiotique face à des bactéries) est la mesure de MIC. En suivant le protocole expérimental détaillé en I.2.C.2.2 [32][58], nous avons donc procédé à la mesure du MIC de référence. Dans nos conditions de culture, nous mesurons un MIC à 0,49 μg/mL (Figure V-1, point rouge). Or, la mesure standard est effectuée avec

5.10⁴ bactéries/puits [32], et dans notre technologie, l'inoculum à chaque cycle de propagation se trouve être d'un dixième de la population à saturation, soit autour de 3,2.10⁶ bactéries/gouttes. La taille de l'inoculum ayant un impact sur la mesure du MIC [77], nous avons ici réalisé la mesure pour plusieurs tailles d'inoculum afin de savoir dans quelles conditions commencer notre expérience d'évolution (Figure V-1).

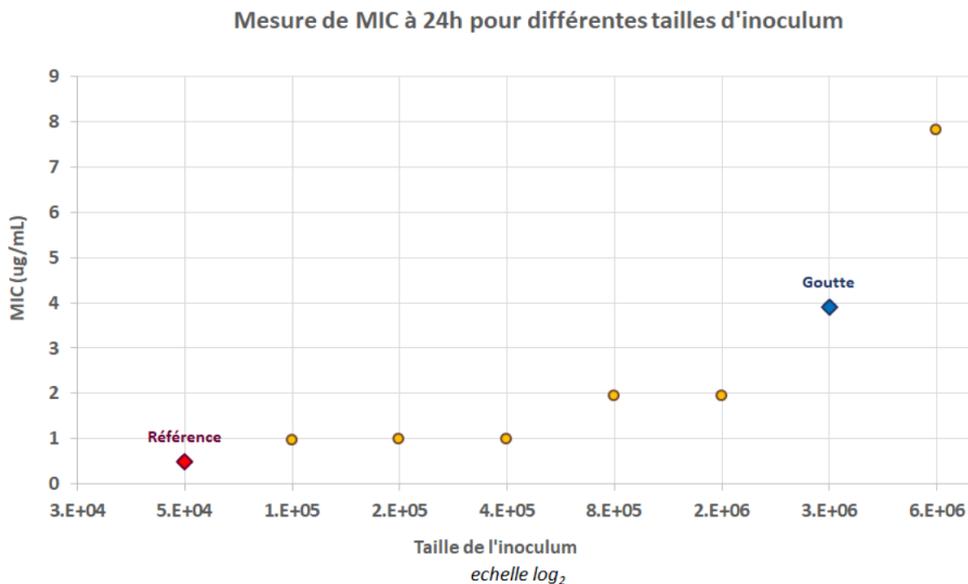


Figure V-1 : Mesure de MIC pour différents inoculums

Ce graphique présente les résultats des mesures de MICs obtenues sur plaque pour différentes tailles d'inoculum. La mesure du MIC de référence est représentée par un marqueur rouge, celle du MIC pour l'inoculum utilisé en gouttes par un marqueur bleu.

Cette première étape de caractérisation de notre système expérimental est importante car elle permet d'évaluer le comportement attendu dans la machine d'évolution. Avec l'inoculum utilisé en gouttes, on devrait donc s'attendre à obtenir une mesure de MIC autour de 8xMIC de référence. Dans la suite de ce manuscrit, les valeurs employées feront référence à la mesure de standard du MIC, sauf en cas de précision.

Ce travail préliminaire de « construction » de notre système expérimental nous a permis de définir l'antibiotique, le milieu, les bactéries utilisées, ainsi que d'en réaliser une première caractérisation, en dehors de la machine d'évolution.

Maintenant les bases du modèle expérimental introduites, nous présenterons, dans la suite de ce chapitre, l'expérience d'évolution conduite dans notre technologie.

V.1.B. Croissance bactérienne en présence d'antibiotique

V.1.B.1. Croissance bactérienne en gouttes

La première étape de notre expérience d'évolution consiste à « caractériser » notre système, c'est à dire, dans le cas d'un stress antibiotique, à voir comment les populations cultivées dans la machine réagissent face à différents niveaux de stress antibiotiques (soit différentes concentrations en antibiotique). Cette étape permettra également de prouver que notre technologie est apte à cultiver et analyser des centaines de populations microbiennes en parallèle.

Pour cela, plusieurs concentrations en TMP sont appliquées sur un ensemble de 192 gouttes (12 concentrations, 16 gouttes par concentration), toutes inoculées avec $3,2 \cdot 10^6$ bactéries, et leur incubation est réalisée durant 48h à 37°C. Durant toute cette période, une mesure de la densité optique est réalisée en continue (selon la méthode détaillée en III.2.C.3) et nous permet de suivre, en temps réel, la croissance bactérienne dans chacun des bioréacteurs (Figure V-2).

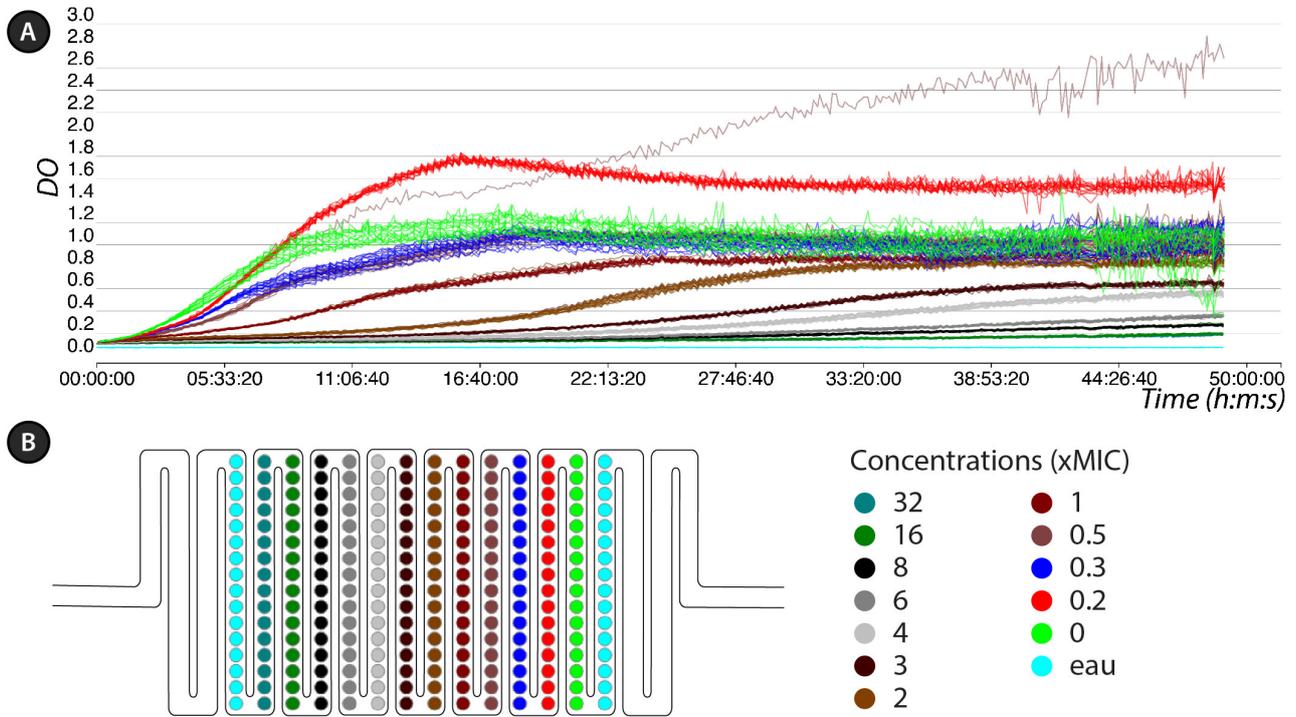


Figure V-2 : Croissance bactérienne (*E. coli*) en présence de stress antibiotique (TMP) de différentes intensités

La valeur de MIC mesurée sur plaque pour un inoculum correspondant à celui utilisé dans la machine d'évolution étant de $4 \mu\text{g/mL}$ (voir Figure V-1, point bleu), nous avons décidé de travailler avec un gradient (discret) de 12 concentrations, choisies autour de cette valeur. La machine d'évolution ayant la capacité de manipuler environ deux cents gouttes, chaque concentration est appliquée à 16 gouttes (soit 16 répliques par concentration), dans lesquelles $3,2 \cdot 10^6$ bactéries sont inoculées. Ces 192 gouttes inoculées font partie d'un train de 224 gouttes (B) dont les 16 premières et les 16 dernières sont des gouttes d'eau (tampons). Une incubation de ce train est réalisée à 37°C pendant 24h et la croissance de chacune de chacune des populations est mesurée par densité optique (A).

Suite à l'incubation des 192 populations bactériennes, nous obtenons donc un ensemble de courbes de croissance, traduisant directement la valeur adaptative (ou « fitness », de l'anglais) de chacune des populations face à sa concentration en antibiotique respective. A première vue, l'augmentation du stress antibiotique semble diminuer le taux de croissance de nos populations (pente qui diminue), et leur rendement final (concentration en bactérie à saturation qui diminue). L'impact sur le temps de latence est quant à lui difficile à déterminer. Si l'on s'intéresse à la valeur du MIC dans la machine d'évolution, en regardant nos courbes à 24h, l'antibiotique semble inhiber la croissance bactérienne à partir d'une valeur entre 8x et 16xMIC, valeur correspondante à la concentration inhibitrice mesurée sur plaque pour un même inoculum, qui est de 8xMIC (Figure V-1, point bleu).

V.1.B.2. Analyse phénotypique et mesure d'adaptabilité

Une analyse rapide des courbes telle que celle que nous venons d'effectuer nous permet d'identifier les paramètres principaux sur lesquels le stress antibiotique joue mais reste, en soi, plutôt qualitative. Or, notre technologie possède l'avantage considérable de pouvoir suivre avec précision la croissance de chacune des populations cultivées dans la machine, et il est donc dans notre intérêt de mettre à profit cet avantage pour en tirer le plus d'informations possibles. Pour cela, et de manière à automatiser l'analyse des courbes obtenues à chaque cycle, nous avons développé un algorithme nous permettant de mesurer taille de l'inoculum (N_0), temps de la phase de latence, temps de division (ou taux de croissance), et rendement final pour n'importe qu'elle courbe de croissance issue de la machine (Figure V-3).

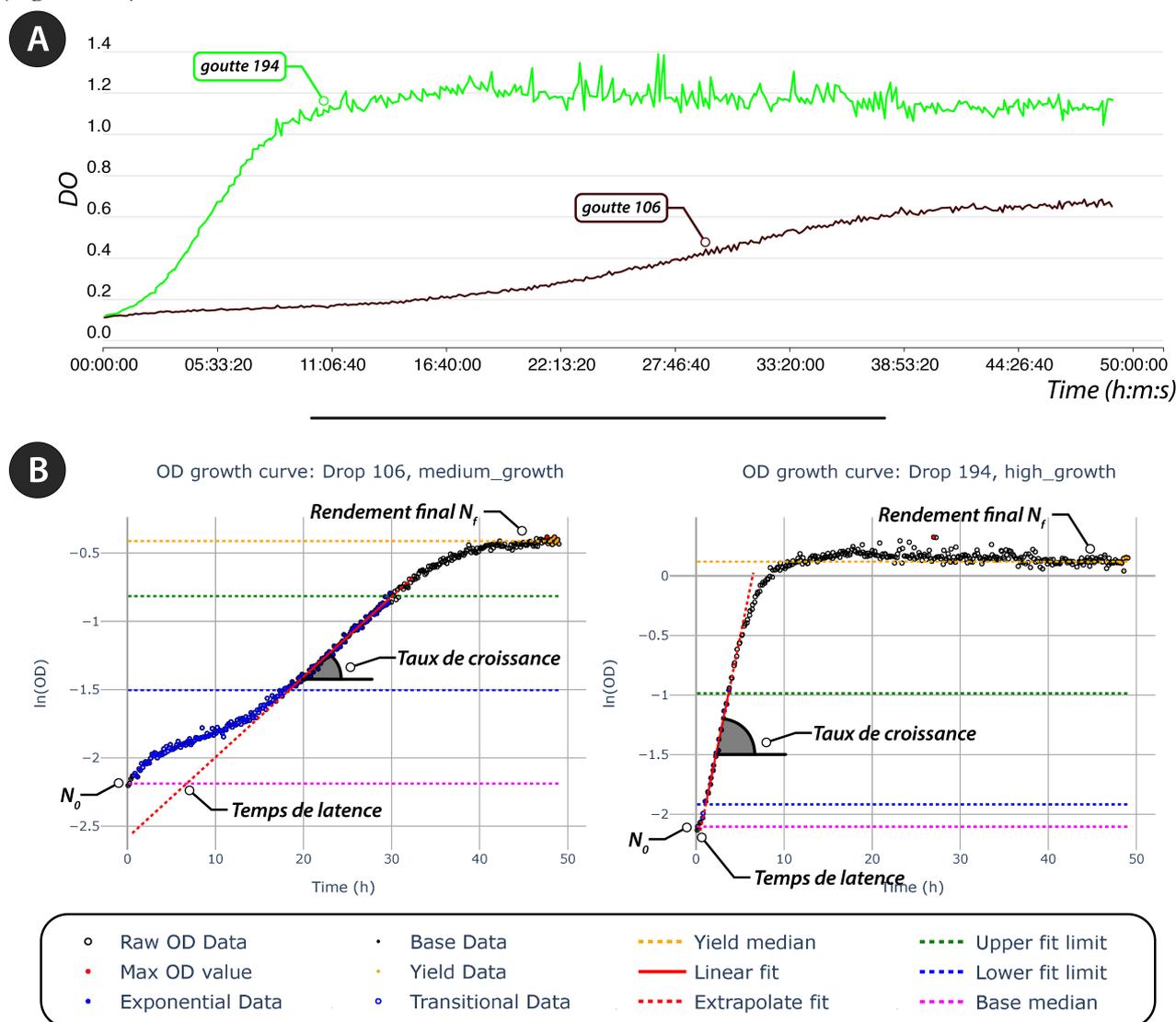


Figure V-3 : Évaluation des paramètres de croissance par modélisation des courbes de croissance

Cette figure présente notre méthode d'évaluation des paramètres de croissance pour deux courbes de croissance : une forte croissance (goutte 194) et une croissance plus faible (goutte 106). Notre algorithme permet d'évaluer inoculum et rendement final directement à partir des courbes de croissance obtenues dans la machine d'évolution (A). Ensuite, le taux de croissance est automatiquement mesuré (B) en linéarisant la courbe de croissance (transformation logarithmique), en identifiant la phase de croissance exponentielle et en modélisant la fonction affine correspondante (voir Équation V-1 ci-après). À partir du modèle linéaire, il est alors possible de déterminer le temps de latence, intersection entre l'inoculum et la fonction linéaire. Si le taux de croissance (ou pente) est trop faible, cette mesure de temps de latence n'est pas reproductible.

Lors de cette analyse automatisée, l'inoculum N_0 et le rendement final N_f sont directement mesurables sur les courbes de croissance, et correspondent ici à la médiane mesurée sur les vingt premiers (respectivement derniers) points. Pour déterminer le temps de division, chacune des courbes de croissance est soumise à une transformation logarithmique (Figure V-3-B) permettant de linéariser la phase exponentielle selon l'Équation V-1.

$$N(t) = N_0 * 2^{\frac{t}{G}} = N_0 * e^{\ln(2) * \frac{t}{G}} \quad (1)$$

$$\Leftrightarrow \ln(N(t)) = \ln(N_0) + \frac{\ln(2)}{G} * t \quad (2)$$

Équation V-1 : Linéarisation de la phase exponentielle des courbes de croissance

L'équation (1) présente la croissance exponentielle d'une population, l'équation (2) sa linéarisation par transformation logarithmique. Dans ces équations $N(t)$ représente le nombre total de bactéries, N_0 représente le nombre de bactéries initialement présentes au départ de la phase exponentielle, G représente le temps de division et t représente le temps. Une fois linéarisée, l'équation (1) donne une fonction affine du type $y=b+a*t$, où $a=\ln(2)/G$, soit $G=\ln(2)/a$ et $b=\ln(N_0)$.

L'algorithme mis en œuvre détecte alors la phase de croissance exponentielle (ici linéaire) et l'approche par une fonction affine (sur environ une décade) nous permettant d'estimer de manière précise le temps de division, correspondant au rapport $\ln(2)/a$, où a est la pente de la fonction affine (Figure V-3-B). Pour déterminer le temps de latence, il suffit alors de regarder l'intersection entre la valeur de l'inoculum mesurée et la fonction affine modélisée.

En s'intéressant à chacun de ces paramètres en fonction de la concentration en antibiotique appliquée, il devient ensuite plus simple d'analyser l'ensemble des courbes obtenues (Figure V-4).

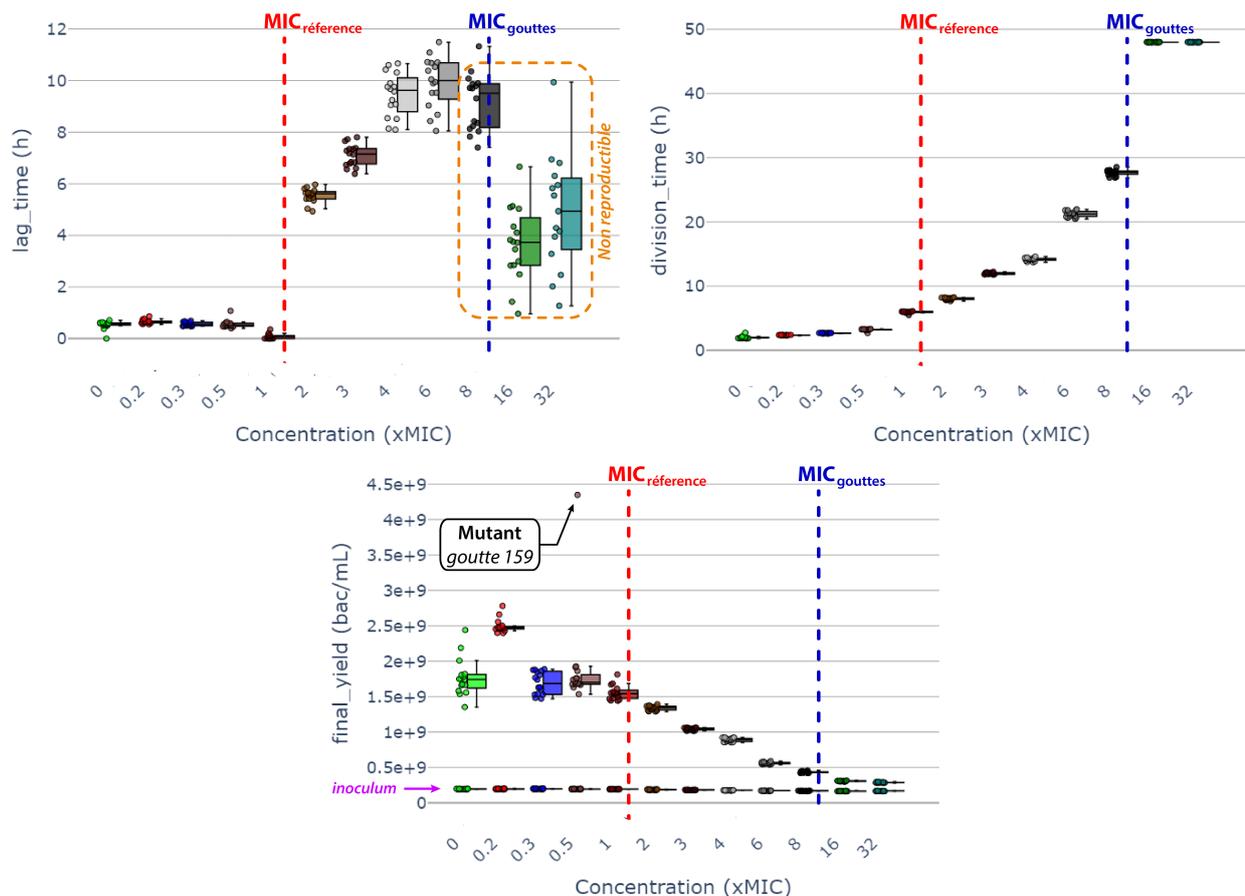


Figure V-4 : Évolution des paramètres de croissance d'*E. coli* en fonction de la concentration en TMP

Chacun de ces graphes représente un paramètre de la croissance (temps de latence, temps de division, rendement final), pour l'ensemble des populations soumises à une même concentration en antibiotique. Ces diagrammes en boîte représentent donc à la fois la valeur du paramètre en question pour chacune des populations (sous forme de points) et la répartition des valeurs de chacune des métapopulations (ensemble des populations) soumises à une même concentration en antibiotique (sous forme de boîtes). Les boîtes donnent la valeur médiane, les 1^{er} et 3^{ème} quartiles, les valeurs minimale et maximale (ou fréquence maximale). La ligne rouge tracée sur chacun des graphes correspond à la valeur du MIC de référence mesurée sur plaque et la ligne bleue à la valeur du MIC mesurée sur plaque pour un inoculum similaire à celui employé dans la machine, soit une valeur de 8xMIC de référence. La mesure du temps de latence pour les courbes ne présentant pas de croissance n'est pas reproductible (encadré orange), comme expliqué sur la Figure V-3.

A faible concentration (<1xMIC), l'effet de l'antibiotique sur la croissance des populations semble négligeable sur le temps de latence (variant entre 30min et 40min) mais se fait tout de même ressentir sur le temps de division qui augmente de plus d'une heure entre 0 et 0.5xMIC ($G_0=1h50$ à $G_{0.5}=3h10$). Sur le rendement final, en revanche, un effet est notable sur les populations soumises à une concentration de 0.2xMIC, qui voient leur biomasse finale augmenter de 40% par rapport aux contrôles¹⁰ (populations non soumises à un stress antibiotique, C=0xMIC). Il semblerait qu'à cette concentration particulière, le stress soit bénéfique et favorise le métabolisme des bactéries, en leur permettant une optimisation de leur biomasse. Aussi, nous voyons l'apparition d'un mutant dans une des gouttes soumises à un stress de 0.5xMIC (la goutte 159), qui, bien que possédant le même temps de latence et de division que ses semblables, possède une biomasse finale 3 fois plus élevée. Ce mutant ne

¹⁰ les deux valeurs mesurées sont statistiquement différentes (t-test)

semble pas plus adapté au stress antibiotique que ses semblables (la suite de notre expérience le confirmera, V.2.A) mais semble simplement avoir acquis la possibilité de métaboliser un substrat que les autres ne métabolisent pas. Notre intérêt étant d'évaluer l'adaptabilité face à un stress antibiotique, nous n'avons pas cherché à comprendre quel était le mécanisme sous-jacent cette adaptabilité qui, comme nous le verrons par la suite (V.2.A), n'était pas bénéfique face au stress antibiotique.

A partir d'une valeur de $1 \times \text{MIC}$ l'effet de l'antibiotique se fait en revanche fortement ressentir sur l'ensemble des paramètres de la croissance que sont : temps de latence, temps de division et rendement final. Le temps de division semble varier linéairement avec la concentration en antibiotique jusqu'à une concentration de $8 \times \text{MIC}$, passant ainsi de $G_1=6\text{h}$ à $G_8=28\text{h}$. Cette dernière valeur démontre qu'à 24h, dans les populations à $C=8 \times \text{MIC}$ (soit la valeur de MIC mesurée sur plaque pour inoculum identique à celui en gouttes, $C=4\mu\text{g/mL}$), il n'y a pas de croissance. Ce résultat concorde avec celui mesuré sur plaque et confirme le rôle de la taille de l'inoculum dans l'adaptabilité des populations. Au-delà de cette concentration, les populations possèdent des temps de division supérieurs à la durée de l'incubation, ce pourquoi elles ne poussent pas (nous limitons alors leur valeur à 48h, soit la durée de l'incubation).

Concernant la mesure des tailles des inoculums, de faibles variations ($\pm 10\%$) sont observables sur la génération de ce premier train (due au sipper) mais n'affectent pas les autres paramètres de croissance (voir Annexe IV).

Cette première étape de notre expérience permet également de mettre en évidence la répétabilité de nos mesures, qui, sur 16 répliques par concentrations, donnent des résultats très reproductibles pour chacun des paramètres. Comme nous venons de l'évoquer, de la variabilité est uniquement observée sur le temps de latence pour les populations soumises à de forts stress antibiotique, ou sur le rendement final pour les populations soumises à de faibles stress.

La variabilité observée sur la mesure du temps de latence à de fortes concentrations est due au fait que la croissance de ces populations est très faible, voire nulle. Un taux de croissance très faible (ou temps de division très long) est synonyme d'une pente très faible, et conduit à une difficulté pour déterminer le temps de latence de manière précise, causant une erreur de mesure accrue (voir Figure V-3).

Sur le rendement final, en revanche, de la variabilité est observée pour de faibles concentrations en antibiotique. Ici, ce phénomène n'est pas lié à la méthode de mesure (très fiable pour le rendement final), mais résulte de la réponse phénotypique des populations, qui, lorsque peu ou non soumises à un stress, vont présenter de la diversité. Nous mesurons en effet, dans nos gouttes, un comportement phénotypique moyen, mais différents comportements peuvent être présents au sein d'une même population. Le stress antibiotique, lorsqu'il est suffisant (ici $>1 \times \text{MIC}$), aide alors à l'uniformisation des comportements phénotypiques au sein des populations. En revanche, suite à la présence d'une mutation bénéfique, une population peut s'écarter du comportement phénotypique moyen de sa métapopulation, exemple parfaitement illustré par la goutte 159 dans le cas présent.

V.1.B.3. Reproductibilité de l'expérience et de l'analyse

Pour vérifier que l'ensemble des résultats obtenus à cette première étape de notre expérience d'évolution soient bien reproductibles, nous avons réalisé cette expérience à deux reprises dans la machine d'évolution. Une comparaison des résultats obtenus est donnée ci-dessous (Figure V-5).

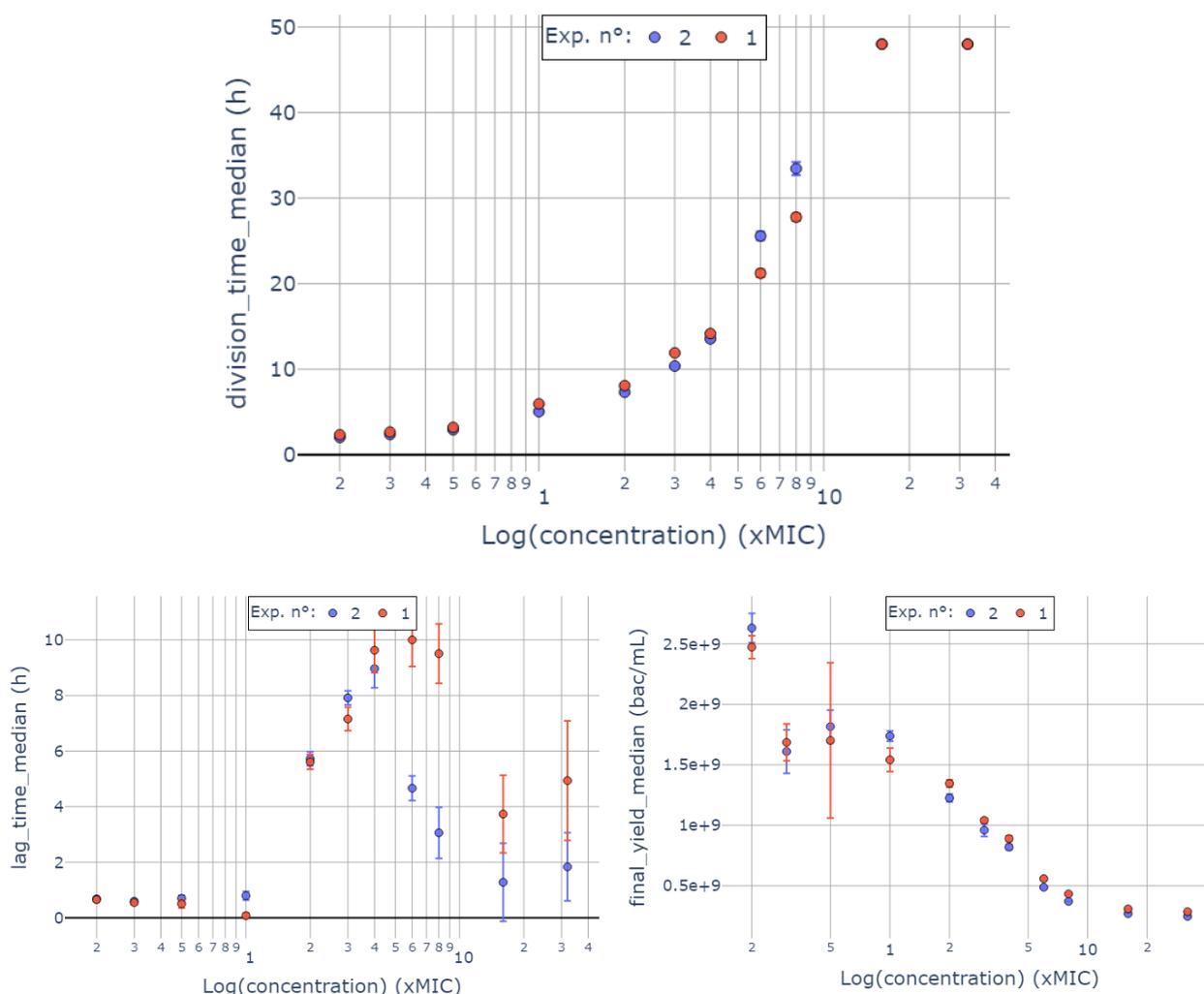


Figure V-5 : Réproductibilité de la croissance et de l'analyse en gouttes

Ces graphiques représentent l'évolution de la valeur moyenne mesurée sur chacun des paramètres de croissance (temps de latence, temps de division, rendement final) pour chacune des métapopulations, en fonction de leur concentration, pour les deux expériences identiques conduites dans la machine d'évolution. Les barres d'erreur représentent l'écart type des valeurs.

En répétant cette première étape, on observe des comportements phénotypiques similaires pour chacune des métapopulations.

Le temps de division varie de la même façon pour les deux expériences, avec des mesures quasi-identiques, prouvant à la fois la reproductibilité de la réponse phénotypique des bactéries en termes de taux de croissance, ainsi que la répétabilité de notre mesure sur ce paramètre. Cette seconde expérience vient donc confirmer la valeur du MIC à $C=4\mu\text{g/mL}$ (soit $8x\text{MIC}$ de référence).

Sur le rendement final, on s'aperçoit que les fluctuations déjà observées lors de la première expérience pour de faibles stress antibiotique sont à nouveau notables lors de la deuxième expérience. Cette observation vient confirmer le fait qu'un faible stress ($C \leq 1x\text{MIC}$) laisse place à de la diversité phénotypique tandis qu'un stress plus fort ($C > 1x\text{MIC}$) uniformise la réponse phénotypique des

populations. À $C=0.2 \times \text{MIC}$, on observe une nouvelle fois une augmentation de 40% de la biomasse par rapport aux contrôles, ce qui confirme que ce phénomène est bien lié à une réponse phénotypique des populations.

Finalement, sur le temps de latence, nous pouvons observer une divergence des valeurs d'une expérience à l'autre pour de forts stress antibiotiques. Comme nous l'avions justifié précédemment, pour ces concentrations (supérieures au MIC) où le taux de croissance est très faible, l'évaluation du temps de latence n'est pas aisée et peut conduire à des erreurs de mesures considérables, ici observables sur la deuxième expérience.

Hormis sur le temps de latence, où des erreurs de mesures sont présentes pour de faibles taux de croissance (comme expliqué Figure V-3), les résultats de ces deux expériences concordent et donnent une valeur de MIC identique, prouvant ainsi la répétabilité de l'expérience et de nos mesures. En conclusion de cette comparaison il faut donc retenir que, bien que la mesure du temps de latence ne soit pas fiable pour de faible taux de croissance, temps de division et rendement final sont deux paramètres fiables sur lesquels nos analyses peuvent être basées. Dans la suite de notre expérience d'évolution, nous nous concentrerons donc principalement sur le temps de division et le rendement final pour évaluer la valeur adaptative de nos populations face au stress antibiotique imposé.

V.1.C. Conclusion

Cette première étape de notre expérience d'évolution nous a permis de mieux comprendre comment le stress antibiotique impactait la croissance de populations bactériennes, ainsi que de vérifier que la mesure de MIC réalisée dans la machine d'évolution correspondait bien à celle effectuée sur plaque pour un même inoculum. Cette étape démontre également les capacités de notre technologie à cultiver et cribler des centaines de populations bactériennes soumises à différentes conditions de cultures en parallèle, tout en permettant une mesure précise et reproductible de leur valeur adaptative, basée sur l'analyse phénotypique de leur croissance en temps réel.

Maintenant la première étape de notre expérience d'évolution terminée, nous souhaitons en présenter la seconde, dans laquelle l'innovation de rupture de notre technologie, le module de transfert, a été mise en œuvre pour procéder à la propagation par transfert en série de l'ensemble des populations bactériennes cultivées à cette première étape.

V.2. Propagation par transfert en série et sélection naturelle de mutants

V.2.A. Impact d'une première étape de stress sur l'adaptation face à une concentration sup-MIC

La seconde étape de notre expérience d'évolution vise à évaluer comment les différents niveaux de stress appliqués sur les populations au premier cycle de notre expérience influencent leur adaptabilité lorsqu'elles sont ensuite exposées à une concentration supérieure à la concentration inhibitrice. Cette seconde étape permettra également de valider l'aptitude de notre technologie à propager, par transfert en série, des centaines de populations bactériennes pour la réalisation de cycles d'évolution.

Pour cela, chacune des populations est propagée par transfert en série dans un nouveau bioréacteur ayant une concentration de 16xMIC (concentration à laquelle la croissance bactérienne était inhibée au premier cycle), et les populations sont maintenues en culture pendant 48h à 37°C (Figure V-6).

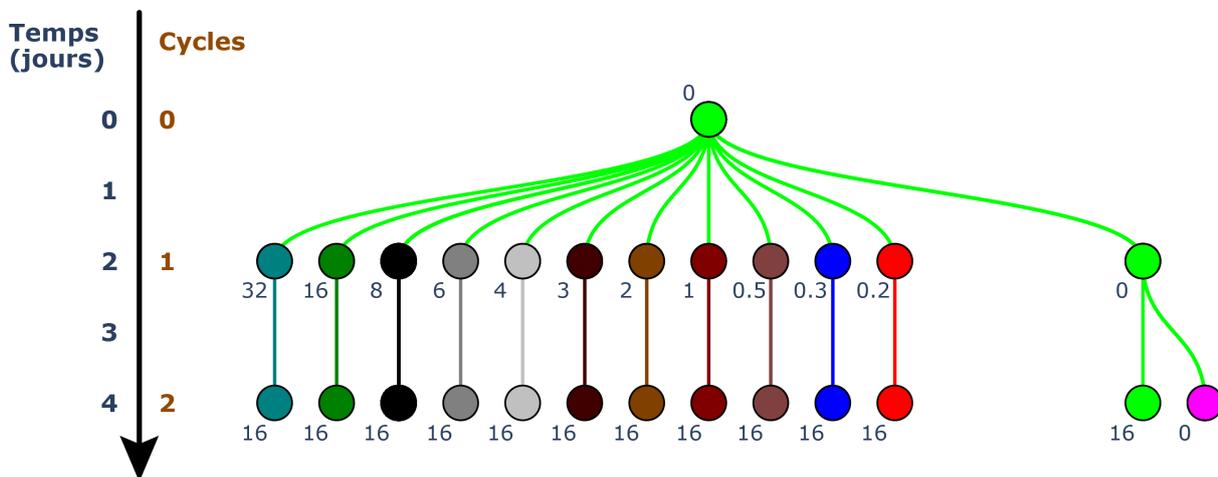


Figure V-6 : Propagation de l'ensemble des populations par transfert en série

Cet arbre d'hérédité permet de représenter la propagation des différentes métapopulations (représentées par les cercles) effectuée suite au premier cycle d'incubation et de criblage. Ici, nous ne représentons pas l'ensemble des transferts effectués de goutte à goutte mais seulement de l'ensemble des populations soumises aux mêmes conditions de cultures pour faciliter la lisibilité. Les valeurs inscrites en indice des métapopulations donnent donc la concentration à laquelle elles sont soumises. Le code couleur utilisé au premier cycle est maintenu au second cycle pour permettre une meilleure visibilité de l'hérédité dans les prochaines figures, mais toutes les métapopulations (excepté les contrôles, en rose) sont bien soumises, au second cycle, à une même concentration de 16xMIC.

Les courbes de croissance obtenues sont alors analysées et caractérisées, comme précédemment, par la mesure de l'inoculum, du temps de latence, du temps de division et du rendement final (Figure V-7).

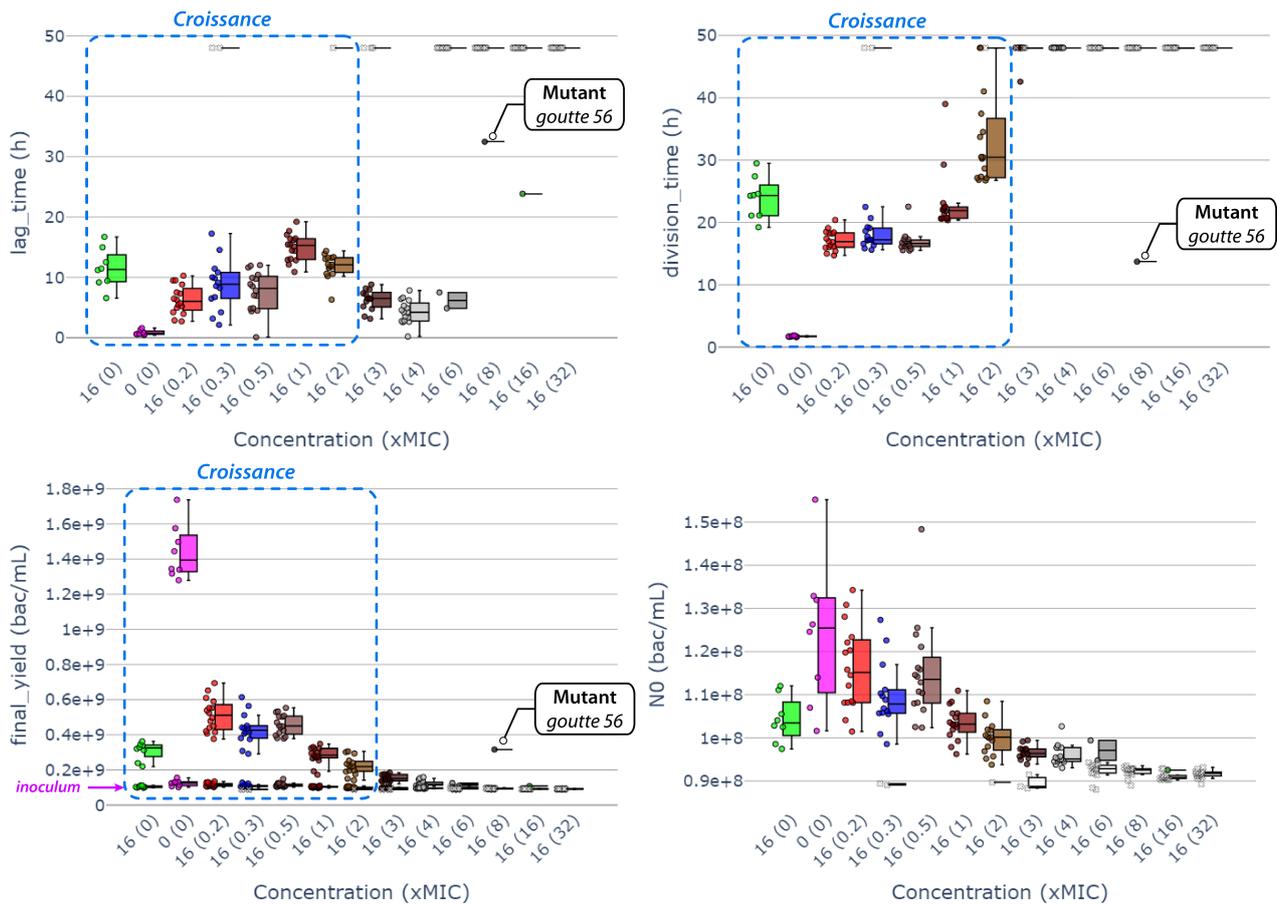


Figure V-7 : Impact d'une première étape de stress sur l'adaptation d'*E. coli* à une concentration sup-MIC (TMP)

Ces graphes représentent les valeurs mesurées sur chacun des paramètres de croissance (inoculum de départ, temps de latence, temps de division, rendement final), pour l'ensemble des populations du second cycle, et sont ici regroupées selon leur métapopulation mère du cycle précédent. En ordonnée, la valeur inscrite entre parenthèse à côté de la concentration correspond à la concentration antérieure, c'est à dire la concentration dont sont issues les populations en question. Nous avons ici maintenu le code couleur utilisé au premier cycle pour en faciliter la compréhension, mais toutes les populations sont bien soumises à une même concentration de 16xMIC (indiquée sur l'axe des abscisses). Les boîtes représentées en blanc et dont les symboles sont des croix (au lieu de cercles) sont des populations n'ayant pas poussées, pour lesquelles temps de latence et temps de division n'ont pas pu être mesurés (d'où une valeur imposée de 48h) et possédant un inoculum et un rendement final de même valeur.

Ces différents graphes nous donnent plusieurs informations intéressantes. Alors qu'au cycle précédent la croissance des populations soumises à une concentration de 16xMIC était totalement inhibée (Figure V-4), on s'aperçoit ici que certaines populations poussent (encadrés bleu, Figure V-7), dont celles issues d'une concentration nulle.

Intéressons-nous, dans un premier temps, à ces populations passant d'une concentration nulle (0xMIC) à une concentration de 16xMIC, nommé 16 (0). Si l'on compare les résultats obtenus ces deux métapopulations entre le 1^{er} et 2nd cycles, nous pouvons voir qu'ici, les populations semblent présenter une adaptation légèrement meilleure qu'au cycle précédent, où la croissance des populations était inhibée. La seule différence notable entre ces deux cycles, et qui pourrait avoir un impact sur l'adaptabilité de ces populations concerne les conditions initiales de cultures. Au premier cycle, les bactéries étaient cultivées en flasque, dans un volume de 5mL durant 24h et à partir d'une solution stock, tandis qu'au second cycle elles étaient cultivées dans la machine d'évolution, en goutte de ~20ul et durant 48h. Cette différence a pu permettre aux bactéries issues du premier cycle d'être mieux adaptées aux conditions de cultures de la machine, induisant ainsi, au second cycle, une adaptabilité

légèrement accrue (avec $G_{c2,16(0)} = 24h < G_{c1,16(0)} = 48h$ et $N_{f,c2,16(0)} = 6,5.10^6 \text{bac} > N_{f,c1,16(0)} = 6,16.10^6 \text{bac}$). A 24h la croissance de ces populations est néanmoins toujours considérée comme nulle.

Intéressons-nous, maintenant, aux autres populations présentant une certaine croissance (encadrés bleu, Figure V-7). Si l'on s'intéresse plus particulièrement au temps de division, on voit que les populations issues d'une concentration de $2xMIC$ ou inférieure semblent croître, bien qu'elles possèdent des temps de division longs (entre 16h et 30h). Leur croissance, bien que lente, est néanmoins confirmée par la mesure de leur rendement final, où l'on mesure une biomasse jusqu'à 5 fois plus élevée que leur inoculum de départ. Une première étape de stress de faible intensité semble donc aider les populations à mieux s'adapter à un stress supérieur à la concentration inhibitrice. Rappelons qu'au premier cycle, nous avons observé que ces mêmes stress de faible ampleur étaient à l'origine de diversification des comportements phénotypiques (tandis qu'au contraire de fortes concentrations uniformisaient la réponse des populations). Il semblerait ici que cette diversification aide, lors de l'augmentation du stress au-delà de la valeur inhibitrice, à une certaine forme d'adaptabilité. Cette adaptation reste néanmoins d'origine phénotypique, car, bien que l'on observe des différences dans les temps de latence, de division et dans le rendement final, toutes les courbes issues d'une même concentration présentent des comportements similaires (Annexe V).

Pour finir notre analyse, qui consiste ici à évaluer comment les différents niveaux de stress appliqués sur les populations au premier cycle de notre expérience influencent leur adaptabilité lorsqu'elles sont ensuite exposées à une concentration supérieure à la concentration inhibitrice, nous souhaitons maintenant introduire une représentation que nous utiliserons dans la suite de ce manuscrit, et qui permet de représenter l'évolution de l'adaptabilité au cours de cycles.

Nous avons précédemment introduit une représentation de la propagation des différentes métapopulations sous forme d'arbre d'hérédité (voir Figure V-6), et nous trouvons intéressant de reprendre ce modèle pour illustrer l'évolution de l'adaptabilité des populations. Cette adaptabilité peut être représentée par une mesure de fitness relative, mesure visant à évaluer la valeur adaptative d'une population évoluée vis à vis de son ancêtre : si la fitness relative augmente, la population évoluée est mieux adaptée que son ancêtre, si elle diminue, c'est le contraire. Dans son expérience d'évolution (la LTEE), Lenski réalise cette mesure en mettant en compétition ses souches évoluées avec des souches ancestrales, en conditions de cultures identiques à celles de son expérience, et il définit la fitness relative comme « le rapport des taux de croissance de la bactérie évoluée et ancestrale »¹¹[78]. Dans notre cas, et sans mettre en compétition nos populations, nous sommes en capacité de mesurer cette fitness relative grâce aux temps de croissance que nous mesurons en direct pour l'ensemble de nos populations. De plus, nous possédons également l'avantage de pouvoir effectuer cette mesure sur les autres paramètres de croissance évalués (à savoir, le temps de latence et le rendement final). Ici, nous nous intéresserons donc l'évolution de l'adaptabilité relative sur le temps de division et sur le rendement final (paramètres dont la mesure est fiable, peu importe le type de croissance). Étant donné que, dans notre expérience, les conditions de culture varient d'une métapopulation à une autre, et de cycle en cycle, il ne nous est néanmoins pas vraiment possible de comparer la croissance dans des conditions de cultures identiques. La mesure que nous effectuerons sera donc plutôt une mesure de « fitness comparative », visant à comparer l'adaptabilité de la population évoluée, dans ces conditions actuelles, à celle de la population ancestrale, dans ces conditions d'origines (Figure V-8).

¹¹ En version originale « the ratio of the realized growth rates of the evolved and ancestral bacteria »

Evolution de l'adaptabilité des populations au cours du temps

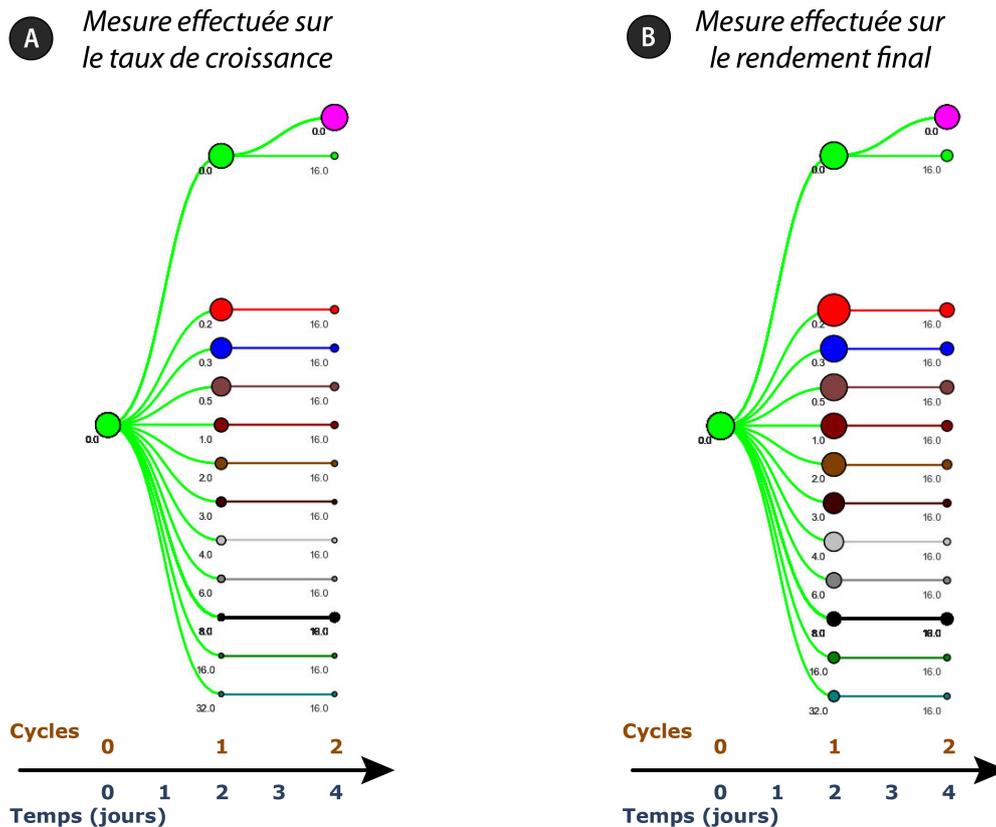


Figure V-8 : Représentation de l'évolution de l'adaptabilité moyenne des populations

Ces représentations en arbre d'hérédité permettent d'illustrer l'évolution (A) du taux de croissance moyen et (B) du rendement final en biomasse moyen, pour chaque métapopulation au cours des cycles. Chaque métapopulation se compose de 16 gouttes (mis à part les contrôles, qui en possèdent que 8). La taille des cercles est ici proportionnelle à la valeur adaptative : plus les cercles sont gros, plus les populations sont adaptées, et vice-versa. Pour le schéma (A), la taille des cercles est donc proportionnelle au rapport $G_a/G_{ev} = \mu_{ev}/\mu_a$, avec G_a le temps de division de la population ancestrale ($\mu_a = 1/G_a$, son taux de croissance) et G_{ev} le temps de division de la population en évoluée ($\mu_{ev} = 1/G_{ev}$, son taux de croissance). Pour le schéma (B), la taille des cercles est proportionnelle au rapport des rendements $N_{f_{ev}}/N_{f_a}$, avec N_a le rendement final de la population ancestrale et N_f le rendement final de la population évoluée. Les nombres inscrits à côté des cercles donnent la valeur de la concentration appliquée à la métapopulation.

Sur ces graphiques (Figure V-8), nous pouvons retrouver les résultats précédemment obtenus et bien détaillés pour les deux premiers cycles. Au premier cycle nous voyons l'effet du gradient d'antibiotique sur chacun des paramètres, avec une décroissance linéaire de la fitness. Au second cycle nous pouvons observer l'adaptation phénotypique des populations ayant été soumises à des stress de faible ampleur ($C < 2 \times \text{MIC}$), ainsi que l'inhibition de la croissance pour de plus forts stress.

Cette représentation simple nous permet à la fois de visualiser l'hérédité construite entre les populations, mais également l'évolution de leur valeur adaptative au travers de deux paramètres dont la mesure est fiable : le temps de division et le rendement final en biomasse. Néanmoins, en fournissant une représentation de l'adaptabilité moyenne par métapopulations, elle ne permet pas la visualisation des comportements singuliers, et donc des populations mutantes. Or, au premier cycle nous avons pu identifier un mutant par l'analyse de l'adaptabilité de nos populations (Figure V-4), et, il se trouve que nous pouvons également identifier, à ce cycle, un nouveau mutant. Dans la prochaine section, nous souhaitons donc revenir sur l'apparition de ces mutants et montrer comment notre technologie permet leur identification et leur sélection.

V.2.B. Une technologie permettant l'appartition et la sélection de mutants

Intéressons-nous, dans un premier temps, au mutant que nous avons identifié au premier cycle, la population de la goutte 159, qui possédait une biomasse finale trois fois plus élevée que ses semblables (mais également que les contrôles, voir Figure V-4). Nous voyons ici qu'elle ne présente plus aucun avantage sélectif par rapport aux autres populations (voir identification Figure V-7). En effet, bien que possédant un avantage initial dû à son inoculum considérablement plus fort que les autres (50% plus élevé) et un temps de latence nul (car déjà en phase exponentielle), elle présente un temps de division 1.3 fois plus long que les autres ($G_{c2,16(0.5)} = 16h30 < G_{c2,g159,16(0.5)} = 22h30$) et une biomasse finale équivalente, et donc bien inférieure à celle du premier cycle ($N_{f1,16(0)} = 1,0 \cdot 10^7 \text{ bac} \ll N_{f,c2,g159,16(0.5)} = 8,7 \cdot 10^7 \text{ bac}$). Ceci confirme notre hypothèse selon laquelle la mutation apparue dans cette goutte ne présentait aucun avantage adaptatif face au stress antibiotique mais résultait simplement de l'acquisition d'une capacité à métaboliser un substrat présent dans la goutte et normalement pas assimilée par *E. coli*. Ne sachant pas exactement la nature de cette mutation, et par intérêt pour les mutations d'ordre antibio-résistante, nous ne nous sommes pas plus attardés sur cette dernière.

Néanmoins, à ce cycle, nous pouvons identifier l'apparition d'un nouveau mutant au sein de l'une de nos populations : la goutte 56 issue d'un stress à 8xMIC (voir identification Figure V-7). Si l'on revient à la Figure V-7, représentant l'ensemble des paramètres de croissance de l'ensemble des populations (regroupées par métapopulations), on voit que cette population se démarque de sa métapopulation avec un temps de division suffisamment faible et un rendement final suffisamment fort pour qu'il puisse s'agir d'un mutant (également illustré Figure V-9 ci-dessous).

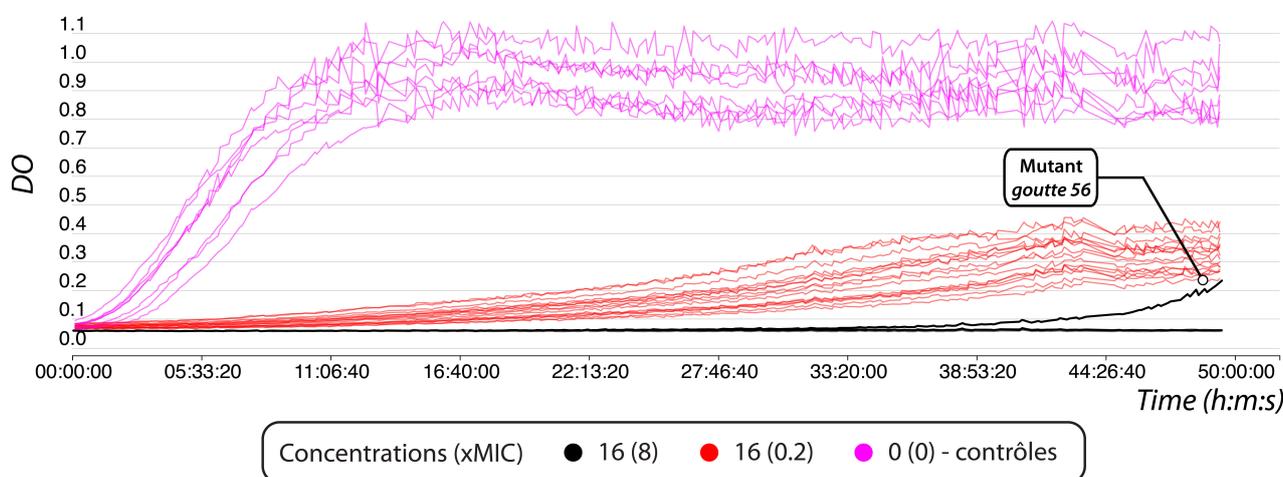


Figure V-9 : Identification d'un mutant conférant une résistance à la TMP (cycle 2)

Cette figure présente les courbes de croissance de populations issues des trois conditions différentes (trois métapopulations) pour comparaison avec la courbe de croissance de la population mutante (gouttes 56). En rose : les contrôles 0 (0), en rouge : les populations présentant la meilleure adaptation phénotypique 16 (0.2), et enfin en noir : les populations issues de 8xMIC, 16 (8), dont la population mutante. Le comportement de la population mutante (goutte 56) diverge complètement du comportement des populations soumises aux mêmes conditions de croissance (dont la croissance est inhibée), mais également des populations présentant une adaptation phénotypique (courbes rouge).

Seule population à croître face à un si fort stress (concentration de 8xMIC puis de 16xMIC), il semble logique que cette population résulte de l'apparition et de la sélection d'un mutant conférant une résistance à l'antibiotique. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons retracé, par simulation numérique, l'apparition du premier mutant dans notre système pour voir si cet événement est compatible avec la

probabilité qu'une mutation spécifique à la TMP survienne dans nos gouttes. En effet, nous possédons ici l'avantage d'utiliser un antibiotique dont le mécanisme d'action est bien connu et qui cible un unique gène : le *folA* ; il est donc assez simple de remonter à l'apparition de ce mutant dans notre expérience.

Pour cela, nous avons fait un raisonnement inverse pour remonter de la détection de la sous population mutante (à la fin du cycle 2) jusqu'à l'apparition du mutant originel à partir des courbes et des paramètres de croissance mesurés (temps de divisions, biomasse initiale ou finale). Étant donné qu'aucune autre population ne pousse dans les mêmes conditions de culture, nous pouvons considérer que la croissance ici observée est en fait uniquement liée à la croissance d'un mutant ayant acquis une antibio-résistance. Nous pouvons alors faire l'hypothèse que la population de la goutte 56 est en fait composée de deux sous populations : l'une composée d'un grand nombre de bactéries non mutantes dont la croissance est inhibée, l'autre d'un faible nombre de bactéries mutantes dont la croissance est exponentielle.

A partir de cette hypothèse, nous pouvons alors définir le nombre de bactéries N de cette population comme égale à la somme des bactéries ne se divisant pas N_{nm} (constant) et des mutants $N_{mutants}$ (en croissance exponentielle), selon le système d'équations présentés ci-dessous (l'Équation V-2).

$$N(t) = N_{nm} + N_{mutants}(t) \quad (1)$$

$$\text{or } \begin{cases} N_{nm} = N_{0_{tot}} - N_{0_{mutants}} & (2) \\ N_{mutants}(t) = N_{0_{mutants}} * 2^{\frac{t}{G}} & (3), \quad \text{avec } n = t * \tau = \frac{t}{G} \end{cases}$$

$$\text{donc } N(t) - N_{0_{tot}} = N_{0_{mutants}} * e^{\ln(2) * \frac{t}{G}} - N_{0_{mutants}} \quad (4)$$

Équation V-2 : Évolution du nombre de bactéries au cours du temps dans la goutte 56 du second cycle

Ce système d'équation définit la croissance bactérienne au sein de la goutte 56 du cycle 2. Dans ces équations $N(t)$ représente le nombre total de bactéries, N_{nm} le nombre de bactéries non mutantes, considéré comme constant, $N_{mutants}$ le nombre de bactéries mutantes, évoluant selon une loi exponentielle. $N_{0_{tot}}$ représente le nombre de bactéries initiales dans la goutte tandis que $N_{0_{mutants}}$ représente le nombre initial de mutants, et finalement n représente le nombre de génération, aussi égal au rapport du temps t par le temps de division G , ou encore au produit du temps t et du taux de croissance $\mu=1/G$.

L'Équation V-2 (4) représente ainsi l'évolution du nombre de bactérie dans la goutte 56 au cours du temps selon deux paramètres : le nombre de mutants initialement présents dans la goutte $N_{0_{mutants}}$, et le temps de division G de ce mutant (dans ces conditions de croissance). Afin de résoudre cette équation à deux inconnus mathématiquement, nous pouvons faire l'hypothèse que le nombre initial de mutants est faible devant le nombre initial de bactéries non mutantes, conduisant à la simplification ci-dessous (Équation V-3).

En considérant $N_{0_{mutants}} \ll N_{0_{tot}}$, on a :

$$N(t) - N_{0_{tot}} = N_{0_{mutants}} * e^{\ln(2) * \frac{t}{G}}$$

Équation V-3 : Simplification de l'équation V-I pour un faible inoculum de mutants

Si l'inoculum de mutants est suffisamment faible devant le nombre initial de bactéries présentes dans la goutte, l'Équation V-2 (4) peut être simplifiée pour retrouver une fonction exponentielle classique.

Nous retrouvons ici une fonction exponentielle qu'il est facile de modéliser pour évaluer les valeurs de $N_{0,\text{mutants}}$, et de G . Après application numérique, nous trouvons donc un inoculum initial de $N_{0,\text{mutants}} = 1,11.10^4$ mutants et un temps de division $G = 6\text{h}24$. Nous pouvons alors vérifier que $N_{0,\text{mutants}} \ll N_{0,\text{tot}}$ ($1,11.10^4 \ll 1,87.10^6$), validant ainsi notre hypothèse de départ et donc notre mesure du temps de division et de l'inoculum.

Pour une évaluation plus précise de ces paramètres, nous avons également conduit une simulation numérique. En résolvant l'Équation V-2 (4) numériquement par itérations successives sur les paramètres G et $N_{0,\text{mutants}}$ (en réinjectant tour à tour les deux paramètres dans l'équation), on converge très rapidement (en quatre itérations seulement) à une solution finale où $G = 6\text{h}40$ et $N_{0,\text{mutants}} = 1,34.10^4$ mutants ; valeurs finalement proches de celles trouvées précédemment et que nous utiliserons dans la suite de notre simulation.

Nous voyons ici que l'évaluation numérique de ces paramètres ne correspond pas à celle obtenue par l'analyse des courbes automatique (voir Figure V-7). Ceci s'explique par le fait que la modélisation automatique est réalisée en considérant que l'ensemble des bactéries présentes au départ (correspondant à l'inoculum de départ $N_{0,\text{tot}} = 1,79.10^6$) possèdent le même comportement phénotypique, et font partie d'une seule population, donnant ainsi une évaluation du comportement phénotypique moyen, avec $N_0 = 1,79.10^6$, $G = 13\text{h}45$ et un très long temps de latence de $\text{Lag} = 32\text{h}30$. Cette approche est bonne pour l'évaluation du comportement phénotypique global des populations et convient dans la majorité des cas. Elle nous a d'ailleurs permis d'identifier la présence d'un comportement singulier dans la goutte 56. Néanmoins, elle n'est pas la bonne dans le cas présent, et une seconde approche était nécessaire pour évaluer précisément les paramètres de croissance de la sous population mutante.

Pour expliquer la longue phase de « non croissance » observable sur la courbe de croissance de la goutte 56 (Figure V-9), et qui pourrait être prise pour une phase de latence, il faut alors se tourner vers notre mesure de DO. Notre dispositif possède un seuil minimal de détection autour de $C_{\text{seuil}} = 5,45.10^7 \text{ bac/mL}$, soit $N_{\text{seuil}} = 1,1.10^6$ bactéries par goutte, avec un bruit autour de $\epsilon = 2,05.10^4$ bac/goutte. Ici nous commençons avec un inoculum initial global de $N_{0,\text{c2,global}} = 1,79.10^6$ bactéries, inoculum supérieur au seuil de détection, et donc détectable, mais parmi ces bactéries, seules les mutantes se divisent. Ces dernières ne sont pas détectables tant que leur nombre reste dans le bruit, et il est donc nécessaire d'attendre plus de 25h pour voir le signal sortir du bruit ($N > N_{0,\text{c2,global}} + 3*\epsilon$).

Revenons en maintenant à notre simulation visant à déterminer l'apparition du premier mutant. Une fois le nombre de mutants présent au départ du cycle 2 connu ($N_{0,\text{c2,g56}} = 1,34.10^4$), nous pouvons facilement estimer le nombre de mutants présents à la fin du premier cycle. En sachant que le volume transféré lors de la propagation des échantillons est de 10%, nous trouvons ainsi un nombre de $N_{\text{f,c1,g56}} = 1,34.10^5$ mutants présents à la fin du premier cycle dans la goutte 56, alors soumise à une concentration de 8xMIC. Ce nombre de mutants, bien que déjà conséquent et supérieur à $3*\epsilon$, ne représente qu'un centième de la biomasse finale dans la goutte 56 au cycle 2 ce qui justifie que leur présence ne pouvait, à ce stade, pas encore être détectée. Ainsi, la mesure du temps de division effectuée au premier cycle pour la goutte 56 (qui était alors de $G = 27\text{h}$) ne reflète pas le temps de croissance du mutant mais représente, encore une fois, la fitness moyenne de la population, que nous pouvons ici attribuer aux bactéries non mutantes (les bactéries mutantes n'étant pas encore détectables). Or le temps de division du mutant dans une concentration à 8xMIC est nécessaire pour pouvoir

finaliser et valider notre simulation numérique. Grâce à une étape de propagation supplémentaire réalisée à posteriori (voir V.2.C), nous avons pu déterminer une valeur minimale de ce temps de division, qui est de $G_{c1,g56}=2h38$. En prenant cette valeur, et en considérant une nouvelle fois que la croissance du mutant est exponentielle, on peut remonter, grâce à l'Équation V-2 (3), au nombre de mutant initialement présent dans la goutte 56. Après application numérique, on trouve alors une valeur de $N_{0,c1,g56}=0,45$ mutants, valeur signifiant que le mutant originel était présent dès le départ (avec un temps de division légèrement revu à la hausse, $G_{c1,g56}=2h48$), où qu'il est apparu très rapidement au cours du premier cycle (après $\sim 3h$ d'incubation).

Maintenant notre simulation terminée, et afin de vérifier sa cohérence, nous souhaitons aborder le problème dans l'autre sens, en évaluant la probabilité qu'un mutant spécifique à la TMP soit présent dès le départ dans la goutte. Nous savons que le gène cible de la TMP est le *folA*, gène mesurant 480 pb (« paires de bases »), et que le taux de mutation par paire de base par réplication chez *E. coli* est de $5,4 \cdot 10^{-10}$ [27]. On en déduit donc un taux de mutation sur ce gène spécifique de $2,59 \cdot 10^{-7}$ mutation/réplifications. Pour estimer le nombre de mutants présents lors de l'inoculation des gouttes nous devons donc connaître le nombre de réplifications ayant eu lieu dans la solution mère, or, pour une population suffisamment grande, le nombre de réplification peut être assimilé au nombre de bactéries présentes. Étant donné que l'on inocule nos populations à une concentration de $C_0=1,6 \cdot 10^8$ bac/mL au premier cycle, on peut donc estimer la concentration en mutant qui est de $C_{0,mut}=415$ mutants/mL. Pour des gouttes de $20\mu L$, nous pouvons donc nous attendre à avoir un nombre de $0,829$ mutants/goutte qui est en fait un nombre moyen de mutants par goutte.

Le nombre de mutants réellement présent est un nombre discret, dont la probabilité est régie par une loi de Poisson de paramètre $\lambda=0,829$ (Équation V-4).

$$p(k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

Équation V-4 : Loi de Poisson

La loi de Poisson nous permet ici d'évaluer le nombre de mutants attendus dans chaque goutte dès leur inoculation. Ce nombre est un nombre discret dont la moyenne d'apparition est de $\lambda=0,829$, paramètre de la loi de Poisson.

A partir de l'Équation V-4 on peut alors calculer la distribution de Poisson régissant la probabilité de présence de k mutants au sein de nos gouttes (Figure V-10).

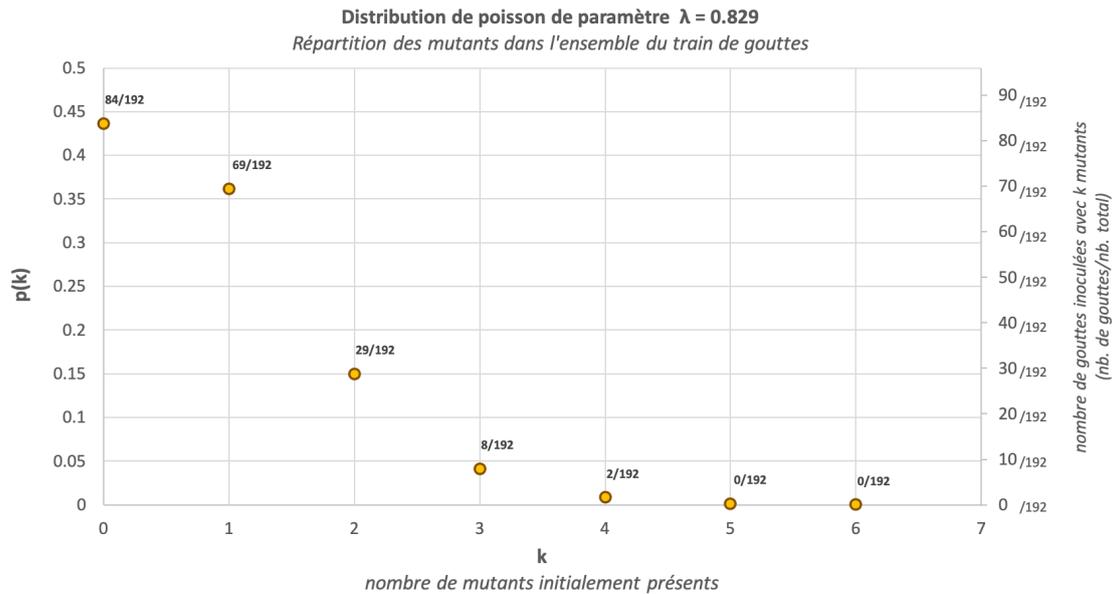


Figure V-10 : Répartition des mutants initialement présents lors de l'inoculation du premier train de gouttes

Ce graphique présente la probabilité $p(k)$ de posséder k mutants dans une goutte lors de l'inoculation du premier train. Cette probabilité est ici également représentée en termes de fréquence d'apparition dans notre train de gouttes, à savoir en nombre de gouttes sur le nombre total de gouttes inoculées (valeur inscrite au-dessus des marqueurs ainsi que sur l'axe des ordonnées secondaire, à droite)

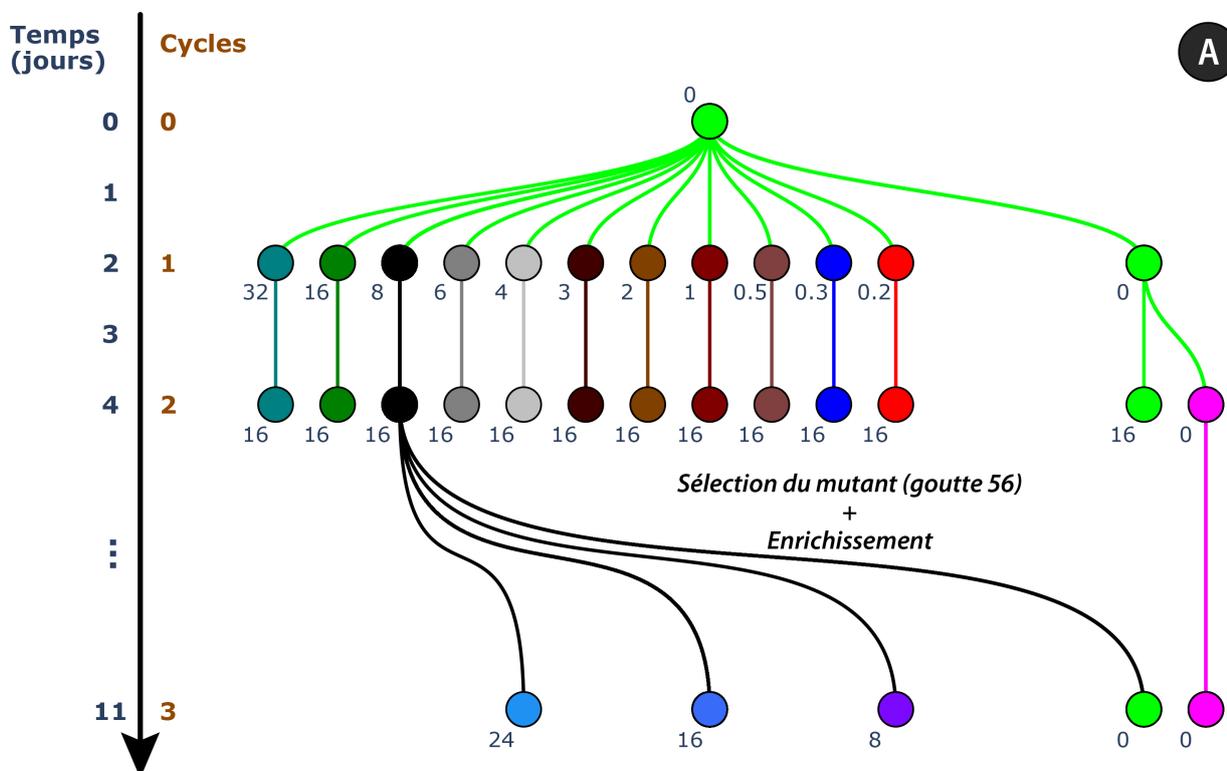
Au vu du nombre de gouttes possédant 1 mutant spécifique au *folA* dès l'inoculation du premier train de gouttes (69 gouttes sur 192), nous nous rendons compte que cet événement n'est en fait pas rare, validant ainsi l'estimation faite avec notre simulation. N'oublions pas que cette simulation a été conduite en prenant toutes les valeurs minimales (phases de croissance exponentielles sans temps de latence, donc N_0 et G minimal), et que notre estimation nous donne donc une idée des conditions minimales ayant pu conduire à la croissance de ce mutant. Néanmoins, au vu de la répartition des mutants donnée par la loi de Poisson ci-dessus (Figure V-10), il se pourrait qu'il y ait 2, 3 voire 4 mutants au départ dans la goutte 56, et ceci engendrerait seulement une augmentation des temps de division ou des phases de latence.

Ce que nous dit également cette distribution de Poisson (Figure V-10) est que nous devrions nous attendre à avoir des mutants dans plus de la moitié des gouttes. Alors comment se fait-il que nous arrivions à détecter une unique population mutante ? Nous avons ici estimé la répartition des mutants spécifiques au *folA*, mais, parmi ces mutations, toutes ne sont pas bénéfiques. En d'autres termes, une mutation sur le *folA* n'engendre pas nécessairement une résistance accrue à la TMP. Il faudrait alors s'intéresser au nombre de mutations bénéfiques, mais ce nombre nous est inconnu. D'après l'expérience menée par Toprak et al. [35], quatre ou cinq mutations semblent être à l'origine d'une première adaptation à l'antibiotique. A partir de cette donnée, nous pouvons estimer qu'environ 1% des mutations sur le *folA* sont des mutations bénéfiques, et donc, qu'au départ, il n'y aurait qu'une seule goutte contenant une mutation spécifique. Cette estimation est approximative mais nous donne un ordre de grandeur, et nous conforte dans l'idée que le mutant était présent dans la goutte 56 dès le départ de notre expérience. Il est important de noter que la pression de sélection naturelle (par la gestion des conditions de croissance) et la valeur sélective (la fitness) des mutants jouent, dans la sélection des mutants, également un rôle considérable que nous n'avons pas encore pris en considération. Ce rôle a pu être mis en lumière, dans notre technologie, par l'évaluation de la valeur adaptative du mutant en fonction de ses conditions de culture, et la prochaine section en présente les résultats.

V.2.C. La sélection naturelle motrice de l'évolution

V.2.C.1. Valeur adaptative et sélection naturelle

Afin d'en apprendre plus sur la valeur adaptative du mutant identifié à l'étape 2 (nommons le M1 pour plus de facilité), ce dernier a été récupéré en dehors de la machine et enrichi en le cultivant dans le même milieu stressant duquel il était issu ($C = 16xMIC$). Le maintien des conditions de croissance est ici important car il permet la croissance de la sous population mutante sans favoriser la croissance des bactéries non mutantes encore présentes dans l'échantillon récupéré. Une fois suffisamment enrichie, cette population fût utilisée pour générer un nouveau train de gouttes (à l'aide du sipper) visant à évaluer l'adaptabilité de notre mutant face à quatre nouvelles concentrations (64 gouttes/concentrations, formant un total de 216 gouttes, plus 8 contrôles¹²) pour une période d'incubation de 48h à 37°C (Figure V-11).



¹² Populations de *E. coli* initiales propagées au cours des cycles pour conserver une référence de croissance.

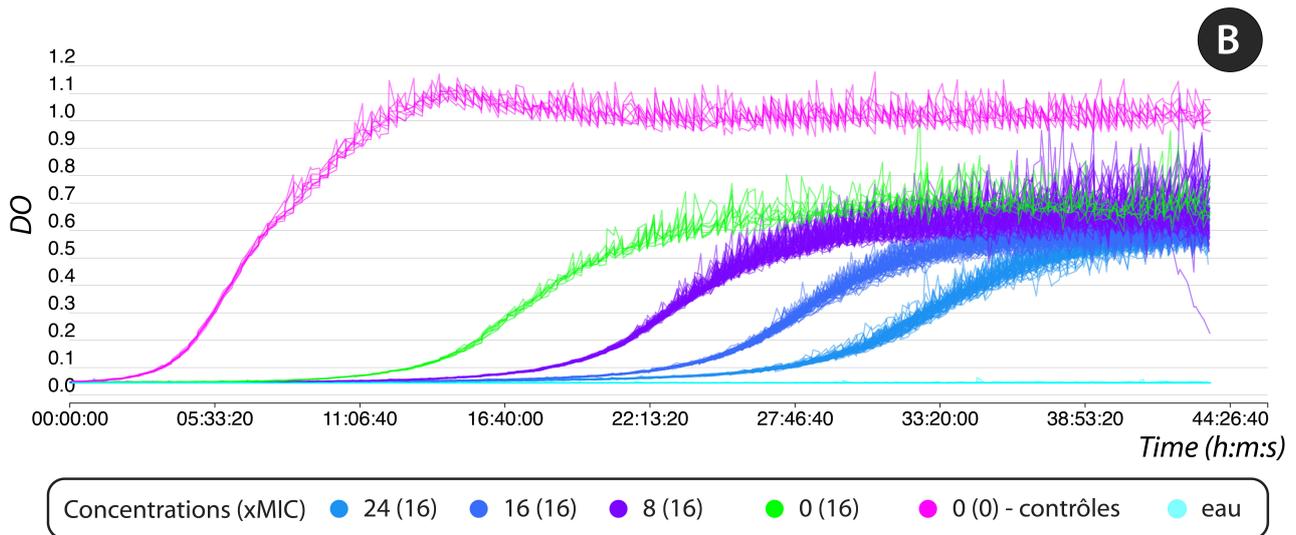


Figure V-11 : Croissance du mutant M1 en présence de stress antibiotique (TMP) de différentes intensités

Cette figure présente (A) l'hérédité construite depuis le début de notre expérience et mettant en évidence la sélection et l'enrichissement du mutant M1, puis sa ré-inoculation en gouttes face à diverses concentrations en TMP. La taille des cercles est ici constante et représente seulement l'hérédité construite. Cette figure présente également (B) les courbes de croissance obtenues suite à l'incubation durant 24h à 37°C du train de 240 gouttes en question, composé de 64 gouttes pour les concentrations à 8, 16 et 24xMIC, de 16 gouttes à 0xMIC (dont 8 M1 et 8 contrôles, *E. coli*) et de 16 gouttes d'eau (tampons) en début et en fin de train.

L'ensemble des courbes de croissance sont alors analysées et caractérisées, comme précédemment, par la mesure du temps de latence, du temps de division et du rendement final (Figure V-12).

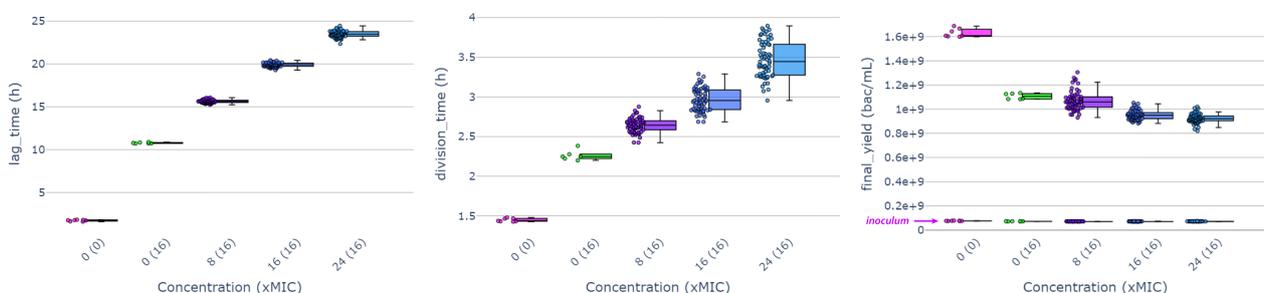


Figure V-12 : Évolution des paramètres de croissance du mutant M1 en fonction de la concentration en TMP

Ces graphes représentent les valeurs mesurées sur chacun des paramètres de croissance (temps de latence, temps de division, rendement final), pour l'ensemble des populations du troisième cycle, regroupées par métapopulations. Le graphique présentant les valeurs obtenues pour le rendement final donne également la valeur de l'inoculum. Alors qu'une concentration de 8xMIC suffisait à inhiber la croissance des bactéries *E. coli* originelles, on voit ici que l'ensemble des concentrations employées sont en dessous de la concentration inhibitrice du mutant, valeur qui ne peut donc pas être déterminée par cette expérience.

La réponse des populations au stress antibiotique est ici similaire à celle observée pour les populations sub-MIC_{gouttes} (MIC mesuré en gouttes dans la machine, soit 8xMIC) au premier cycle. Plus le stress antibiotique augmente, plus le temps de latence et le temps de division augmentent, et plus le rendement final diminue. Ce comportement semble donc indiquer que nous travaillons ici à des concentrations inférieures au MIC du mutant (en gouttes). Pour le vérifier, nous avons effectué une nouvelle mesure de MIC du mutant M1 (sur plaque), et nous avons trouvé une concentration de $C_{M1,ref}=31,25 \mu\text{g/mL}$ pour la mesure standard, soit une concentration 64 fois plus élevée que celle

inhibant la croissance de bactéries *E. coli* non mutées. Avec un inoculum similaire à celui utilisé dans la machine d'évolution ($3,2 \cdot 10^6$ bactéries), cette valeur de MIC passe alors à $C_{M1, goutte} = 125 \mu\text{g/mL}$, soit $255 \times \text{MIC}_{\text{réf}}$, confirmant le fait que nous travaillons ici avec des concentrations inférieures à la concentration inhibitrice du mutant (Figure V-13).

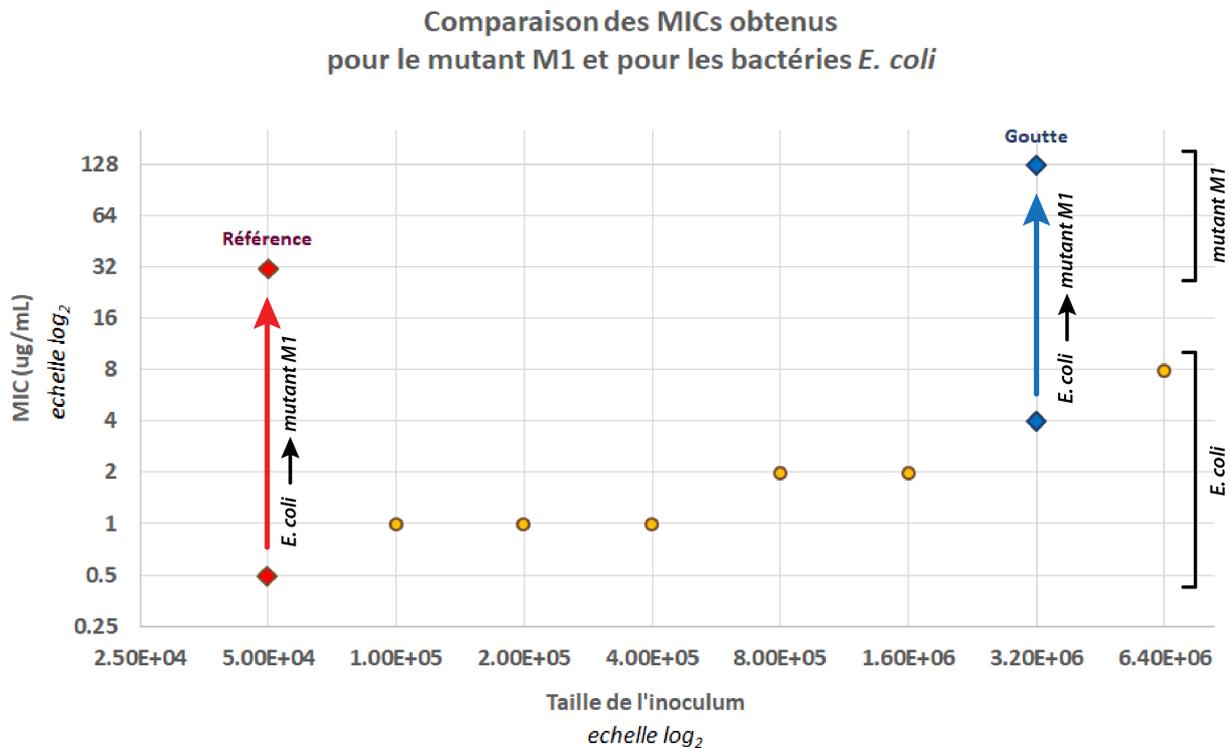


Figure V-13 : Comparaison des MICs obtenus pour le mutant M1 et pour les bactéries *E. coli*

Ce graphique présente l'évolution des valeurs de MICs obtenues entre les bactéries *E. coli* originelles et le mutant M1 identifié et sélectionné au second cycle de notre expérience d'évolution. Ces mesures ont été effectuées sur plaques 96-puits. Alors que la mesure de référence donnait un MIC à $0.49 \mu\text{g/mL}$ pour *E. coli*, elle donne ici une mesure de $31,25 \mu\text{g/mL}$ pour le mutant. Avec l'inoculum utilisé en gouttes, ces mesures sont respectivement de $3,9 \mu\text{g/mL}$ et $125 \mu\text{g/mL}$.

Cette étape nous permet également de faire une étude comparative de la valeur adaptative du mutant. Afin de comparer la fitness du mutant à celle de la population ancestrale de *E. coli* (populations à 0 (0)), nous avons ré-inoculés des mutants dans du milieu de culture sans antibiotique (populations à 0 (16)). En comparant les résultats obtenus pour ces deux métapopulations (Figure V-12) on s'aperçoit alors que l'avantage conféré par la mutation en présence d'un stress antibiotique devient, en l'absence d'antibiotique, un désavantage. Nous retrouvons là le résultat obtenu par Baym et al. [29] (voir I.3.B.1) qui avaient observé qu'une mutation conférant une résistance accrue à l'antibiotique a généralement un coût, et s'accompagne d'une altération de la croissance. Grâce à la capacité que possède notre technologie à mesurer en direct, à partir d'une analyse phénotypique en temps réel, la fitness de chacune des populations, nous sommes ici en mesure de quantifier l'évolution de cette valeur adaptative pour l'ensemble des trois paramètres de croissance mesurés : temps de latence, temps de division et rendement final. Comme nous l'avons introduit précédemment (V.2.A), nous pouvons, dans notre technologie, directement mesurer la fitness relative en effectuant le rapport des paramètres de croissance de la population évoluée et ancestrale ; mesure qui peut, dans notre cas, concerner le temps de division, le temps de latence, ou le rendement final (Équation V-5).

$$F_{lag} = \frac{lag_a}{lag_{ev}} \quad (1) \qquad F_G = \frac{\mu_{ev}}{\mu_a} = \frac{G_a}{G_{ev}} \quad (2) \qquad F_{N_f} = \frac{N_{f_{ev}}}{N_{f_a}} \quad (3)$$

Équation V-5 : Mesures de fitness relative pour les différents paramètres de croissance (en conditions identique)

Chacun de ces paramètres donne une mesure de la fitness relative de la population évoluée par rapport à la population ancestrale. Pour chacune des équations, l'indice « a » signifie « population ancestrale » et l'indice « ev » signifie « population évoluée ». (1) F_{lag} représente la fitness relative mesuré sur le temps de latence lag, (2) F_G représente la fitness relative mesuré sur le taux de croissance μ (ou temps de division G) et (3) F_{N_f} représente la fitness relative mesuré sur le rendement final N_f . Ainsi, quel que soit le paramètre étudié, si $F < 1$ la population évoluée est moins bien adaptée que la population ancestrale, dans son milieu et au contraire, si $F > 1$ la population évoluée est mieux adaptée que l'ancestrale.

Si l'on s'intéresse plus particulièrement au temps de division (Figure V-12), par exemple, on peut voir que de retour dans des conditions de cultures sans stress antibiotique (populations à 0 (16)), les populations de mutants possèdent un temps de division considérablement plus long que les populations ancestrales de *E. coli* (populations à 0 (0)), avec des temps de division moyens respectifs de $G_{0(16)}=2h15$ et $G_{0(0)}=1h30$. Une mesure de la fitness relative sur ce paramètre (correspondant à la définition utilisée par Lenski [78]) donne une valeur de $F_G=0.64$, valeur inférieure à 1 synonyme d'une perte de fitness de la population évoluée (en milieu sans antibiotique). La mesure de la fitness relative sur chacun les deux autres paramètres de croissance donnent ici des valeurs de : $F_{lag}=0.16$, et $F_{N_f}=0.7$, confirmant que l'acquisition d'une résistance à l'antibiotique a conduit à la perte de fitness du mutant en conditions de culture « normales » (sous-entendu, sans stress antibiotique).

Nous touchons ici du doigt la raison pour laquelle si peu de mutants sont identifiés dans notre expérience. Pour que les mutants s'imposent dans leur environnement (sous-entendu : leur goutte), ils doivent être compétitifs, et posséder un avantage adaptatif significativement meilleur que les bactéries avec qui ils cohabitent, qui sont, elles, majoritaires (avec, au départ, au maximum 4 mutants pour $3,2 \cdot 10^6$ bactéries). Or, nous voyons ici qu'en conditions non stressantes (sans antibiotique), la fitness des mutants est bien moins bonne que celle des bactéries non mutées. Bien que nous n'ayons pas effectué la mesure d'adaptabilité pour toutes les autres concentrations de faible ampleur (entre 0 et 8xMIC), le comportement attendu reste le même, et il apparaît que la probabilité de trouver un mutant dans ces concentrations est très faible. Lorsqu'une population n'est pas soumise à un stress trop fort, on cultive donc une certaine diversité phénotypique, en maintenant différentes sous-populations et en ne permettant pas aux mutants, possédant une fitness moins bonne, de s'imposer.

Au contraire, si la pression de sélection naturelle est suffisante (ici, le stress antibiotique), la résistance conférée par la mutation devient un avantage sélectif. Dans ce cas, le rapport des fitness s'inverse, et les mutants ont l'opportunité de pouvoir coloniser la niche, ou du moins de se reproduire en nombre suffisant pour survivre à la pression de sélection aléatoire, comme nous l'observons, par exemple, dans la goutte 56. Si ce mutant n'a pas pu s'imposer au sein de sa population sur la durée du premier cycle, il a néanmoins pu se reproduire en nombre suffisant pour être propagé au second cycle, puis être compétitif avec un avantage sélectif significativement supérieur aux autres bactéries lui ayant permis de finir par s'imposer. Il n'est donc pas anodin que ce mutant soit issu de deux concentrations imposant une pression de sélection naturelle assez forte.

Enfin, si la pression de sélection naturelle est trop forte, elle ne laissera pas la chance aux mutants de se diviser suffisamment rapidement pour s'imposer durant le temps d'incubation imparti (ou pour survivre à la sélection aléatoire) ; cas de figure que nous verrons dans la dernière partie de ce chapitre (V.3.C).

Nous retrouvons là un exemple concret de la gestion des pressions de sélection et de la diversité que nous évoquions au second chapitre (II.1.C), et que nous disions nécessaire dans notre technologie. Nous avons aujourd'hui une preuve que notre technologie permet, grâce à la compartimentation et à la gestion de la pression de sélection naturelle, de favoriser (si les conditions sont bien choisies) la croissance des individus les plus adaptés, bien que pas forcément les plus rapides.

V.2.C.2. Adaptabilité en présence d'une pression de sélection naturelle constante

Nous pouvons maintenant nous intéresser aux populations maintenues, depuis la sélection du mutant, en conditions de culture identiques, c'est à dire à 16xMIC (populations 16 (16)) et les comparer à leur ancêtre (la population de la goutte 56 du cycle 2). Considérons donc la métapopulation 16 (16) de cette étape comme étant la population évoluée, et la sous-population de la goutte 56 du cycle 2 comme étant la population ancestrale. Alors que la population ancestrale possédait un temps de division d'au moins 6h40¹³, on observe que le temps de division de la population évoluée a considérablement diminué en passant à 2h57. Nous mesurons donc une fitness relative $F_G = 2.25$, soit une croissance plus de deux fois plus rapide pour la population évoluée, dans des conditions de culture pourtant identiques. Nous retrouvons là un autre des résultats obtenus par Baym et al. [29](voir I.3.B.1) qui avaient observé que le compromis effectué entre résistance et croissance conduisait en fait à une adaptation des mutants en deux temps. Une première mutation leur permet d'acquérir une forte résistance au détriment de leur croissance (comme nous venons de le voir V.2.C.1), qui est ensuite compensée par des mécanismes d'adaptation secondaire, permettant la croissance complète, et dont nous pouvons ici commencer à voir l'effet. La nette amélioration ici observée en gouttes n'a pas été soudaine entre le second et le troisième cycle, mais résulte principalement de la phase d'enrichissement¹⁴, conduite hors de la machine. Nous verrons néanmoins, par la suite (V.3.B.1), que ce paramètre, tout comme le rendement, continueront à s'améliorer au cours des cycles, pour atteindre une valeur sélective presque équivalente à celle des contrôles (bactéries *E. coli* non soumises à un stress antibiotique), ici, dans une concentration bien supérieure au MIC.

V.2.D. Conclusion

Cette seconde étape de notre expérience d'évolution nous a permis d'étudier l'impact d'une première étape de stress sur l'adaptabilité face à un antibiotique, et de mettre en évidence des solutions adaptatives phénotypiques mais également génétiques. Bien que les résultats obtenus à cette étape restent des résultats connus (dans la réponse des bactéries *E. coli* à la TMP), ils nous permettent de confirmer le fonctionnement de notre technologie. Premièrement, cette étape montre que le module de transfert de notre technologie fonctionne avec du matériel biologique et permet effectivement la propagation de centaines d'échantillons entre deux gouttes souhaitées (ici par transfert en série) pour conduire leur évolution. Mais, cette étape prouve également que notre technologie permet de jouer sur la pression de sélection naturelle, au travers des conditions de culture, pour favoriser, ou non, la

¹³ Temps de division du mutant obtenu dans le cas d'une croissance exponentielle sans phase de latence au 2nd cycle, et en partant d'un seul mutant au 1^{er} cycle. La même simulation à partir de 4 mutants donnerait un temps de division de 10h.

¹⁴ longue étape (~4jours) de culture à conditions constante (16xMIC) réalisée en dehors de la machine par manque de bactéries. Une goutte n'est pas suffisante pour inoculer un train entier.

coexistence de plusieurs phénotypes, et qu'elle permet donc de gérer la diversité au sein des gouttes. L'identification des différents comportements passe par l'évaluation de la valeur adaptative de chacune des populations en culture, possible grâce à la capacité que possède notre technologie à fournir une mesure et une analyse phénotypique en temps réel. Ensembles, gestion de la pression de sélection naturelle et analyse phénotypique en temps réel nous ont permis d'identifier et de sélectionner une sous population mutante, dans un système pourtant peu favorable, car ne possédant qu'un seul gène cible.

Désormais, nous souhaitons montrer que cette capacité est en fait un avantage qui peut être mis à profit pour diriger l'évolution des populations, intérêt majeur de notre technologie.

V.3. Sélection artificielle et évolution dirigée

Maintenant les capacités de notre technologie à cultiver, cribler, analyser et propager des centaines de populations bactériennes en parallèle démontrées, nous avons souhaité, dans la fin de notre expérience d'évolution, en démontrer sa dernière capacité : la sélection pour l'évolution dirigée.

Comme nous l'avions vu au Chapitre I (I.3.B.2), l'évolution face à la TMP est très échelonnée et consiste à acquérir les mutations les unes après les autres. Il est donc intéressant, une fois la première mutation identifiée, de la conserver et de tirer profit des capacités de sélection, de compartimentation et parallélisation de notre technologie pour faire évoluer cette population en explorant un grand nombre de chemins évolutifs différents, en parallèle.

V.3.A. La sélection artificielle au service de l'évolution dirigée

A partir du troisième cycle de propagation, nous sommes rentrés dans une « routine » visant à faire évoluer nos populations face à un stress antibiotique en perpétuelle augmentation, tout en cherchant à explorer différents chemins évolutifs en parallèle. Nous avons alors mis à profit la capacité de sélection que possède notre machine pour diriger l'évolution des populations, construisant ainsi un arbre évolutif présenté ci-dessous (Figure V-14).

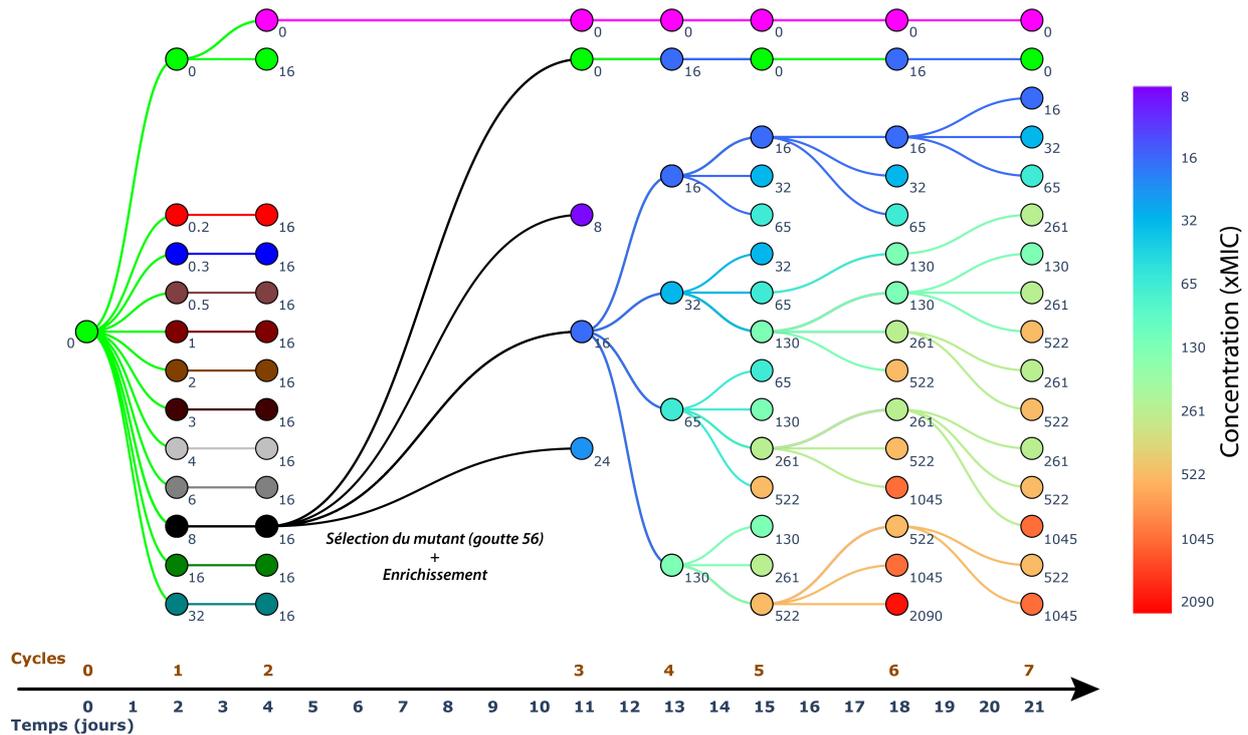


Figure V-14 : Arbre évolutif construit lors de la preuve de concept

Cet arbre résume l'hérédité construite sur l'ensemble des cycles d'évolution de notre expérience. Comme sur les schémas employés précédemment, les cercles représentent l'ensemble des populations cultivées dans les gouttes de même concentration. La taille des cercles est ici constante et représente seulement l'hérédité construite. Chaque cercle représente donc un ensemble de gouttes, généralement 16, parfois 32 voire 64. Les nombres inscrits à côté des cercles donnent la valeur de la concentration appliquée à la métapopulation, tout comme les couleurs à partir du 3^{ème} cycle.

Cet arbre représente l'hérédité construite lors de notre expérience, mais il faut comprendre que chacune des « méta-populations » ici représentées (sous forme de cercles) correspond en fait à un ensemble gouttes, un ensemble de populations, soumises aux mêmes conditions de croissance. A chaque cycle, le choix des populations à propager était effectué sur la base de plusieurs critères :

- leur concentration en antibiotique, avec pour but d'aller toujours vers de plus fortes concentrations
- leur rendement final en biomasse, qui doit être suffisant¹⁵ pour ne pas désenrichir les populations et les mener à une fin évolutive
- l'envie de converger vers des concentrations identique au travers de plusieurs chemins évolutifs, de manière à pouvoir les comparer et évaluer l'impact de l'histoire évolutive sur l'adaptabilité

A chaque cycle, l'ensemble des courbes de croissance récoltées était donc traité de manière à réaliser notre sélection.

En mesurant le temps de division pour l'ensemble des courbes à chaque cycle il est alors possible d'évaluer l'adaptabilité moyenne de chacune des métapopulations à chaque cycle, et ainsi suivre l'évolution de cette adaptabilité tout au long de notre expérience d'évolution (Figure V-15).

¹⁵ Nous avons essayé de maintenir cette valeur au moins supérieure à la moitié de la biomasse obtenue chez les contrôles, mais nous verrons que ce critère ne pouvait plus être respecté sur les derniers cycles de propagation.

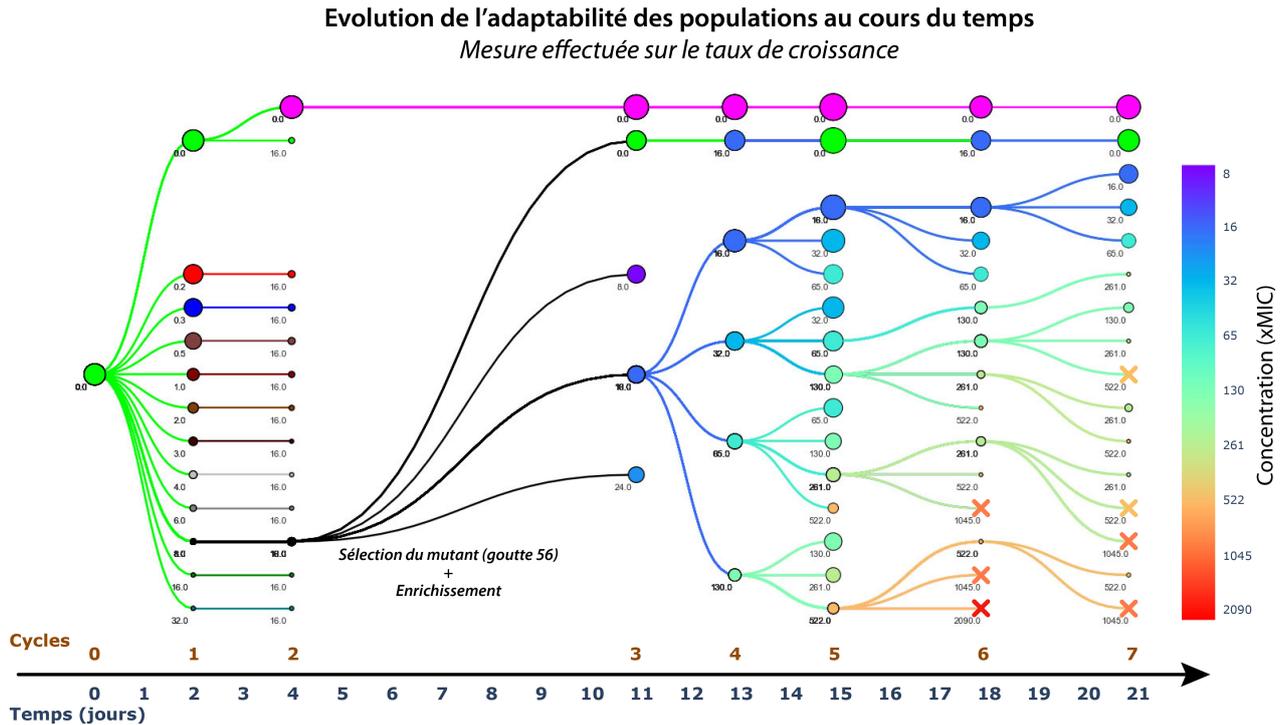


Figure V-15 : Évolution de l'adaptabilité des populations au cours de l'expérience d'évolution (taux de croissance)
 Cette représentation en arbre d'hérédité, basée sur le modèle précédemment présenté (voir Figure V-8), permet une représentation simple de l'évolution de l'adaptabilité de l'ensemble des métapopulations au cours des cycles. Chaque métapopulation se compose d'au moins 16 gouttes (mis à part les contrôles, qui en possèdent que 8). Lorsqu'aucune population ne croît, une croix est employée à la place d'un cercle. Les cercles, eux, représentent le comportement moyen mesuré sur les populations présentant une croissance, bien qu'elle puisse être faible. Pour rappel, la taille des cercles traduit la mesure de fitness comparative de la métapopulation évoluée par rapport à la population ancestrale : plus un cercle est gros, plus la population est adaptée, et vice-versa. Pour le temps de division la taille des cercles est donc proportionnelle au rapport $G_a/G_{ev} = \mu_{ev}/\mu_a$. A partir du 3^{ème} cycle, les couleurs correspondent aux concentrations auxquelles les populations sont soumises, concentrations également indiquées en indice des cercles.

Cette représentation nous permet d'obtenir une vue globale sur l'évolution de la valeur adaptative des différentes populations au cours du temps. Jusqu'au troisième cycle, nous retrouvons les résultats obtenus et présentés précédemment (V.1 et V.2), puis, à partir du troisième cycle nous observons le résultat de la sélection artificielle appliquée, sur laquelle sera maintenant consacrée notre analyse.

Alors que les premières étapes de propagation (jusqu'au cycle 5) permettent une adaptation des populations à des concentrations supérieures à la concentration inhibitrice du mutant sélectionné qui est, pour rappel, de 255xMIC_{réf} avec l'inoculum utilisé en gouttes, leur adaptabilité semble diminuer sur la fin de notre expérience (à partir du sixième cycle).

Nous souhaitons donc conduire notre analyse en deux temps. Dans un premier temps, nous nous intéresserons principalement à l'étude des premières étapes d'adaptation (jusqu'au cycle 5), sur lesquelles l'impact de l'histoire évolutive sur l'adaptabilité des populations face à la TMP peut être évalué. Dans un second temps, nous nous intéresserons aux résultats obtenus sur la fin de notre expérience et nous tâcherons d'identifier la cause de la perte d'adaptabilité des populations.

La mesure sur le rendement final a également été effectuée et donne des résultats similaires (Annexe VI). Nous nous consacrerons donc, dans la suite de notre analyse, aux mesures effectuées sur le taux de croissance.

V.3.B. La sélection artificielle au service de l'exploration

Au cours de notre expérience, nous avons dirigé l'évolution des populations tout en essayant de converger vers des concentrations identiques au travers de plusieurs chemins évolutifs, de manière à pouvoir les comparer et ainsi évaluer l'impact de l'histoire évolutive sur l'adaptabilité. Nous souhaitons donc, dans cette partie, présenter quelques cas particuliers sélectionnés pour faire cette étude.

V.3.B.1. Adaptabilité en présence d'une pression de sélection naturelle constante

Premièrement, et pour voir si le mutant continue d'améliorer sa fitness en conditions de culture constantes, nous avons maintenu une métapopulation à un stress constant de 16xMIC, équivalent aux conditions de croissance dont le mutant est issu (au cycle 2).

Pour représenter l'évolution de son adaptabilité, nous avons ici décidé de comparer sa fitness à celle des populations contrôles, afin de voir jusqu'à quel point ce mutant pouvait, en conditions stressantes, se rapprocher du comportement de populations originelles, cultivées sans antibiotique (Figure V-16).

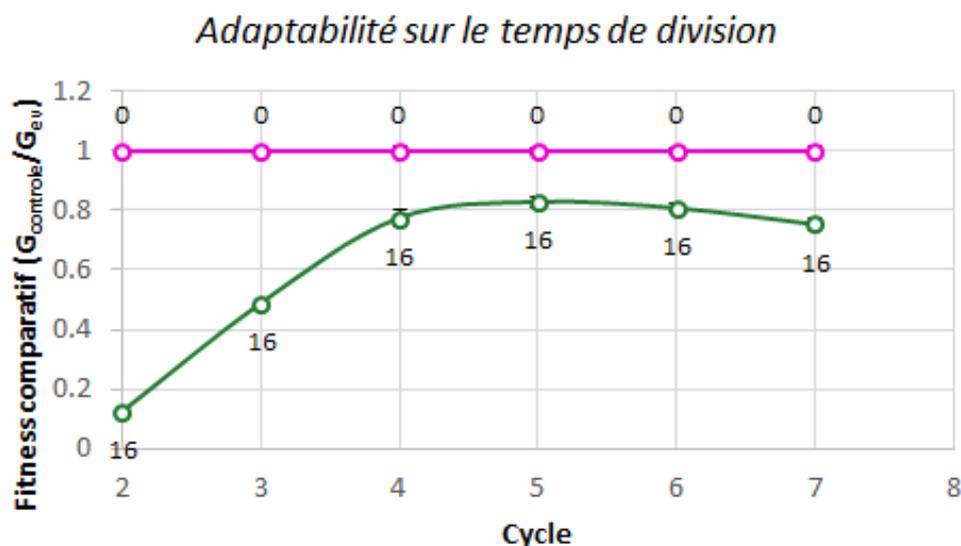


Figure V-16 : Évolution de la fitness du mutant en conditions de cultures constantes (16xMIC)

Ce graphique représente l'évolution de la fitness comparative entre les populations mutantes maintenues en culture dans un milieu aux conditions constantes (16xMIC) et les populations contrôles (populations de bactéries *E. coli* maintenues en culture en conditions non stressantes, jamais soumises à l'antibiotique), pour le temps de division. Les nombres inscrits à côté des points de mesures correspondent à la concentration à laquelle la métapopulation était soumise pour le cycle en question. Des barres d'erreur représentant l'écart type des valeurs mesurées sont également présentes mais souvent non visibles car inférieures à la taille des marqueurs.

Comme le montre ce graphique (Figure V-16), après que la population mutante ait acquis une forte résistance à l'antibiotique, elle ne s'est pas arrêtée de chercher à s'adapter pour si peu. Nous avons vu dans la partie précédente (V.2.C.1) que la phase d'enrichissement hors de la machine et l'incubation réalisée au 3^{ème} cycle avaient déjà permis au mutant de considérablement améliorer sa fitness, résultat également visible sur ces graphes (Figure V-16). Néanmoins, nous pouvons ici voir que les populations mutantes ont continué à améliorer leur fitness (que cela concerne son temps de division ou son rendement final voir Annexe VII), acquérant des paramètres de croissance presque aussi bons

que ceux des populations contrôles, mais, ici, dans une concentration deux fois supérieure au MIC de référence. Ceci vient confirmer le fait que le compromis effectué entre résistance et croissance est ensuite compensé par des mécanismes d'adaptation secondaire, comme l'avaient observé Baym et al. [29](voir I.3.B.1). Ces graphes nous montrent aussi que cette adaptation est très reproductible, car chacune des huit populations composant la métapopulation à chaque cycle donne une mesure de fitness quasi-identique (mesure indiquée par les barres d'erreurs, souvent non visibles car inférieures à la taille des marqueurs).

V.3.B.2. Impact de l'histoire évolutive sur l'adaptabilité

Dans cette partie, nous souhaitons voir si, dans notre système expérimental, le chemin évolutif possède un impact sur l'adaptabilité. Pour cela, nous avons choisi d'analyser les résultats obtenus au cinquième cycle et de comparer les chemins menants, à ce cycle, à une même concentration (Figure V-17).

Comparaison des populations dont la concentration au 5^{ème} cycle est de :

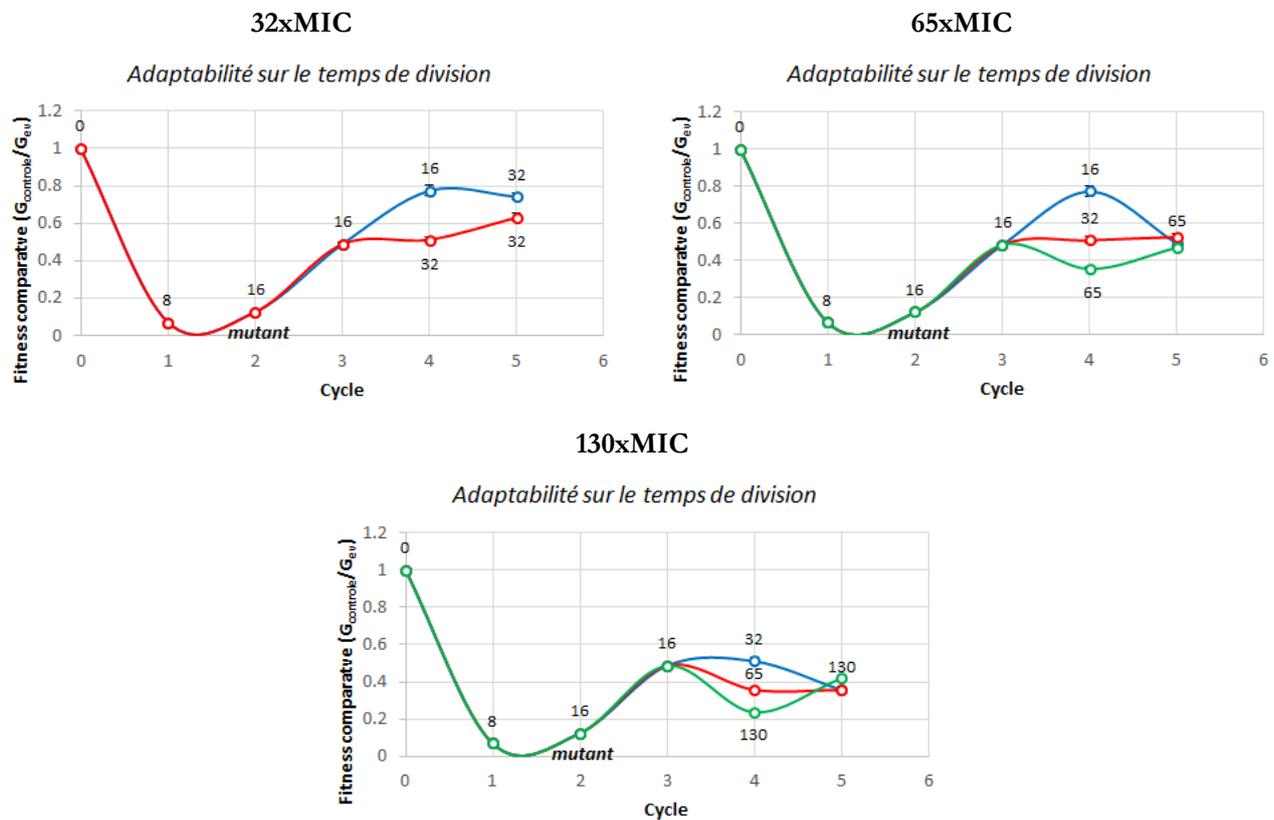


Figure V-17 : Étude de l'impact du chemin évolutif sur l'adaptabilité des populations (sub-MIC)

Ces graphiques représentent l'évolution de la fitness comparative entre les populations évoluées, soumises à différents chemins évolutifs terminant tous, au cycle 5, à des concentrations inférieures au MIC_{M1} (32, 65 et 130xMIC), et les contrôles (populations de bactéries E. coli maintenues en culture en conditions non stressantes, jamais soumises à l'antibiotique), pour le temps de division. Les nombres inscrits à côté des points de mesures correspondent à la concentration à laquelle la métapopulation était soumise pour le cycle en question. Des barres d'erreur représentant l'écart type des valeurs mesurées sont également présentes mais souvent non visibles car inférieures à la taille des marqueurs.

Ici, nous travaillons avec la population mutante, et donc à des concentrations inférieures à sa concentration inhibitrice mesuré en goutte, qui est, pour rappel de $C_{M1, \text{goutte}} = 125 \mu\text{g/mL}$ (soit

255xMIC_{réf}). A première vue, la Figure V-17 montre qu'à une concentration sub-MIC, le chemin évolutif importe peu dans l'adaptabilité d'*E. coli* face à la TMP. Peu importe le chemin emprunté au cycle 4, le retour à une même concentration au cycle 5 conduit à des mesures de fitness très similaires (les résultats obtenus sur le rendement final sont donnés en Annexe VIII). Bien que les concentrations soumises à une pression de sélection naturelle moins forte au cycle 4 présentent une meilleure valeur sélective que celles directement soumises à une forte pression de sélection, leur avantage acquis à ce cycle ne leur permet pas une meilleure adaptabilité au cycle 5. Ceci est vrai, dans notre système, car nous maintenons les populations suffisamment longtemps en culture pour qu'elles atteignent toutes la saturation. A moins que le temps de division ne soit très grand (>10h), ce paramètre importe donc peu sur l'adaptabilité des populations, et c'est, dans ce cas-ci, principalement le rendement final qui conditionne l'adaptabilité de cycles en cycles. Les différences de fitness sur le rendement final sont ici de trop faible ampleur pour avoir un impact sur l'adaptabilité (Annexe VIII), ce qui justifie le fait que le chemin évolutif importe peu dans notre expérience, en concentrations sub-MIC.

Pour conclure, nous pouvons dire qu'en ayant un impact sur le temps de division et sur le rendement final, l'histoire évolutive joue effectivement un rôle dans l'adaptabilité, bien qu'ici, dans nos conditions de travail, cette dernière n'ait que peu d'impact. En revanche, face à un renouvellement plus fréquent des conditions de culture, comme, par exemple, lors de la prise d'antibiotiques pour combattre une infection (prise toutes les ~6h), la différence de fitness observable au cycle 4 deviendrait, pour les populations les mieux adaptées, un réel avantage sélectif. Ces populations, soumises à un stress moins fort au cycle 4, auraient alors des chances de s'adapter, tandis que les autres n'y parviendraient pas, et seraient éliminées.

En ce qui concerne les populations qui terminent à un stress supérieur à la concentration inhibitrice, l'impact du chemin évolutif ne semble, encore une fois, que peu impacter l'adaptabilité (Figure V-18).

Comparaison des populations dont la concentration au 5^{ème} cycle est de :

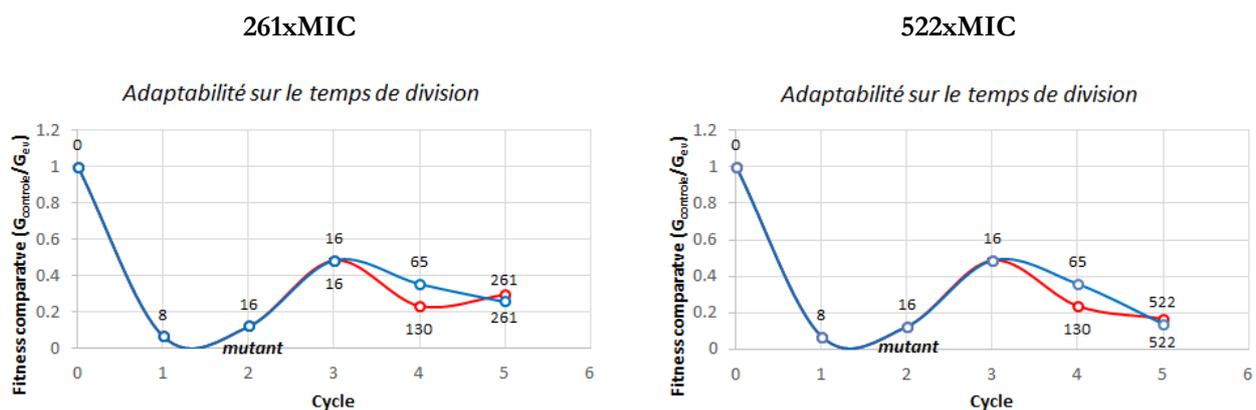


Figure V-18 : Étude de l'impact du chemin évolutif sur l'adaptabilité des populations (sup-MIC)

Ces graphiques représentent l'évolution de la fitness comparative entre les populations évoluées, soumises à différents chemins évolutifs terminant tous, au cycle 5, à des concentrations supérieures au MIC_{MH} (261 et 522xMIC), et les contrôles (populations de bactéries *E. coli* maintenues en culture en conditions non stressantes, jamais soumises à l'antibiotique), pour le temps de division. Les nombres inscrits à côté des points de mesures correspondent à la concentration à laquelle la métapopulation était soumise pour le cycle en question. Des barres d'erreur représentant l'écart type des valeurs mesurées sont également présentes mais souvent non visibles car inférieures à la taille des marqueurs.

Bien que le chemin évolutif ait, encore une fois, que peu d'impact, les résultats obtenus pour chaque métapopulation à chaque cycle sont très reproductibles, et cela prouve la répétabilité des mécanismes d'adaptation de *E. coli* face à la TMP, résultat également observé par Toprak et al. dans le morbidostat réalisé en parallèle [35](voir I.3.B.2). Aussi, cette expérience montre qu'en trois étapes sub-MIC (du cycle 2 à 4), le mutant a amélioré sa fitness et a permis, au cycle 5, l'adaptation à une concentration supérieure à son MIC (qui est de $255 \times \text{MIC}_{\text{réf}}$). Néanmoins, à ces concentrations supérieures au MIC nous commençons à voir un réel effet de l'antibiotique sur le fitness des populations. Les temps de divisions sont ici cinq fois plus grands que celui des populations contrôles et s'approchent, donc, du temps limite (autour de 10h) permettant une croissance complète des populations durant le temps imparti (soit des incubations de 48h). Les rendements finaux diminuent également, et passent en dessous du seuil limite de propagation que nous nous étions fixé, qui est de 50% du rendement final des populations contrôles, afin de s'assurer que l'impact du stress antibiotique ne dépende pas de la taille de l'inoculum propagé (Annexe IX).

En quête d'adaptabilité face à un stress en perpétuelle augmentation, nous avons continué à employer la sélection artificielle pour diriger l'évolution des populations présentes, en ne respectant plus vraiment l'un de nos critères de sélection : celui basé sur un rendement final en biomasse suffisant (au moins supérieur à 50% du rendement final des populations contrôles). Ces effets semblent avoir conduit, lors des propagations suivantes (aux cycles 6 et 7), à une perte d'adaptabilité et au désenrichissement des populations, résultats que nous souhaitons maintenant interpréter.

V.3.C. Gestion des pressions de sélection

Sur les deux derniers cycles de propagation (cycles 6 et 7), nous observons une perte d'adaptabilité de l'ensemble des populations soumises à un stress antibiotique de forte intensité (concentration supérieure au MIC du mutant, soit $C > 255 \times \text{MIC}$). En s'intéressant de plus près à ce phénomène, il semblerait que cette perte d'adaptabilité soit en fait liée à un effet de nombre. Rappelons qu'en début de chapitre (V.1.A) nous avons montré que la taille de l'inoculum jouait un rôle important dans l'adaptabilité des populations face à un stress antibiotique, et principalement autour de notre inoculum de travail, où une simple dilution par 2 conduisait à une diminution du MIC de même ampleur (voir Figure V-1). Or, dans notre technologie, la taille de l'inoculum propagé dépend, aujourd'hui, du rendement final de la population donneuse. Pour s'affranchir de cet effet, nous avons, au cours de notre expérience, toujours cherché à sélectionner et propager les populations ayant un rendement final au moins supérieur à la moitié du rendement maximal (obtenu pour les contrôles), de manière à ce que l'effet du stress antibiotique de varie pas. Néanmoins, cette condition n'a plus pu être respectée à partir des populations obtenues au cinquième cycle et sur les deux dernières propagations, où la biomasse finale n'était pas suffisante, conduisant, peu à peu, à une perte d'adaptabilité des populations. La Figure V-19 ci-dessous illustre ce phénomène pour l'ensemble des métapopulations terminant, au dernier cycle, à une concentration juste supérieure au MIC ($C = 261 \times \text{MIC}$) et présentant encore une légère croissance.

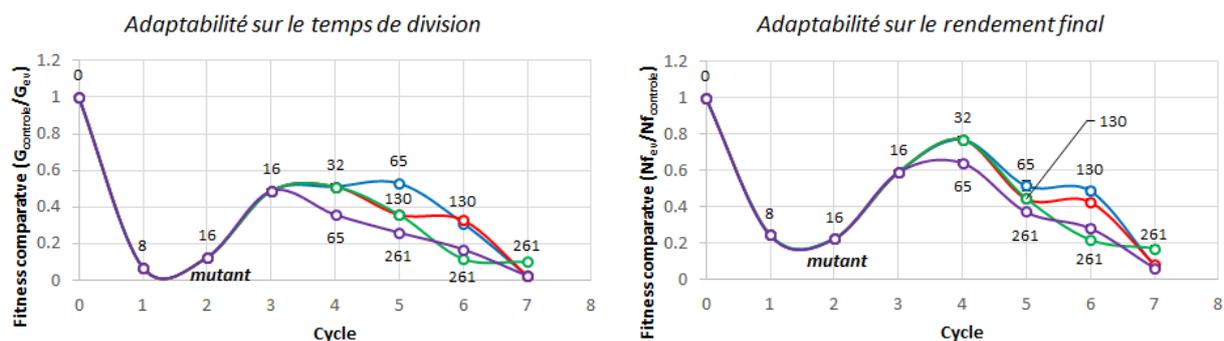


Figure V-19 : Perte d'adaptabilité suite à une pression de sélection naturelle trop forte

Ces graphiques représentent l'évolution de la fitness comparative entre les populations évoluées, soumises à différents chemins évolutifs terminant tous, au cycle 7, à des concentrations supérieures au MIC_{M1} (261xMIC), et les contrôles (populations de bactéries *E. coli* maintenues en culture en conditions non stressantes, jamais soumises à l'antibiotique), pour le temps de division et le rendement final. Ils mettent en évidence la perte d'adaptabilité observable sur les derniers cycles de notre expérience d'évolution.

En ne respectant pas l'une de nos conditions de propagation, qui était de propager les populations possédant un rendement final supérieur à 50% de la biomasse des populations contrôles, nous avons malheureusement conduit nos populations vers l'extinction. L'effet ressenti sur les deux derniers cycles est comparable à celui que nous aurions obtenu si, au lieu de diminuer l'inoculum, nous avons doublé la concentration en antibiotique.

Bien que ces derniers cycles ne semblent pas très fructueux, rappelons que nous nous intéressons ici aux comportements phénotypiques moyens, sur l'ensemble des populations d'une métapopulation. En s'intéressant de plus près aux populations de manière individuelle, nous pouvons cependant à nouveau identifier des comportements singuliers, résultat probable de la sélection de nouveaux mutants (Figure V-20).

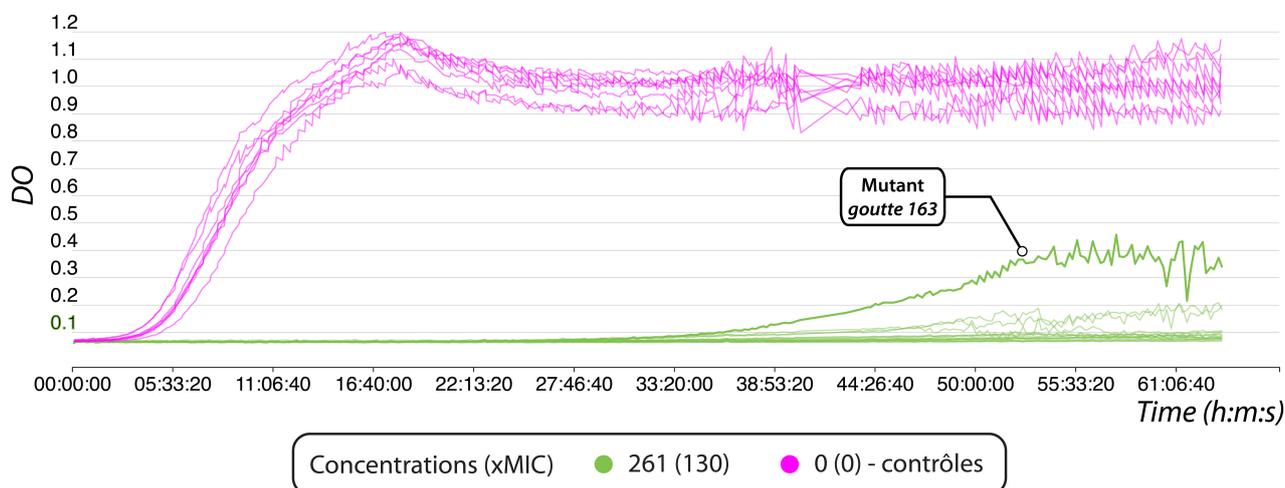


Figure V-20 : Identification d'un probable mutant conférant une résistance à la TMP (cycle 7)

Cette figure présente les courbes de croissance de populations issues des deux métapopulations du cycle 7, en rose : les contrôles 0 (0), en vert : les populations issues de 130xMIC et soumises à une concentration de 261xMIC. Nous pouvons ici voir que la population contenue dans la goutte 163 diverge complètement du comportement des populations soumises aux mêmes conditions de croissance (dont la croissance est quasi-inhibée), laissant penser à l'identification d'un nouveau mutant, conférant une résistance d'autant plus grande à la TMP (car nous sommes ici déjà au-dessus du MIC du mutant M1).

L'évolution face à la TMP étant très échelonnée et reposant sur l'acquisition de mutations successives, il était nécessaire, une fois la concentration inhibitrice du mutant passée (de 255xMIC) de sélectionner une seconde mutation pour pouvoir poursuivre le processus évolutif. Nous aurions alors pu reproduire la procédure réalisée à l'étape 2 et sélectionner ce mutant pour continuer à pousser l'évolution mais, nous avons fait le choix d'arrêter là notre première preuve de concept, car elle nous donne suffisamment de certitudes pour l'avenir. Aussi, l'ensemble des populations ayant été récupérées à chaque cycle en dehors de la machine grâce au module de tri et d'extraction des gouttes (le sorter), nous pouvons, si nous le souhaitons, relancer notre expérience à partir de l'étape voulue. Ces échantillons peuvent également être utilisés pour réaliser une étude génétique afin d'identifier les mutations responsables des adaptations phénotypiques que nous avons observé dans à notre technologie.

Ces résultats sont ceux de la toute première expérience d'évolution conduite dans notre technologie, et il est donc normal de rencontrer ce genre de situations. Nous pensions le système mis en place suffisamment résilient pour que les populations s'adaptent, mais les stress appliqués sur les derniers cycles se sont révélés être trop fort pour permettre une adaptation dans le temps d'incubation fixé ; et ce bien que la durée des derniers cycles ait été augmentée à 3 jours, pour s'affranchir de l'augmentation du temps de division.

A refaire cette expérience, nous devrions procéder par étapes plus graduelles, où plus longues, pour permettre aux populations d'augmenter leur valeur sélective (ou à des mutants de s'imposer) avant qu'elles ne soient soumises à un stress de plus forte intensité. Ceci peut être aisément conduit, dans notre technologie, en alternant des phases de propagation en conditions de culture constantes (par transfert en série) pour que le système s'adapte, puis des phases de sélection artificielle, visant à diriger l'évolution.

Nous retrouvons là les principes généraux établis au Chapitre II (II.1) sur la gestion des clefs de l'évolution (par la gestion des trois niveaux de sélection), que nous avons bien su mettre en œuvre jusqu'au cinquième cycle, et un peu moins bien en fin d'expérience, où nous avons conduit une évolution trop directive. Notre technologie possède actuellement tous les outils pour permettre la bonne gestion des trois niveaux de sélection (aléatoire, naturelle, artificielle) et nous devons juste en améliorer notre maîtrise ; maîtrise qui évolue au rythme des expériences que nous réalisons.

V.3.D. Conclusion

Cette troisième étape de notre expérience d'évolution nous a permis de montrer que notre technologie possède effectivement la capacité de diriger l'évolution de centaines de populations en parallèle. Comme l'adaptabilité de *E. coli* face à la TMP est très reproductible et ne présente qu'un seul chemin évolutif, cette expérience n'est pas la plus adaptée pour valoriser la capacité de notre technologie à générer de la diversité et à explorer diverses voies évolutives. Néanmoins, elle nous permet tout de même de prouver que notre technologie en possède la capacité, et elle montre que l'on retrouve bien les résultats attendus, avec des mesures de valeurs adaptatives très répétables au sein de chaque métapopulation. Cette étape met ainsi en lumière les capacités du module de transfert, innovation de rupture de notre technologie, qui permet d'appliquer la sélection artificielle à l'ensemble des populations, via l'indentification, la sélection, et la propagation. Bien que ce module présente encore

des limitations, il permet déjà de valider le fonctionnement et le concept de notre technologie, et au vu de ses nombreuses possibilités d'amélioration, son avenir semble prometteur.

Cette étape prouve également que notre technologie possède les outils pour maîtriser les trois niveaux de sélection, et prouve l'intérêt de l'analyse phénotypique en temps réel. Suite à l'observation d'une perte d'adaptabilité sur les deux derniers cycles, nous aurions pu, si nous souhaitions continuer cette expérience, relâcher les pressions de sélection naturelle et artificielle afin de permettre aux populations de se réadapter. Aujourd'hui, cette gestion des pressions de sélections et le choix des populations à propager ne sont pas automatisés, et c'est en réalisant les expériences que nous apprenons à en avoir la maîtrise. Nous travaillons, en parallèle, au développement de briques technologiques pour qu'à terme, notre technologie possède « l'intelligence » de savoir gérer les différentes pressions de sélection pour diriger proprement l'évolution.

V.4. Conclusion et perspectives

La réalisation de cette première expérience d'évolution dans notre technologie avait pour but de valider les différentes étapes de fonctionnement de notre machine, tout en démontrant qu'elle permettait effectivement de faire évoluer des microorganismes. Aujourd'hui, cette expérience d'évolution constitue la première preuve de concept de notre technologie, et permet de démontrer que la machine d'évolution fonctionne et qu'elle possède les capacités nécessaires pour cultiver, analyser, sélectionner, propager des centaines de populations bactériennes en parallèle, et de diriger leur évolution tout en explorant divers chemins évolutifs. Cette expérience nous a également permis de démontrer sa fiabilité et sa robustesse sur le long terme, avec un fonctionnement continu sur trois semaines. Au terme de ces trois semaines, nous sommes parvenus à faire pousser des populations de *E. coli* dans une concentration de 522xMIC, alors qu'au départ, leur croissance était inhibée à une concentration de 8xMIC (pour un même inoculum), prouvant la capacité de notre technologie à faire évoluer des populations microbiennes. Cette expérience n'apporte pas de nouveaux résultats à ce modèle antibiotique bien connu de la littérature [29], [35], mais permet de retrouver les résultats attendus, validant ainsi fonctionnement et concept de notre nouvelle technologie, et permettant de prouver qu'elle est bien adaptée pour travailler sur l'évolution de communautés microbiennes.

Dans l'optique de continuer à valider notre technologie, et pour en démontrer les pleines capacités il serait intéressant de réaliser une seconde expérience du même type, avec un antibiotique moins spécifique que la triméthoprime (un antibiotique ne possédant pas un seul gène cible). Un stress moins spécifique permettrait l'apparition et la sélection de plus de mutations variées, et donc l'observation d'une plus grande diversité. Une telle expérience nous permettrait alors de valoriser un des intérêts principaux de notre technologie qui est de pouvoir observer et maintenir une grande diversité (grâce à la compartimentation et à la parallélisation), et de pouvoir explorer le paysage évolutif. Cette expérience n'a pas pu être conduite au cours de ma thèse mais fait partie de nos ambitions à court terme, et nous sommes convaincus que les résultats obtenus ne viendront que confirmer le potentiel de notre technologie.

Comme nous le mentionnons depuis le début de cette thèse, l'objectif majeur de notre projet est d'utiliser notre technologie pour travailler sur des communautés de microorganismes naturelles, et en tirer bénéfice. En effet, notre technologie offre le potentiel de diriger l'évolution selon d'autres critères que la fitness (ici employée), et il existe un réel intérêt à diriger l'évolution selon des fonctions complexes, non pas liées à des individualités mais à des synergies entre microorganismes. Parmi ces

fonctions nous avons par exemple évoqué au premier chapitre (I.2) la capacité de certaines communautés à dégrader des hydrocarbures [10]–[13], ou du plastique [14]–[17]. Des chercheurs se sont également intéressés à la dégradation de pesticides [51], ou de matière organique (ex : cellulose)[79], [80]. Autant de fonctions intéressantes à exploiter, et pour lesquelles notre technologie apporterait une plus-value. En parallèle de ce travail de thèse, nous avons donc commencé à mettre en place une première expérience d'évolution basée sur des communautés microbiennes du sol, et visant à améliorer leur capacité à solubiliser le phosphate, élément clé de l'écologie du sol, pour le rendre assimilable par les plantes.

Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que les communautés de microorganismes, naturellement impliqués dans la dynamique écologique de la biosphère, pouvaient être la clef de multiples enjeux écologiques, sanitaires, alimentaires, énergétiques ou industriels. Leurs nombreux bénéfices ont justifié notre envie de chercher à les exploiter. La technologie d'évolution, dite « Machine d'Évolution Microbienne » (MEM), développée au cours de cette thèse, permet de le faire en dirigeant l'évolution d'un grand nombre de communautés microbiennes en parallèle.

En appliquant les lois de l'évolution Darwinienne à des cocktails de microorganismes naturels, la machine d'évolution permet de faire émerger, par évolution dirigée, de manière naturelle et automatisée, des interactions capables d'établir des cohabitations stables, durables et bénéfiques.

Son fonctionnement repose sur deux grands concepts : la compartimentation et la parallélisation des cultures ; concepts mis en œuvre par l'emploi de la millifluidique et de gouttes millimétriques. Grâce à ces bioréacteurs que sont les gouttes, des centaines de communautés microbiennes peuvent être cultivées, manipulées et analysées en parallèle. À partir des analyses conduites en temps réel, l'évolution des communautés peut ensuite être dirigée par sélection (artificielle) et propagation des communautés souhaitées, grâce au « module de transfert », innovation au cœur de notre technologie.

Le fonctionnement de la MEM et son concept ont été validés par une première application biologique concrète illustrant le cas de l'acquisition d'une antibiorésistance chez des populations bactériennes d'*Escherichia coli*. Cette expérience, conduite sur un modèle antibiotique connu, permet de retrouver les résultats biologiques attendus. Elle nous conforte dans l'idée que cette machine est viable et permet effectivement de diriger l'évolution de centaines de populations bactériennes en parallèle, de manière automatisée et sur le long terme. Elle prouve également l'intérêt de notre technologie dans l'exploration de nombreux chemins évolutifs, et dans sa capacité à mettre à profit l'analyse quantitative dynamique pour diriger l'évolution. Dans cette expérience, c'est une mesure d'adaptabilité (ou fitness) qui est utilisée comme critère de sélection artificielle pour conduire l'évolution. Néanmoins, notre technologie offre le potentiel de diriger l'évolution selon d'autres critères, ne favorisant pas forcément les organismes les plus adaptés. Il est possible d'effectuer la sélection selon des fonctions complexes, issues de synergies entre microorganismes, telles que la capacité de dégradation d'un polluant, de production ou de transformation d'un élément.

L'objectif majeur de notre projet étant d'utiliser notre technologie pour travailler sur des communautés microbiennes naturelles, et de tirer profit de leurs bénéfices, nous travaillons actuellement à mettre en place une expérience d'évolution avec des communautés microbiennes du sol. Celle-ci vise à améliorer, par évolution dirigée, leur capacité à solubiliser le phosphate, élément clé de l'écologie du sol, pour le rendre assimilable par les plantes. Cette expérience fournit un exemple type de sélection artificielle, non pas réalisée sur la fitness, mais sur une fonction complexe : leur capacité de solubilisation du phosphate.

Nous ne sommes qu'à l'aube d'exploiter la pleine capacité de notre technologie. Au vu des premiers résultats obtenus et des nombreuses perspectives d'évolution, notre technologie est porteuse d'un avenir prometteur.

Annexes

Annexe I

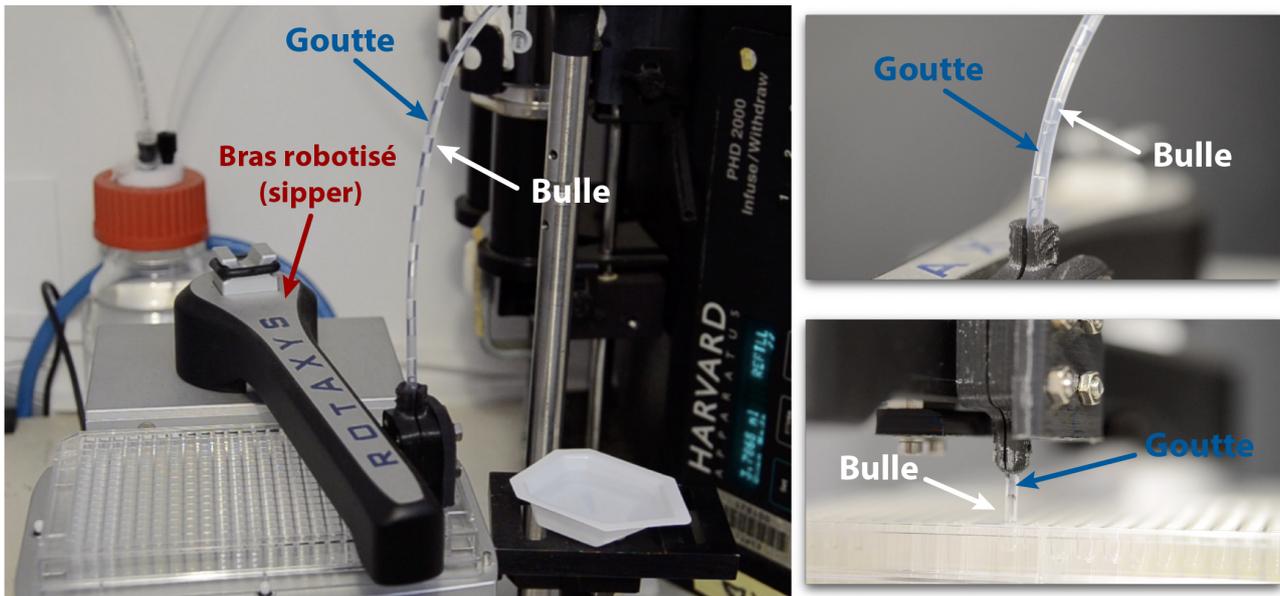


Figure Annexe 1 : Sipper

Photo du sipper en cours de génération d'un train de gouttes à partir d'une plaque à puits inoculée avec des populations bactériennes.

Annexe II

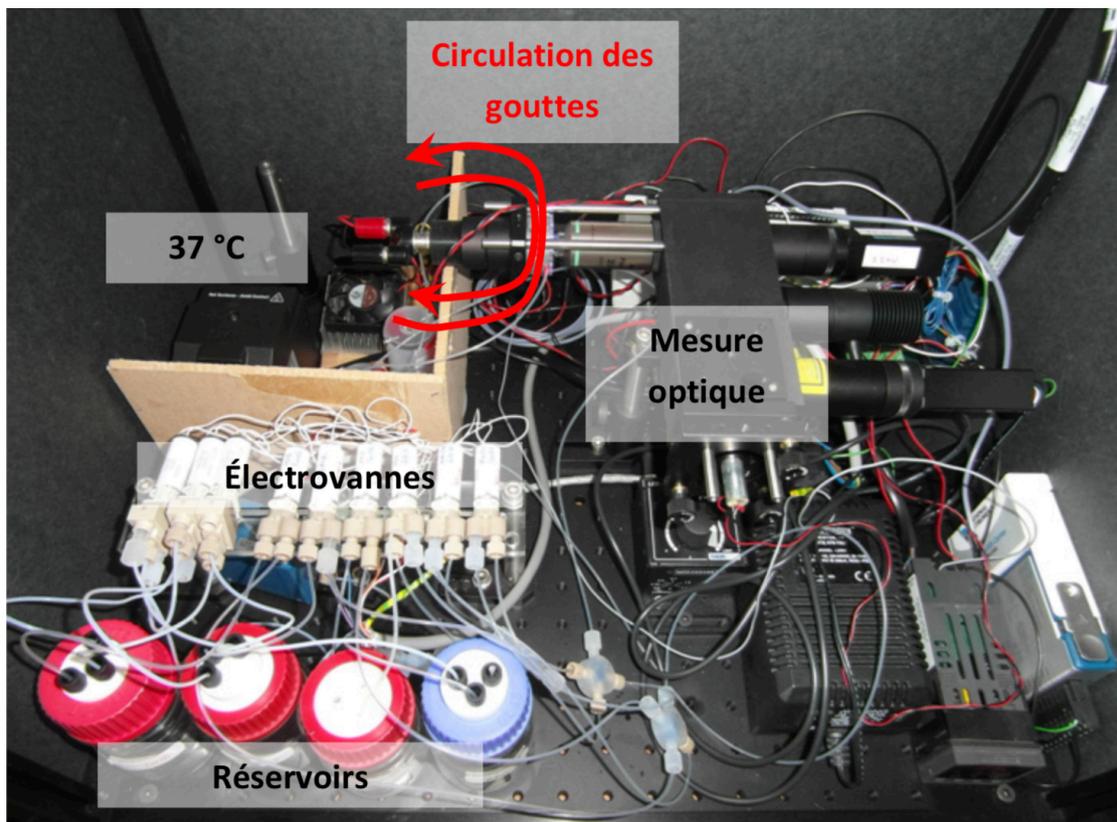


Figure Annexe 2 : Analyseur millifluidique (MDA)

Photo de l'analyseur millifluidique (MDA) conçue, et développée entre 2006 et 2015. On peut y voir le tube millimétrique, le module de fluorescence : permettant l'acquisition du signal, les réservoirs d'huile pressurisé et les électrovannes : permettant la manipulation du train de gouttes, et enfin l'enceinte thermalisée pour contrôle de la température (photo issue de [63]).

Annexe III

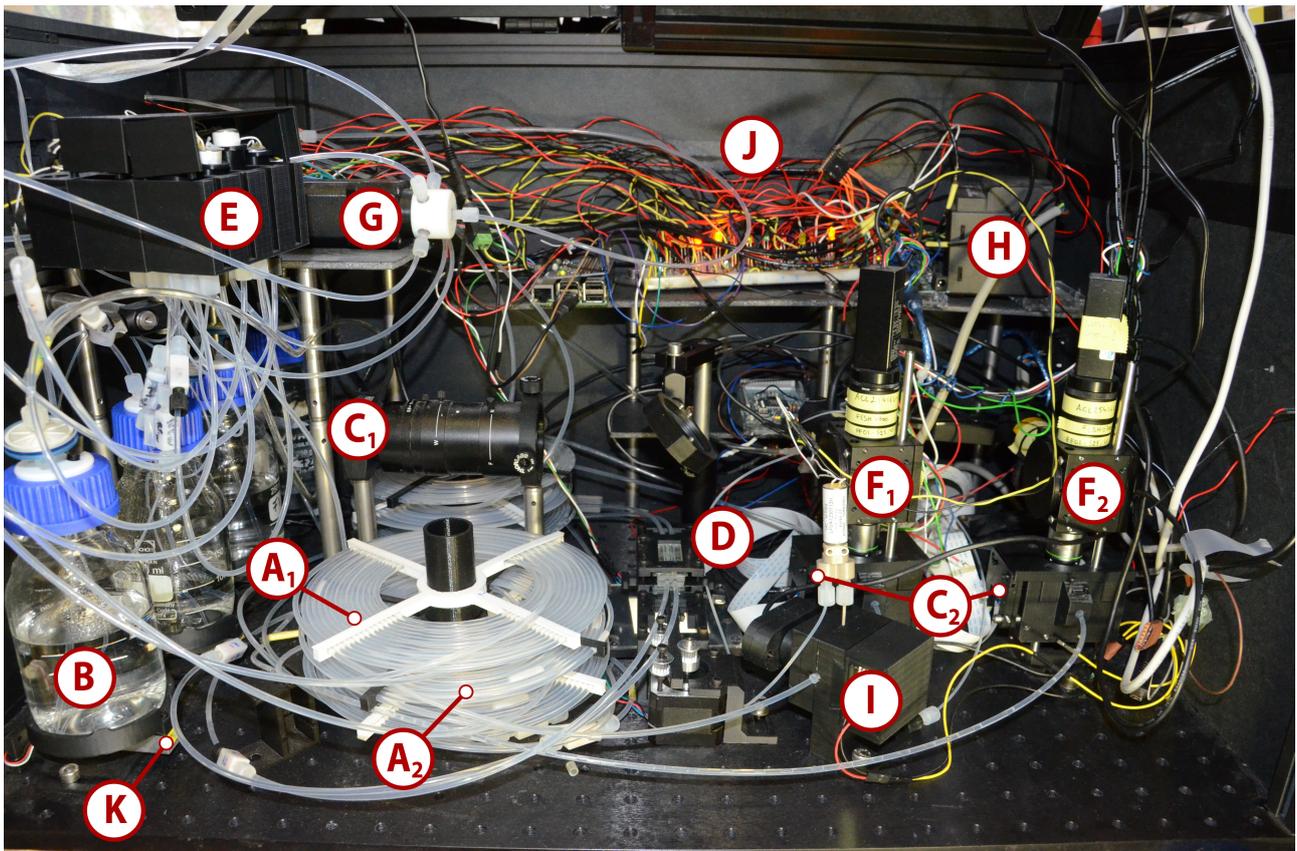


Figure Annexe 3 : Machine d'Évolution Microbienne (MEM)

Photo de la machine d'évolution microbienne conçue, et développée au cours de ma thèse. (A1, A2) Deux circuits fluidiques indépendants fait de tubes millimétriques en FEP et permettant la manipulation simultanée de deux trains de gouttes. (B) Réservoirs d'huile (FC40) à pression automatiquement contrôlée (à l'aide d'un contrôleur de pression) pour manipulation des trains lors des différentes étapes d'un cycle d'évolution. (C1) Caméra permettant la détection, l'identification et le suivi des gouttes en temps réel au sein du module de transfert et (C2) dans les autres zones de la machine. (D) Module de transfert, innovation de rupture permettant la sélection et la propagation d'échantillons biologiques ou chimiques entre deux trains de deux tubes indépendants. (E) Électrovannes permettant l'automatisation des écoulements fluidiques au sein de la machine. (F1, F2) Modules de fluorescence, pour acquisition du signal de fluorescence dans les bioréacteurs au sein des deux tubes. (G) Vanne rotative, pour aiguillage des trains générés dans le tube souhaité. (H) Système de chauffage pour contrôle de la température à l'intérieur de la machine. (I) Injecteur d'air, pour maintien de la taille des bulles d'air constante. (J) Réseau électronique pour contrôle des différents modules de la machine. (K) Détecteurs pour régulation automatique des niveaux d'huile dans les réservoirs.

Annexe IV

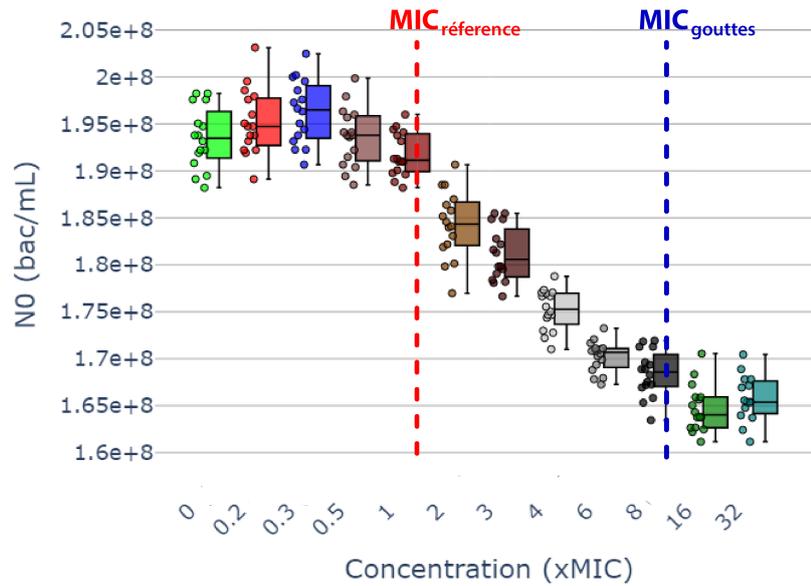


Figure Annexe 4 : Taille d'inoculum en fonction de la concentration en TMP (cycle 1)

Ce graphe représente l'inoculum de départ pour l'ensemble des populations soumises à une même concentration en antibiotique au premier cycle. Ce diagramme en boîte représente donc à la fois la taille de l'inoculum mesuré pour chacune des populations (sous forme de points) et la répartition des valeurs de chacune des métapopulations (ensemble des populations) soumises à une même concentration en antibiotique (sous forme de boîtes). Les boîtes donnent la valeur médiane, les 1^{er} et 3^{ème} quartiles, la valeur minimale et maximale (ou fréquence maximale). La ligne rouge tracée sur chacun des graphes correspond à la valeur du MIC de référence mesurée sur plaque et la ligne bleue à la valeur du MIC mesurée sur plaque pour un inoculum similaire à celui employé dans la machine, soit une valeur de 8xMIC de référence.

Les faibles différences observées sur la mesure des tailles des inoculums sont dues aux étapes de génération et de chargement du train par le sipper. Bien que, lors de la préparation de la plaque, tous les puits soient inoculés à une concentration identique ($\sim 1,6 \cdot 10^8$ bac/mL, soit $\sim 3,2 \cdot 10^6$ bac/goutte), les temps de génération et de chargement du train (prenant environ une heure) permettent aux populations de croître avant que les premières mesures soient effectuées dans la machine d'évolution. Les différences ici observées ne sont donc, à priori, pas représentatives de l'inoculum initial, et ne devraient pas avoir d'impact sur les autres paramètres, car elles représentent simplement la première mesure de biomasse effectuée dans la machine. Pour nous en assurer, nous nous sommes intéressés aux corrélations entre les différents paramètres mesurés (Figure Annexe 5).

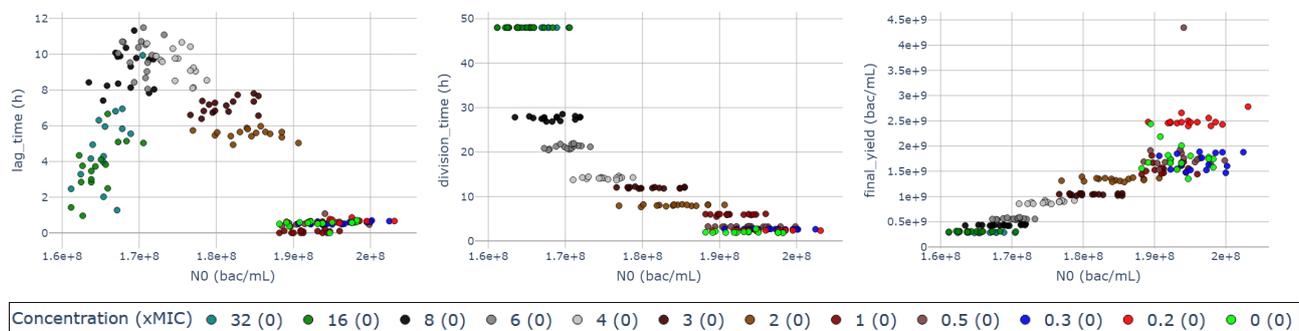


Figure Annexe 5: Impact des fluctuations de l'inoculum sur les paramètres de croissance (cycle 1)

Chacun de ces graphes présente l'évolution de l'un des paramètres de croissance (temps de latence, temps de division, rendement final) en fonction de la taille de l'inoculum pour chacune des populations maintenues en culture au premier cycle de notre expérience d'évolution.

Nous savons que la taille de l'inoculum joue un rôle dans la résistance face à un stress antibiotique [77]. Ici, cependant, les variations d'inoculum présentes n'ont aucun effet sur le temps de latence, le temps de division ou le rendement final, qui ne dépendent que du stress antibiotique. Seul le temps de latence ne semble pas être corrélé au stress antibiotique à de fortes concentrations, mais, nous verrons par la suite qu'il ne s'agit là que d'une erreur de mesure du temps de latence lorsque la croissance est faible, voire nulle.

Cette analyse nous permet de conclure que les variations d'inoculum ici mesurées ne correspondent donc pas à des variations de l'inoculum réel, mais simplement à une mesure « tardive » de ce dernier.

Annexe V

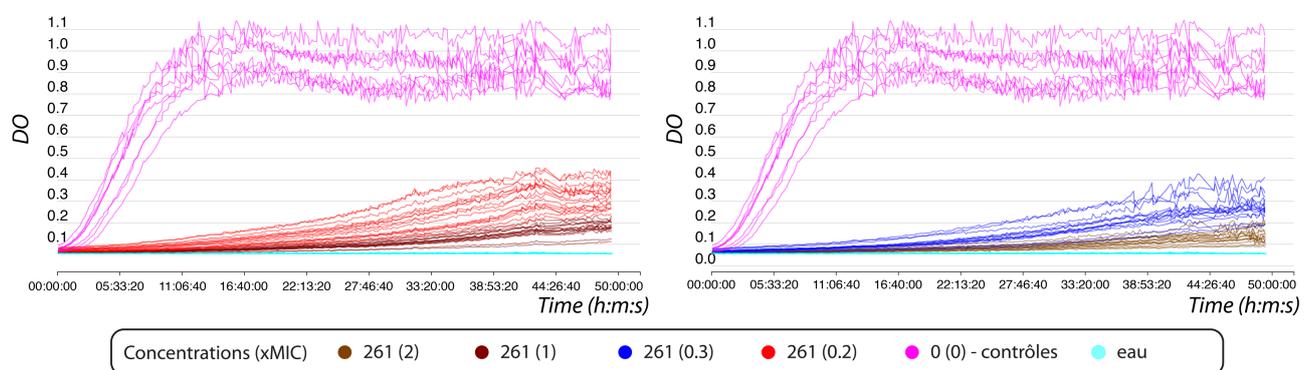


Figure Annexe 6 : Courbes de croissance illustrant une adaptabilité phénotypique (non génétique) (cycle 2)

Ces deux graphes sont en fait basés sur les mêmes données (celles du cycle 2), mais présentent les courbes de croissance de différentes métapopulations. Nous avons ici fait le choix de ne représenter que certaines métapopulations et de séparer ces données en deux graphiques pour faciliter la visualisation des courbes de croissances, qui normalement se chevauchent.

Pour expliquer les légères différences observables sur les temps de latence et de division et sur le rendement final au sein d'une même métapopulation, il faut alors se tourner vers la taille des inoculums (illustré Figure V-7), qui présentent plus de variabilité que celles observées au cycle précédent (Figure Annexe 4). Contrairement aux fluctuations du cycle précédent, erreur liée à une mesure tardive, celles ici mesurées correspondent bien à l'inoculum réel et sont expliquées par plusieurs facteurs. Tout d'abord, et comme nous l'avons montré au chapitre précédent (IV.1), nous sommes aujourd'hui assez limités sur le contrôle du volume transférable avec notre module de propagation. Bien que nous commandions le transfert de 10% du volume final, nous savons que ce volume est contrôlé à plus ou moins 2.5%, et ceci représente une première source de fluctuations. Mais, un autre phénomène de grande ampleur vient s'ajouter à celui-ci. Lors du transfert d'échantillons, nous ne prenons actuellement pas en compte la biomasse présente dans la goutte donneuse, et ceci peut conduire à des différences d'inoculums conséquentes d'une population à une autre, selon leur rendement final. La propagation d'une population n'atteignant pas un rendement final suffisant pourra ainsi conduire à son extinction. Pour pallier à cela, la bonne solution serait de jouer sur le volume transféré d'une goutte à une autre en prenant en compte la biomasse de ces dernières au moment du transfert. Cependant, ce contrôle n'est actuellement pas instauré dans notre technologie. La sélection artificielle (V.3.A) peut alors être une solution pour ne propager que les populations possédant une biomasse suffisante.

Annexe VI

En mesurant le rendement final pour l'ensemble des courbes à chaque cycle il est possible d'évaluer l'adaptabilité moyenne de chacune des métapopulations à chaque cycle, et ainsi suivre l'évolution de cette adaptabilité tout au long de notre expérience d'évolution (Figure Annexe 7).

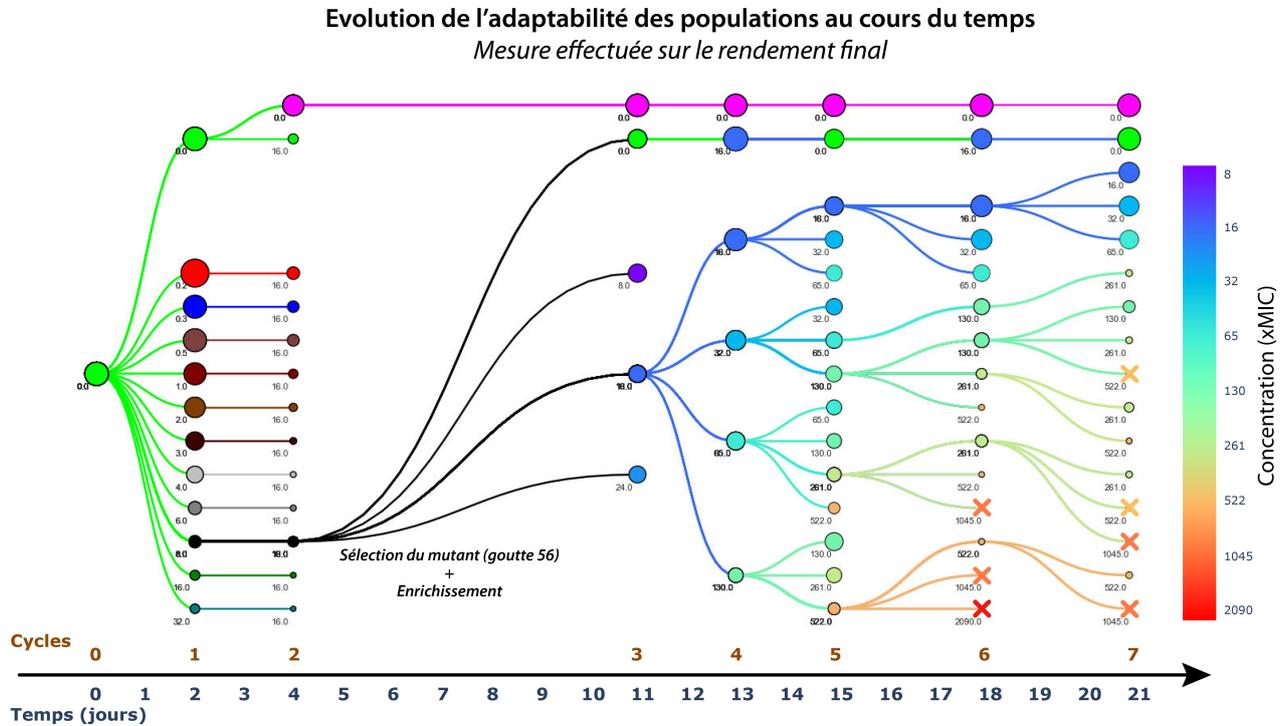


Figure Annexe 7 : Évolution de l'adaptabilité des populations au cours de l'expérience d'évolution (mesure réalisée sur le rendement final)

Cette représentation en arbre d'hérédité, basée sur le modèle précédemment présenté (voir Figure V-8), permet une représentation simple de l'évolution de l'adaptabilité de l'ensemble des métapopulations au cours des cycles. Chaque métapopulation se compose d'au moins 16 gouttes (mis à part les contrôles, qui en possèdent que 8). Lorsqu'aucune population ne croît, une croix est employée à la place d'un cercle. Les cercles, eux, représentent le comportement moyen mesuré sur les populations présentant une croissance, bien qu'elle puisse être faible. Pour rappel, la taille des cercles traduit la mesure de fitness comparative de la métapopulation évoluée par rapport à la population ancestrale : plus un cercle est gros, plus la population est adaptée, et vice-versa. Pour le rendement final la taille des cercles est proportionnelle au rapport N_{fev}/N_{fa} . A partir du 3^{ème} cycle, les couleurs correspondent aux concentrations auxquelles les populations sont soumises, concentrations également indiquées en indice des cercles.

Annexe VII

Adaptabilité sur rendement final

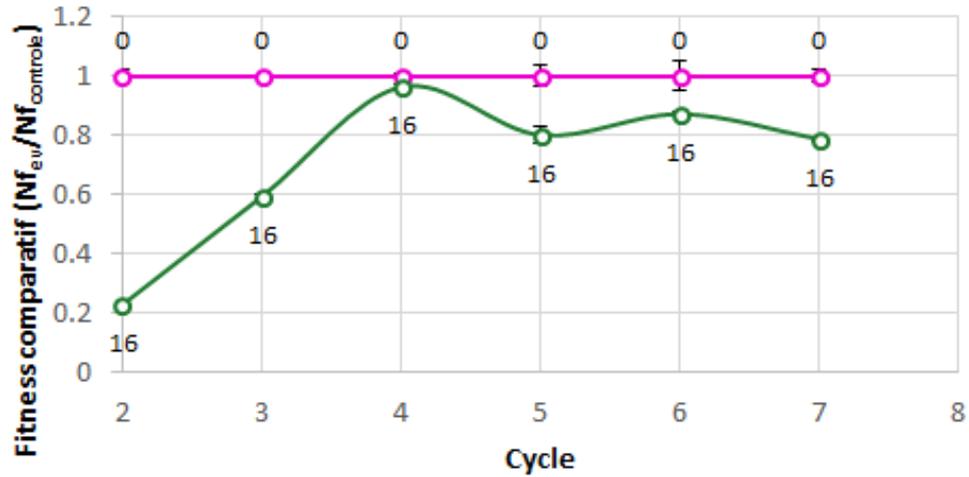


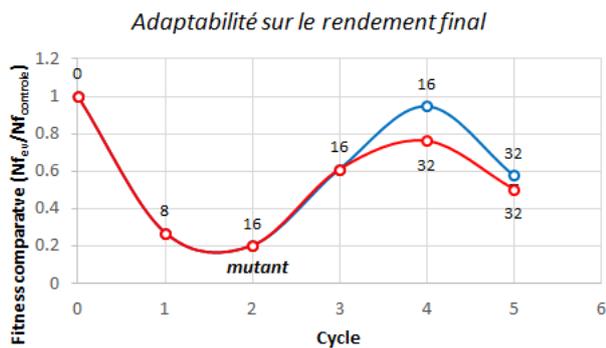
Figure Annexe 8 : Évolution de la fitness du mutant en conditions de cultures constantes (16xMIC)

Ce graphique représente l'évolution de la fitness comparative entre les populations mutantes maintenues en culture dans un milieu aux conditions constantes (16xMIC) et les populations contrôles (populations de bactéries *E. coli* maintenues en culture en conditions non stressantes, jamais soumises à l'antibiotique), pour le rendement final. Les nombres inscrits à côté des points de mesures correspondent à la concentration à laquelle la métapopulation était soumise pour le cycle en question. Des barres d'erreur représentant l'écart type des valeurs mesurées sont également présentes mais souvent non visibles car inférieures à la taille des marqueurs.

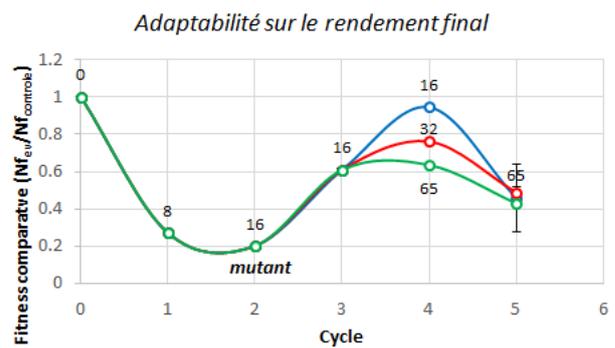
Annexe VIII

Comparaison des populations dont la concentration au 5^{ème} cycle est de :

32xMIC



65xMIC



130xMIC

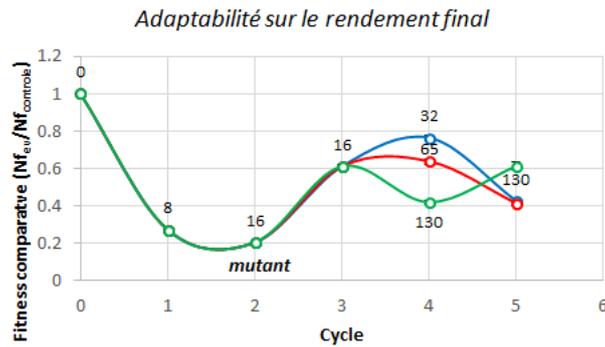


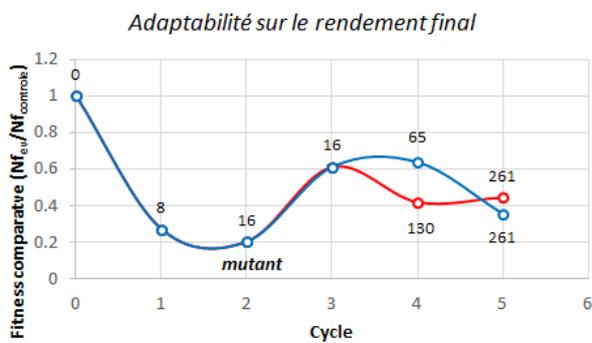
Figure Annexe 9 : Étude de l'impact du chemin évolutif sur l'adaptabilité des populations (sub-MIC)

Ces graphiques représentent l'évolution de la fitness comparative entre les populations évoluées, soumises à différents chemins évolutifs terminant tous, au cycle 5, à des concentrations inférieures au MIC_{M1} (32, 65 et 130xMIC), et les contrôles (populations de bactéries E. coli maintenues en culture en conditions non stressantes, jamais soumises à l'antibiotique), pour le rendement final. Les nombres inscrits à côté des points de mesures correspondent à la concentration à laquelle la métapopulation était soumise pour le cycle en question. Des barres d'erreur représentant l'écart type des valeurs mesurées sont également présentes mais souvent non visibles car inférieures à la taille des marqueurs.

Annexe IX

Comparaison des populations dont la concentration au 5^{ème} cycle est de :

261xMIC



522xMIC

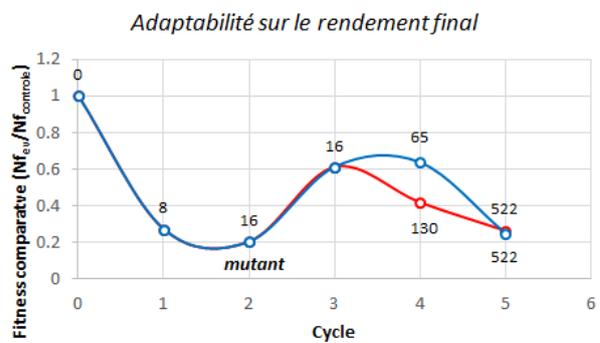


Figure Annexe 10 : Étude de l'impact du chemin évolutif sur l'adaptabilité des populations (sup-MIC)

Ces graphiques représentent l'évolution de la fitness comparative entre les populations évoluées, soumises à différents chemins évolutifs terminant tous, au cycle 5, à des concentrations supérieures au MIC_{M1} (261 et 522xMIC), et les contrôles (populations de bactéries E. coli maintenues en culture en conditions non stressantes, jamais soumises à l'antibiotique), pour le rendement final. Les nombres inscrits à côté des points de mesures correspondent à la concentration à laquelle la métapopulation était soumise pour le cycle en question. Des barres d'erreur représentant l'écart type des valeurs mesurées sont également présentes mais souvent non visibles car inférieures à la taille des marqueurs.

Bibliographie

- [1] « Illustration De Vecteur D'une Expérience De Francesco Redi 1668 Illustration de Vecteur - Illustration du science, pasteur: 153632184 », *Dreamstime*. <https://fr.dreamstime.com/illustration-vecteur-d-experience-francesco-redi-image153632184> (consulté le mars 20, 2020).
- [2] S. E. Luria et M. Delbrück, « Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance », *Genetics*, vol. 28, n° 6, p. 491-511, nov. 1943.
- [3] E. Jablonka, « Epigenetic inheritance and plasticity: The responsive germline », *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 111, n° 2, p. 99-107, avr. 2013, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2012.08.014.
- [4] « Épigénétique / Histoire de l'Inserm ». <https://histoire.inserm.fr/les-domaines-de-recherche/epigenetique> (consulté le mars 28, 2020).
- [5] S. Missonnier, *E-baby : le bébé virtuel*. Eres, 2012.
- [6] C. R. Woese et G. E. Fox, « Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 74, n° 11, p. 5088-5090, nov. 1977, doi: 10.1073/pnas.74.11.5088.
- [7] W. B. Whitman, D. C. Coleman, et W. J. Wiebe, « Prokaryotes: The unseen majority », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, n° 12, p. 6578-6583, juin 1998, doi: 10.1073/pnas.95.12.6578.
- [8] K. R. Arrigo, « Marine microorganisms and global nutrient cycles », *Nature*, vol. 437, n° 7057, Art. n° 7057, sept. 2005, doi: 10.1038/nature04159.
- [9] P. G. Falkowski, R. T. Barber, et V. Smetacek, « Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production », *Science*, vol. 281, n° 5374, p. 200-206, juill. 1998, doi: 10.1126/science.281.5374.200.
- [10] J. E. Kostka *et al.*, « Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill ▽ », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, n° 22, p. 7962-7974, nov. 2011, doi: 10.1128/AEM.05402-11.
- [11] I. M. Head, D. M. Jones, et W. F. M. Röling, « Marine microorganisms make a meal of oil », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 4, n° 3, Art. n° 3, mars 2006, doi: 10.1038/nrmicro1348.
- [12] S. J. MacNaughton, J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y.-J. Chang, et D. C. White, « Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 65, n° 8, p. 3566-3574, août 1999, doi: 10.1128/AEM.65.8.3566-3574.1999.
- [13] R. J. W. Brooijmans, M. I. Pastink, et R. J. Siezen, « Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew », *Microb. Biotechnol.*, vol. 2, n° 6, p. 587-594, 2009, doi: 10.1111/j.1751-7915.2009.00151.x.
- [14] E. R. Zettler, T. J. Mincer, et L. A. Amaral-Zettler, « Life in the "Plastisphere": Microbial Communities on Plastic Marine Debris », *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, n° 13, p. 7137-7146, juill. 2013, doi: 10.1021/es401288x.
- [15] L. Cosgrove, P. L. McGeechan, G. D. Robson, et P. S. Handley, « Fungal Communities Associated with Degradation of Polyester Polyurethane in Soil », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, n° 18, p. 5817-5824, sept. 2007, doi: 10.1128/AEM.01083-07.

- [16] A. A. Shah, F. Hasan, J. I. Akhter, A. Hameed, et S. Ahmed, « Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil », *Ann. Microbiol.*, vol. 58, n° 3, p. 381, sept. 2008, doi: 10.1007/BF03175532.
- [17] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, et S. Ahmed, « Biological degradation of plastics: A comprehensive review », *Biotechnol. Adv.*, vol. 26, n° 3, p. 246-265, mai 2008, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- [18] M. G. A. Van Der Heijden, R. D. Bardgett, et N. M. Van Straalen, « The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems », *Ecol. Lett.*, p. 296-310, janv. 2018, doi: 10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x@10.1111/(ISSN)1461-0248.year-of-biodiversity.
- [19] G. Santoyo, C. Hernández-Pacheco, J. Hernandez-Salmeron, et R. Hernández-León, « The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: Toward sustainable agriculture. A review », *Span. J. Agric. Res.*, vol. 15, p. e03R01, mars 2017, doi: 10.5424/sjar/2017151-9990.
- [20] R. Sender, S. Fuchs, et R. Milo, « Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans », *Cell*, vol. 164, n° 3, p. 337-340, janv. 2016, doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.
- [21] H. Fang, J. Kang, et D. Zhang, « Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives », *Microb. Cell Factories*, vol. 16, n° 1, p. 15, janv. 2017, doi: 10.1186/s12934-017-0631-y.
- [22] S. J. Moore et M. J. Warren, « The anaerobic biosynthesis of vitamin B12 », *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 40, n° 3, p. 581-586, juin 2012, doi: 10.1042/BST20120066.
- [23] C. A. Lozupone, J. I. Stombaugh, J. I. Gordon, J. K. Jansson, et R. Knight, « Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota », *Nature*, vol. 489, n° 7415, Art. n° 7415, sept. 2012, doi: 10.1038/nature11550.
- [24] J. M. Willey, L. M. Sherwood, C. J. Woolverton, J. Coyette, J.-P. Joseleau, et R. Perraud, *Microbiologie de Prescott*. 2018.
- [25] P. B. Rainey et M. J. Bailey, « Physical and genetic map of the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 chromosome », *Mol. Microbiol.*, vol. 19, n° 3, p. 521-533, 1996, doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.391926.x.
- [26] T. Baba *et al.*, « Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection », *Mol. Syst. Biol.*, vol. 2, n° 1, p. 2006.0008, janv. 2006, doi: 10.1038/msb4100050.
- [27] J. W. Drake, « A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, n° 16, p. 7160-7164, août 1991, doi: 10.1073/pnas.88.16.7160.
- [28] I. Bjedov *et al.*, « Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria », *Science*, vol. 300, n° 5624, p. 1404-1409, mai 2003, doi: 10.1126/science.1082240.
- [29] M. Baym *et al.*, « Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes », *Science*, vol. 353, n° 6304, p. 1147-1151, sept. 2016, doi: 10.1126/science.aag0822.
- [30] O. fédéral de la santé publique OFSP, « Stratégie Antibiorésistance dans le domaine humain ». <https://www.bag.admin.ch/bag/fr/home/strategie-und-politik/nationale-gesundheitsstrategien/strategie-antibiotikaresistenzen-schweiz.html> (consulté le avr. 20, 2020).
- [31] S. B. Levy et B. Marshall, « Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses », *Nat. Med.*, vol. 10, n° 12, Art. n° 12, déc. 2004, doi: 10.1038/nm1145.
- [32] I. Wiegand, K. Hilpert, et R. E. W. Hancock, « Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances », *Nat. Protoc.*, vol. 3, n° 2, p. 163-175, févr. 2008, doi: 10.1038/nprot.2007.521.

- [33] H. Bachmann *et al.*, « Availability of public goods shapes the evolution of competing metabolic strategies », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110, n° 35, p. 14302-14307, août 2013, doi: 10.1073/pnas.1308523110.
- [34] H. Bahl, W. Andersch, et G. Gottschalk, « Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat », *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 15, n° 4, p. 201-205, déc. 1982, doi: 10.1007/BF00499955.
- [35] E. Toprak, A. Veres, J.-B. Michel, R. Chait, D. L. Hartl, et R. Kishony, « Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection », *Nat. Genet.*, vol. 44, n° 1, p. 101-105, janv. 2012, doi: 10.1038/ng.1034.
- [36] R. Mutzel et P. Marliere, « Method and device for selecting accelerated proliferation of living cells in suspension », US6686194B1, févr. 03, 2004.
- [37] S. Belkhefha *et al.*, « Continuous Culture Adaptation of *Methylobacterium extorquens* AM1 and TK 0001 to Very High Methanol Concentrations », *Front. Microbiol.*, vol. 10, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01313.
- [38] V. Pezo *et al.*, « A Metabolic Prototype for Eliminating Tryptophan From The Genetic Code », *Sci. Rep.*, vol. 3, févr. 2013, doi: 10.1038/srep01359.
- [39] P. Marlière *et al.*, « Chemical Evolution of a Bacterium's Genome », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, n° 31, p. 7109-7114, 2011, doi: 10.1002/anie.201100535.
- [40] Q. Zhang *et al.*, « Acceleration of Emergence of Bacterial Antibiotic Resistance in Connected Microenvironments », *Science*, vol. 333, n° 6050, p. 1764-1767, sept. 2011, doi: 10.1126/science.1208747.
- [41] H. A. Lindsey, J. Gallie, S. Taylor, et B. Kerr, « Evolutionary rescue from extinction is contingent on a lower rate of environmental change », *Nature*, vol. 494, n° 7438, Art. n° 7438, févr. 2013, doi: 10.1038/nature11879.
- [42] J. L. Martinez, « The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria », *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 276, n° 1667, p. 2521-2530, juill. 2009, doi: 10.1098/rspb.2009.0320.
- [43] R. E. Lenski, M. R. Rose, S. C. Simpson, et S. C. Tadler, « Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations », *Am. Nat.*, vol. 138, n° 6, p. 1315-1341, déc. 1991, doi: 10.1086/285289.
- [44] B. H. Good, M. J. McDonald, J. E. Barrick, R. E. Lenski, et M. M. Desai, « The dynamics of molecular evolution over 60,000 generations », *Nature*, vol. 551, n° 7678, Art. n° 7678, nov. 2017, doi: 10.1038/nature24287.
- [45] M. J. Wisner, N. Ribbeck, et R. E. Lenski, « Long-Term Dynamics of Adaptation in Asexual Populations », *Science*, vol. 342, n° 6164, p. 1364-1367, déc. 2013, doi: 10.1126/science.1243357.
- [46] D. E. Rozen et R. E. Lenski, « Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. VIII. Dynamics of a Balanced Polymorphism », *Am. Nat.*, vol. 155, n° 1, p. 24-35, janv. 2000, doi: 10.1086/303299.
- [47] Z. D. Blount, C. Z. Borland, et R. E. Lenski, « Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli* », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 105, n° 23, p. 7899-7906, juin 2008, doi: 10.1073/pnas.0803151105.
- [48] T. F. Cooper, D. E. Rozen, et R. E. Lenski, « Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichiacoli* », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 3, p. 1072-1077, févr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0334340100.
- [49] M. J. McDonald, S. M. Gehrig, P. L. Meintjes, X.-X. Zhang, et P. B. Rainey, « Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. IV. Genetic constraints guide evolutionary

- trajectories in a parallel adaptive radiation », *Genetics*, vol. 183, n° 3, p. 1041-1053, nov. 2009, doi: 10.1534/genetics.109.107110.
- [50] W. Swenson, D. S. Wilson, et R. Elias, « Artificial ecosystem selection », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, n° 16, p. 9110-9114, août 2000, doi: 10.1073/pnas.150237597.
- [51] W. Swenson, J. Arendt, et D. S. Wilson, « Artificial selection of microbial ecosystems for 3-chloroaniline biodegradation », *Environ. Microbiol.*, vol. 2, n° 5, p. 564-571, 2000, doi: 10.1046/j.1462-2920.2000.00140.x.
- [52] G. Doucier, « Évolution des Propriétés Darwiniennes Collectives », <http://www.theses.fr>, déc. 02, 2019. <http://www.theses.fr/s189656> (consulté le mai 12, 2020).
- [53] W. B. Provine, « Ernst Mayr: Genetics and speciation. », *Genetics*, vol. 167, n° 3, p. 1041-1046, juill. 2004.
- [54] J.-B. Dupin, « Cultures multi-parallélisées en millifluidique digitale : diversité et sélection artificielle », thesis, Sorbonne université, 2018.
- [55] A. Manz, N. Graber, et H. M. Widmer, « Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 1, n° 1, p. 244-248, janv. 1990, doi: 10.1016/0925-4005(90)80209-I.
- [56] S.-Y. Teh, R. Lin, L.-H. Hung, et A. P. Lee, « Droplet microfluidics », *Lab. Chip*, vol. 8, n° 2, p. 198-220, 2008, doi: 10.1039/B715524G.
- [57] L. Baraban *et al.*, « Millifluidic droplet analyser for microbiology », *Lab. Chip*, vol. 11, n° 23, p. 4057-4062, nov. 2011, doi: 10.1039/C1LC20545E.
- [58] L. Jiang *et al.*, « Digital antimicrobial susceptibility testing using the MilliDrop technology », *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 35, n° 3, p. 415-422, mars 2016, doi: 10.1007/s10096-015-2554-z.
- [59] S. P. Damodaran *et al.*, « A Millifluidic Study of Cell-to-Cell Heterogeneity in Growth-Rate and Cell-Division Capability in Populations of Isogenic Cells of *Chlamydomonas reinhardtii* », *PLOS ONE*, vol. 10, n° 3, p. e0118987, mars 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0118987.
- [60] D. Cottinet *et al.*, « Lineage Tracking for Probing Heritable Phenotypes at Single-Cell Resolution », *PLoS ONE*, vol. 11, n° 4, avr. 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0152395.
- [61] L. Boitard, D. Cottinet, N. Bremond, J. Baudry, et J. Bibette, « Growing microbes in millifluidic droplets », *Eng. Life Sci.*, vol. 15, n° 3, p. 318-326, 2015, doi: 10.1002/elsc.201400089.
- [62] F. Bertholle et J. Bibette, « Milli-fluidique digitale pour la microbiologie », phdthesis, Université Pierre et Marie Curie UPMC Paris VI, 2010.
- [63] D. Cottinet, « Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia Coli* étudiées en millifluidique digitale », thesis, Paris 6, 2013.
- [64] C. N. Baroud, F. Gallaire, et R. Dangla, « Dynamics of microfluidic droplets », *Lab. Chip*, vol. 10, n° 16, p. 2032-2045, juill. 2010, doi: 10.1039/C001191F.
- [65] J. Baudry *et al.*, « Procédé Pour La Manipulation De L'évolution D'ensembles D'entités À Auto-Réplication Et Variation Entre Des Ensembles D'entités À Auto-Réplication », EP3103862A1, déc. 14, 2016.
- [66] F. P. Bretherton, « The motion of long bubbles in tubes », *J. Fluid Mech.*, vol. 10, n° 2, p. 166-188, mars 1961, doi: 10.1017/S0022112061000160.
- [67] J. I. G. Rodriguez, L. Boitard, A. S. D. Drevelle, N. P. Bremond, et J. Bibette, « A method for fusing or contacting reactor and reagent droplets in a microfluidic or millifluidic device », WO2016020414A1, févr. 11, 2016.

- [68] G. F. Christopher et S. L. Anna, « Microfluidic methods for generating continuous droplet streams », *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 40, n° 19, p. R319-R336, sept. 2007, doi: 10.1088/0022-3727/40/19/R01.
- [69] « Fluorescence SpectraViewer - FR ». <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html> (consulté le mai 18, 2020).
- [70] J.-B. Dupin, A. S. Chaurasia, J. Bibette, N. Bremond, J. Baudry, et W. Sire, « Méthode De Transfert De Matière Dans Un Dispositif Microfluidique Ou Millifluidique », déc. 19, 2019.
- [71] M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, et S. R. Quake, « Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography », *Science*, vol. 288, n° 5463, p. 113-116, avr. 2000, doi: 10.1126/science.288.5463.113.
- [72] J. Zhou, A. V. Ellis, et N. H. Voelcker, « Recent developments in PDMS surface modification for microfluidic devices », *ELECTROPHORESIS*, vol. 31, n° 1, p. 2-16, 2010, doi: 10.1002/elps.200900475.
- [73] R. Attia, « Modifications de surfaces et intégration de MEMS pour les laboratoires sur puce », Thèse de doctorat, Paris 6, 2008.
- [74] L. Erdey, W. F. Pickering, et C. L. Wilson, « Mixed chemiluminescent indicators », *Talanta*, vol. 9, n° 4, p. 371-375, avr. 1962, doi: 10.1016/0039-9140(62)80081-2.
- [75] A. E. Koch et J. J. Burchall, « Reversal of the Antimicrobial Activity of Trimethoprim by Thymidine in Commercially Prepared Media », *Appl. Microbiol.*, vol. 22, n° 5, p. 812-817, nov. 1971.
- [76] R. N. Brogden, A. A. Carmine, R. C. Heel, T. M. Speight, et G. S. Avery, « Trimethoprim: A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetics and Therapeutic Use in Urinary Tract Infections », *Drugs*, vol. 23, n° 6, p. 405-430, juin 1982, doi: 10.2165/00003495-198223060-00001.
- [77] J. Aagaard, P. O. Madsen, P. Rhodes, et T. Gasser, « MICs of ciprofloxacin and trimethoprim for Escherichia coli: Influence of pH, inoculum size and various body fluids », *Infection*, vol. 19, n° S3, p. S167-S169, mai 1991, doi: 10.1007/BF01643691.
- [78] R. E. Lenski, « Experimental evolution and the dynamics of adaptation and genome evolution in microbial populations », *ISME J.*, vol. 11, n° 10, Art. n° 10, oct. 2017, doi: 10.1038/ismej.2017.69.
- [79] S. Haruta, Z. Cui, Z. Huang, M. Li, M. Ishii, et Y. Igarashi, « Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability », *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 59, n° 4, p. 529-534, janv. 2002, doi: 10.1007/s00253-002-1026-4.
- [80] X. Zang, M. Liu, Y. Fan, J. Xu, X. Xu, et H. Li, « The structural and functional contributions of β -glucosidase-producing microbial communities to cellulose degradation in composting », *Biotechnol. Biofuels*, vol. 11, n° 1, p. 51, févr. 2018, doi: 10.1186/s13068-018-1045-8.

RÉSUMÉ

Les microorganismes sont au cœur de l'écologie Terrestre. Omniprésents, ils ont joué et jouent un rôle primordial dans l'évolution de la vie sur Terre. Assemblés sous forme de communautés, ils présentent des interactions bénéfiques et indispensables aux cycles biogéochimiques, à la bioremédiation, à la croissance et la protection des plantes, à notre santé et même à notre survie. Pourtant, les synergies que présentent ces communautés ne sont que peu étudiées, et restent inexploitées, essentiellement par manque d'une technologie appropriée. Cette thèse propose une nouvelle technologie, dite « Machine d'Évolution Microbienne » (MEM), utilisant la force motrice de l'évolution, la sélection naturelle, pour étudier l'écologie microbienne et en tirer profit. Ce travail de thèse a permis sa conception, son développement et la démonstration de son potentiel d'application. L'approche choisie, basée sur la millifluidique digitale, consiste à utiliser des gouttes millimétriques pour compartimenter et paralléliser la culture, la manipulation, l'analyse de centaines de communautés, et diriger leur évolution de manière automatisée. Son fonctionnement et son concept ont été validés par une première application biologique concrète illustrant le cas de l'acquisition d'une antibiorésistance chez des populations bactériennes d'*Escherichia coli*.

MOTS CLÉS

Écologie microbienne, Évolution, Communautés microbiennes, Microorganismes, Synergies, Millifluidique en gouttes.

ABSTRACT

Microorganisms are at the heart of Earth's ecology. Omnipresent, they have been playing a fundamental role in the evolution of life on Earth. Assembled in the form of communities, they present beneficial interactions that are essential for biogeochemical cycles, bioremediation, plants growth and protection, our health and even our survival. However, the synergies that these communities present are not extensively studied, and remain untapped, largely owing to lack of an appropriate technology. This thesis proposes a new technology, called "Microbial Evolution Machine" (MEM), using the driving force of evolution, natural selection, to study microbial ecology and take benefit from it. This thesis work allowed its design, development and demonstration of its application potential. The chosen approach, based on digital millifluidics, consists of using millimeter-sized droplets to compartmentalize and parallelize the culture, manipulation, and analysis of hundreds of communities, and to direct their evolution in an automated way. Its functioning and concept have been validated by a first concrete biological application, which demonstrates an acquisition of antibiotic resistance in bacterial populations of *Escherichia coli*.

KEYWORDS

Microbial ecology, Evolution, Microbial communities, Microorganisms, Synergies, Droplet millifluidics.